

# Herstellung und Analyse einer Maus mit gezielter Inaktivierung des TRH-DE Gens

von der naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologen Lars Geffers  
geboren am 11.06.1975 in Peine

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2001 bis Juni 2005 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. K. Bauer angefertigt.

Referent: Prof. Dr. K. Bauer

Korreferent: Prof. Dr. W. H. Müller

Tag der Promotion: 28. Juli 2005

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

Hannover, den 23. Juni 2005

(Lars Geffers)

## ***Danksagung***

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Karl Bauer für die Bereitstellung eines interessanten und unerschöpflichen Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Prof Dr. W.H. Müller danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Dr. Roland Rabeler danke ich für die Überlassung der TRH-R1 defizienten Mauslinien und die fachkundige und freundschaftliche Einführung in die Endokrinologie und das tierexperimentelle Arbeiten.

Dr. Michael Leitges danke ich für die kompetente technische Hilfe bei der Erstellung chimärer Mäuse. Ein spezieller Dank gebührt dabei Frederike Kruse für ihren routinierten Einsatz bei der Blastozysteninjektion.

Dr. Theo Visser möchte ich für die Messung der Schilddrüsen- und Dr. Parlow für die Messung der Hypophysen-Hormonkonzentrationen danken.

Dr. Martin Schäfer danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Immunhistochemie, seine Diskussionsbereitschaft und für einen angenehmen Aufenthalt in Marburg.

Dr. Henrik Oster danke ich für die Bestimmung der Laufradaktivität meiner Mäuse und seine ständige Hilfsbereitschaft weit über den circadianen Themenkreis hinaus.

Bei Hans Otto Bader, Nadine Naujokat und Alexandra Menneking möchte ich mich für die Unterstützung bei der Arbeit im Tierstall sowie für ihre herzliche Anteilnahme in persönlichen und Maus-bezogenen Dingen bedanken.

Uwe Herzig, Sigmar Falkenhagen und Andreas Richel danke ich für die unglaubliche Kreativität und unkomplizierte Hilfe bei allen Anliegen, die ich in ihrer gut sortierten Werkstatt vorzubringen hatte.

Dr. Krzysztof Paliga danke ich für seine stets konstruktive Kritik und vorbildliche Bereitschaft, Erfahrung und Wissen mit anderen zu teilen.

Dr. Sönke Friedrichsen danke ich für seine förderlich direkte Art auf fachlicher und persönlicher Ebene sowie für alles, was ich über Fußball weiß.

Innerhalb der Arbeitsgruppe Bauer möchte ich mich bei Jens Mittag besonders herzlich bedanken, da er mir in entscheidenden Momenten dieser Arbeit wieder aufs Pferd geholfen hat und auch sonst mit seiner scharfen Sicht der Dinge und dem nötigen Bierernst als wertvoller Freund zur Seite stand.

Mein spezieller Dank geht an Dr. Katja Hübel, Melanie Kraus, Wiebke Oehr, Marija Trajkovic, Andreas Weiß, Silke Polsfuß, Petra Affeldt, Uwe Grunenberg, Vera Langer, Marion Piechotta, Diya Abraham und Dr. Murat Yaylaoglu, aber auch an all jene, die sonst durch ihre Unterstützung bei Problemen des Laboralltag, ihre stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Sebastian Damerow danke ich für seine Solidarität beim großen Finale in der Bibliothek.

Valerie Ashe möchte ich darüber hinaus für die effektive Erweiterung meiner Sprachkenntnisse, für die hervorragende Organisation der Dienstreisen und ganz besonders für die vielen Momente guten englischen Humors danken.

Meiner Frau Insa möchte ich an dieser Stelle von ganzem Herzen für ihre Stärke und Entschlossenheit danken, mit der sie mich liebevoll und verständig durch den wechselhaften Verlauf dieser Arbeit begleitet hat. Meiner lieben Familie und besonders meinen Eltern bin ich für ihre bedingungslose Unterstützung unendlich dankbar.



ERDGEIST: In Lebensfluten, im Tatensturm  
Wall ich auf und ab,  
Webe hin und her!  
Geburt und Grab,  
Ein ewiges Meer,  
Ein wechselnd Weben,  
Ein glühend Leben,  
So schaff ich am sausenden Webstuhl der Zeit,  
Und wirke der Gottheit lebendiges Kleid.

FAUST: Der du die weite Welt umschweifst,  
Geschäftiger Geist, wie nah fühl ich mich dir!

ERDGEIST: Du gleichst dem Geist, den du begreifst,  
Nicht mir! (*verschwindet*)

*Goethe, Faust, Der Tragödie erster Teil, Vers 501f.*

Teile dieser Arbeit wurden aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht:

**Artikel**

Rabaler, R.; Mittag, J.; Geffers, L.; Ruther, U.; Leitges, M.; Parlow, A. F.; Visser, T. J. und Bauer, K. (2004): Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism, Mol.Endocrinol. (Band 18), Nr. 6, Seite 1450-1460.

**Kurzartikel (*meeting abstracts*)**

Geffers, L. und Bauer K. (2005): Generation and analysis of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme (TRH-DE) deficient mice, Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes (Band 113, S1), Seite 61.

Geffers, L. und Bauer K. (2004): Generation of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme (TRH-DE) deficient mice by targeted recombination, FENS Forum Abstracts (Band 2), Abstract A046.5.

## Kurzzusammenfassung

---

**T**<sub>TRH</sub> (*thyrotropin-releasing hormone*) wurde als erster hypothalamisch-hypophysiotroper *releasing*-Faktor identifiziert. Dennoch werden mehr als zwei Drittel des immunoreaktiven TRH im zentralen Nervensystem (ZNS) außerhalb des thyotropen Bereichs des Hypothalamus detektiert. Dies deutet auf eine Funktion hin, die weit über die Regulation der Schilddrüsenachse hinausgeht. Der Einfluß von TRH im ZNS kann in vier gesonderte Bereiche unterteilt werden: das hypothalamisch-hypophysiotrope neuroendokrine System, das Hirnstamm/Mittelhirn/Rückenmark-System, das limbisch/corticale System und das chronobiologische System. Es besteht die Ansicht, daß die neurobiologische Hauptfunktion von TRH in der Modulation der Homöostase liegt, die durch neuronale Mechanismen innerhalb dieser vier vernetzten Bereiche kontrolliert wird. Dies stimmt mit der traditionellen Funktion von TRH als ein Regulator metabolischer Homöostase überein. Im extrazellulären Raum wird diese hoch potente Substanz ausschließlich durch das TRH-abbauende Ektoenzym (TRH-DE) inaktiviert. Es ist nicht bekannt, daß TRH-DE andere physiologisch relevante Substrate akzeptiert. In dieser Arbeit wurde eine TRH-DE defiziente Mauslinie generiert, um den destabilisierenden Effekt in TRHergen Systemen zu studieren. In der Mausmutante wurden zwei Reporter, bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) und humane placentare alkalische Phosphatase (PLAP), unter die direkte Kontrolle des endogenen Promotors gestellt, um eine spezifische Identifikation von Zellen und zellulären Projektionen zu ermöglichen. Rekombinante Mäuse wurden ohne einen offensichtlichen Phänotyp mit Mendelscher Frequenz geboren. Die Funktion der Schilddrüsenachse war unverändert mit normalen Serumwerten für TSH und Schilddrüsenhormone. Auch die mRNA Konzentrationen der hypophysären Hormone waren im Fall von TSH und Prolaktin weitestgehend normal. Die Expression von TRH Rezeptor 1 (TRH-R1) in der Hypophyse war jedoch stark erniedrigt. Im Gegensatz dazu blieben die mRNA Konzentrationen von TRH-R1 im Gehirn zwischen Mutante und Wildtyp unverändert. Stattdessen war die Expression von TRH-R2 im ZNS der Mutante deutlich erhöht. In Laufradversuchen zeigten die TRH-DE defizienten Mäuse in einem normalen Licht/Dunkel-Zyklus eine höhere Laufaktivität während der Dunkelphase. Unter konstantem Lichtstreß wurde eine stark reduzierte Aktivität registriert. Die Mutanten setzten in einem normalen Licht/Dunkel-Zyklus erst pünktlich mit Anbruch der Dunkelphase mit ihrer Aktivität ein, während die Kontrollen schon weit vor Ende der Lichtphase mit der Laufaktivität begannen. Diese phototrope Charakteristik der TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse wurde auch in der starken Expression von TRH-DE in photosensitiven Geweben reflektiert. Obwohl keine Störung in der circadianen Rhythmik beobachtet werden konnte, korrespondieren die Beobachtungen mit der Anwesenheit von TRH im chronobiologischen System. Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die regulatorische Bedeutung von TRH-DE mehr in den zentralnervösen als in den neuroendokrinen Aspekten des TRHergen Systems.

---

**Stichworte:** TRH-DE *Knock-out*, TRH, Homöostase, zentrales Nervensystem, Phototropismus

## Abstract

---

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) was the first hypothalamic-hypophysiotrophic releasing factor to be identified. However, more than two-thirds of immunoreactive TRH in the central nervous system (CNS) is detected outside the thyrotrophic zone of the hypothalamus, suggesting a biological function far beyond the regulation of the thyroid axis. The functions of TRH in the CNS can be conceptualized as having four distinct components: the hypothalamic-hypophysiotrophic neuroendocrine system, the brainstem/midbrain/spinal cord system, the limbic/cortical system and the chronobiological system. It has been proposed that the main neurobiological function is to promote homeostasis, accomplished through neuronal mechanisms resident in these four integrated systems. This is consistent with the traditional role of TRH as a regulator of metabolic homeostasis. In an extracellular context this highly potent substance is exclusively inactivated by the TRH degrading ectoenzyme (TRH-DE). TRH-DE is not known to accept any other physiological relevant substrate. In the work at hand a knock-out mouse deficient in TRH-DE was generated to study the destabilizing effects on the general TRH homeostatic system. In the mutant mouse two reporters, bacterial  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) and human placental alkaline phosphatase (PLAP), were put under the direct control of the endogenous TRH-DE promoter to allow specific identification of cells and cellular projections. Recombinant mice were born with an expected Mendelian ratio and no overt phenotype was observed. Regulation of the thyroid axis in TRH-DE<sup>-/-</sup> mice resulted in a normal output of TSH and thyroid hormones. The mRNA levels of all hypophyseal hormones and in particular of TSH and prolactin were near to normal. However, in compensation for the missing ectoenzyme the expression of TRH receptor 1 (TRH-R1) was markedly downregulated in the pituitary. By contrast, mRNA levels of TRH-R1 remained the same in the CNS of mutants and controls while levels of TRH-R2 were significantly elevated in the mutant brain. When tested for wheel-running activity the mutant mice exhibited a higher night-time activity in normal light/dark cycles and a reduced total activity in constant light. With mutants the onset of activity in normal light/dark cycles was observed exactly when the lights were switched off, while controls had an earlier onset when lights were still on. This phototropic characteristic of TRH-DE<sup>-/-</sup> mice was reflected by a strong presence of TRH-DE in photosensitive tissues as indicated by the reporters. This corresponds well with the involvement of TRH in the chronobiological system, though no direct defect in circadian rhythmicity was detected. Overall the findings of this work stressed the regulatory importance of TRH-DE in the central nervous TRH-signalling rather than its contribution to neuroendocrine function.

---

**Keywords:** TRH-DE knock-out, TRH, homeostasis, central nervous system, phototropism

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Homöostase .....	1
Kommunikation .....	1
Regulation .....	1
Integration .....	1
Mediatoren .....	1
1.2 Neuropeptidhormone .....	2
Hypothalamische <i>releasing</i> -Faktoren .....	2
Beginn der Neuroendokrinologie .....	2
1.3 Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen Achse .....	3
Hypothalamus .....	3
Hypophyse .....	4
Schilddrüse .....	4
1.4 TRH-Signalsystem .....	5
TRH .....	5
TRH-Rezeptoren .....	6
TRH-abbauende Enzyme .....	7
TRH in der hypothalamo-hypophysären Achse .....	8
TRH im Zentralnervensystem .....	8
TRH außerhalb des Zentralnervensystems .....	9
1.5 Extrahypophysiotrope Wirkung von TRH im ZNS .....	9
Ergotrophe Effekte .....	10
Autonomes Nervensystem .....	11
Motorische Kontrolle .....	13
Thermoregulation .....	13
Schmerzempfinden .....	14
Chronobiologische Effekte .....	14
1.6 TRH als homöostatischer Modulator .....	14
1.7 Zielsetzung .....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>

2.1 <i>Knock-out</i> Technologie .....	17
Klonierung des <i>Targeting</i> -Vektors.....	17
ES-Zellkultur .....	20
Elektroporation der ES-Zellen .....	20
Selektion der ES-Zellen .....	20
Analyse der isolierten Klone .....	21
Gewinnung von Embryonen.....	21
Blastozysten-Injektion.....	22
Erzeugung scheinträchtiger Mäuse .....	22
Uterus-Transfer .....	22
Keimbahn-Chimären .....	22
Anmerkung.....	23
2.2 Tierexperimentelle Methoden .....	24
Mauslinien.....	24
Tierhaltung .....	25
Probenentnahme .....	25
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	26
Standardbedingungen und -methoden der Molekularbiologie .....	26
Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren .....	27
Radiochemischer Aktivitätstest.....	31
2.4 Histologische Methoden.....	32
<i>In situ</i> Hybridisierung.....	32
Immunohistochemie .....	36
Reporternachweis .....	38
2.5 Radioimmuno-Assay .....	40
Schilddrüsenhormone .....	40
Hypophysäre Hormone .....	40
2.6 Primer und Plasmide .....	41
Primer .....	41
Plasmide .....	42
2.7 Statistische Absicherung .....	43
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1 Herstellung TRH-DE defizienter Mäuse.....	44
Klonierung des <i>Targeting</i> -Vektors.....	44

<i>Gene Targeting</i> in murinen embryonalen Stammzellen .....	47
Analyse rekombinanter Klone.....	47
Produktion von Chimären und Aufrechterhaltung der gezielten Mutation.....	50
Untersuchungen zum Verlust der TRH-DE Genaktivität .....	53
3.2 Reporteraktivität unter der Kontrolle des TRH-DE Promoters.....	55
Darstellung der Reporteraktivität.....	55
Embryonale Verteilung der lacZ-Aktivität in Ganzpräparaten .....	57
Embryonale und neonatale Verteilung der lacZ- und PLAP-Aktivität.....	59
Adulte Verteilung der lacZ- und PLAP-Aktivität im Gehirn.....	63
Adulte Verteilung der lacZ-Aktivität in der Hypophyse.....	67
3.3 Vergleichende Darstellung des TRH-Systems im adulten Gehirn.....	68
<i>In situ</i> Hybridisierung des TRH-Systems im adulten Gehirn .....	68
Vergleich von TRH-DE und -R1 Promotoraktivität in Cortex und Cerebellum.....	70
3.4 Endokrinologische Analyse.....	72
Gegenüberstellung von TRH-DE <sup>-/-</sup> und TRH-R1 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	72
Serumkonzentrationen von TSH und Prolaktin .....	72
Hypophysen-Schilddrüsen Achse .....	74
Expression von TSH, Prolaktin, TRH-R1 und -DE in der Hypophyse.....	76
Darstellung hormonproduzierender Zellen in der Hypophyse.....	78
3.5 Phänotyp.....	80
Habitus .....	80
Gewichtsentwicklung .....	80
Aktivitätsprofil .....	82
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>86</b>
4.1 Genomische Manipulation an der Maus.....	86
Vorteile und Risiken.....	86
Phänotyp und genetischer Hintergrund .....	87
4.2 Expressions-Analyse .....	89
Reporter.....	89
TRH-DE Promotoraktivität in der Embryonalentwicklung .....	90
TRH-DE Promotoraktivität in verschiedenen Sinnesorganen .....	93
TRH-DE Promotoraktivität im adulten Gehirn.....	94
TRH-DE Promotoraktivität in der Hypophyse.....	96
Veränderungen am TRH-Signalsystem im Gehirn der TRH-DE <sup>-/-</sup> Maus .....	96

4.3 Endokrinologische Analyse.....	98
Schilddrüsenfunktion .....	98
Hypothalamisch-Hypophysäre Achse .....	98
4.4 Phänotyp TRH-DE defizienter Mäuse .....	100
Allgemeiner Phänotyp.....	100
Lichtabhängige lokomotorische Aktivität in der TRH-DE <sup>-/-</sup> Maus.....	100
4.5 Perspektiven .....	103
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>105</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>108</b>
<b>7. Abkürzungen .....</b>	<b>115</b>



# 1. EINLEITUNG

## *1.1 Homöostase*

### **Kommunikation**

Um das innere Gleichgewicht (Homöostase) aller Stoffwechselprozesse eines Organismus trotz wechselnder Umwelteinflüsse aufrechtzuerhalten, existieren elementare Regelmechanismen, die durch eine systemische Vernetzung von zentralem Nervensystem (ZNS), Endokriniem und Immunsystem über Neurotransmitter, Hormone und Cytokine realisiert werden.

### **Regulation**

Eine der kleinsten Regionen des Gehirns, der Hypothalamus, nimmt in diesem Zusammenhang die Position einer übergeordneten Schaltzentrale ein. An der Basis des Gehirns gelegen empfängt der Hypothalamus sowohl aus dem Hirnstamm als auch aus höheren Cortexregionen Informationen und ist ein wichtiges Integrationsorgan zur Steuerung des inneren Körpermilieus. Im Hypothalamus befinden sich Zentren des vegetativen Nervensystems, die essentielle Regulationsvorgänge des Organismus kontrollieren und koordinieren. Beispiele dafür sind die Wärmeregulation, der Wach- und Schlafrhythmus, Blutdruck- und Atmungsregulation, der Fettstoffwechsel, der Wasserhaushalt (Osmoregulation), die Sexualfunktion, die Schweißsekretion, die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts und das Appetit- und Fressverhalten.

### **Integration**

Gleichzeitig stellt der Hypothalamus eine Verbindung zwischen dem ZNS und dem endokrinen System her. Seine neurosekretorischen Zellen sind in der Lage durch die Ausschüttung peptiderger Botenstoffe, sogenannter Neuropeptidhormone, über das Blut Informationen an die Peripherie weiterzugeben. Im Zusammenspiel mit der Hypophyse übt der Hypothalamus eine zumeist stimulierende Kontrolle auf Schilddrüse, Nebenniere und Gonaden aus. Die Produkte dieser peripheren Drüsen wirken dabei auf Ebene der Hypophyse und des Hypothalamus auf ihre eigenen Stimulationsachsen inhibierend zurück, so daß homöostatische Regelkreise entstehen, deren Gleichgewicht sowohl von zentralnervösen als auch hormonellen Faktoren bestimmt wird.

### **Mediatoren**

Viele der Mediatoren, die an den verschiedenen Prozessen der hypothalamischen Gleichgewichtsregulation beteiligt sind, entstammen phylogenetisch sehr alten Signalsystemen,

deren Komponenten sich zum Teil sowohl im ZNS, als auch im Endokrinium und Immunsystem wiederfinden lassen. TRH (*thyrotropin releasing hormone*) ist eine dieser stammesgeschichtlich alten Signalsubstanzen. Im Gegensatz zu anderen Neuropeptiden, wird die selektive Inaktivierung von TRH ausschließlich von einem Faktor, der substratspezifischen Aktivität von TRH-DE (TRH *degrading ectoenzyme*), vermittelt. Die Generierung und Charakterisierung einer TRH-DE defizienten Mauslinie sollte es daher ermöglichen, die Bedeutung des TRH-Signalsystems im Zusammenhang mit homöostatischen Prozessen im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen.

## ***1.2 Neuropeptidhormone***

### **Hypothalamische *releasing*-Faktoren**

In der Vergangenheit haben bedeutende Arbeiten zu der Schlußfolgerung geführt, daß Peptide eine wichtige regulatorische Komponente bei Funktion des Nervensystems darstellen. Das Konzept des „peptidergen Neurons“ stammte anfänglich von den neurosekretorischen Zellen im Hypothalamus, die Oxytocin und Vasopressin direkt von ihren Nervenendigungen im Hypophysenhinterlappen in die Blutbahn abgeben. Der Grundgedanke von der neurosekretorischen Aktivität des Hypothalamus läßt sich auf die Arbeit von Scharrer und Scharrer in den späten 1920er Jahren zurückführen (Scharrer und Scharrer, 1940). Eine nachfolgende Arbeit von Harris zeigte, daß die hypothalamischen Substanzen, die in das portale Gefäßsystem sekretiert werden, hypophysenspezifisch sind (Harris, 1948). Dies führte zu dem Konzept der *releasing*-Faktoren (Fink, 1976), dessen Zweck es ist, eine Kaskade von Ereignissen zu initiieren, die ihrerseits in der hypophysären Ausschüttung peripher aktiver Hormone resultieren.

### **Beginn der Neuroendokrinologie**

Die ultimative Bestätigung für die grundlegenden Prinzipien der Neuroendokrinologie lieferten die Arbeitsgruppen von Guillemin (Burgus *et al.*, 1969) und Schally (Boler *et al.*, 1969) mit der Entdeckung und chemische Charakterisierung des ersten hypothalamischen *releasing*-Faktors, TRH. Die neuroendokrine Wirkung von TRH manifestiert sich vor allem in der Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen Achse, einer der Hauptachsen des endokrinen Systems.

### 1.3 Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen Achse

#### Hypothalamus

Der Hypothalamus ist ein kleiner ventraler Teil des Diencephalons. Der hypothalamische *releasing*-Faktor TRH, der im paraventriculären Nucleus (PVN) gebildet und über die *Eminentia mediana* in die Portalgefäße abgegeben wird, regt gemäß der namensgebenden Funktion die Biosynthese und Sekretion von TSH in den thyrotropen Zellen der Adenohypophyse an (Harris *et al.*, 1978). Die Bildung und Ausschüttung von TRH wird im Hypothalamus hauptsächlich von noradrenergen Signalen stimuliert (Krush *et al.*, 1977) und in negativer Rückkopplung durch TSH und Schilddrüsenhormone ( $T_4/T_3$ ) inhibiert (Franklyn *et al.*, 1987; Segerson *et al.*, 1987b). Der Hypothalamus schüttet neben den verschiedenen hypophysiotropen *releasing*-Faktoren auch hemmende Substanzen aus, die eine Freisetzung von hypophysären Hormonen unterdrücken. So wirken sich Somatostatin und Dopamin inhibierend auf die Sekretion thyrotroper Zellen in der Hypophyse aus (Arimura, 1976).

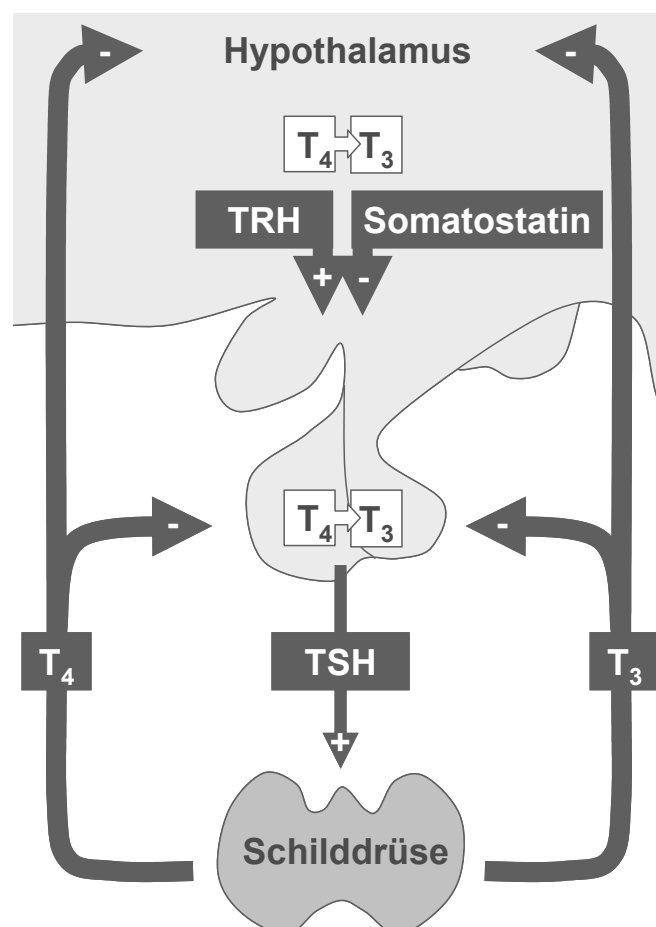


Abbildung 1.1: Schema der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse.

## Hypophyse

Die durch das *Diaphragma cerebri* gegenüber dem Hirn cranial abgegrenzte Hypophyse liegt im Türkensattel an der Schädelbasis. Der deutlich größere Hypophysenvorderlappen (*Pars anterior*) wird von der Adenohypophyse gebildet, die aus dem ektodermal epithelialen Kontext der Rathke-Tasche hervorgeht. Der Hypophysenhinterlappen (*Pars posterior*, Neurohypophyse) ist ein Teil des Diencephalons und besteht vorwiegend aus den neurosekretorischen Projektionen der magnozellularen rostralen Bereiche des Hypothalamus, die in der Hypophyse Oxytocin und Vasopressin an das Blut abgeben. Die Adenohypophyse setzt sich aus verschiedenen hormonproduzierenden Zellen sowie den Follikulostellar-Zellen zusammen. Die basophilen, als glandotrop bezeichneten Zellen weisen im Gewebe eine unzusammenhängende Verteilung einzelner Zell-Cluster auf. Zu dieser Gruppe gehören die thyrotropen, corticotropen und gonadotropen Zellen, die jeweils TSH (*thyroid stimulating hormone*), ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) und im Fall der gonadotropen Zellen FSH (*follicle stimulating hormone*) und LH (*lutening hormone*) produzieren. Dem gegenüber stehen die zusammenhängend angeordneten eosinophilen Zellen, zu denen die laktotropen Prolaktin- und die somatotropen GH- (*growth hormone*) produzierenden Zellen gehören. TSH ist genauso wie FSH und LH ein Glykohormon, das aus zwei Untereinheiten besteht. Alle drei Glykohormone verfügen über eine gemeinsame  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ -GSU, *glycoprotein subunit*), während die  $\beta$ -Untereinheit für das jeweilige Hormon spezifisch ist. Im Allgemeinen wird die Sekretion der hypophysären Hormone durch die hypophysiotropen Peptide des Hypothalamus kontrolliert. Die glandotropen Hormone werden außerdem über Rückkopplungsmechanismen durch die Hormone ihrer peripheren Drüsen reguliert. Zusätzlich wird die Sekretion durch parakrine Signale innerhalb der Adenohypophyse moduliert.

In der Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen (HPT-, *hypothalamic-pituitary-thyroid*) Achse dient die Hypophyse als Integrationspunkt neuroendokriner und endokriner Informationen und liefert die Stellgröße für die Aktivität der Schilddrüse.

## Schilddrüse

Die Hormone der Schilddrüse sind Trijod- ( $T_3$ ) und Tetrajodthyronin ( $T_4$ , Thyroxin), die aus einem jodtyrosinhaltigen Prohormon (Thyreoglobulin) gebildet werden. Während der Entwicklung sind Schilddrüsenhormone entscheidend an Differenzierungs- und Wachstumsprozessen beteiligt. Die Bindung von TSH aus der Hypophyse an hochaffine TSH-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung des cAMP-Signalsystems und zur Synthese und Ausschüttung von Schilddrüsenhormon (Morley, 1981). Zusätzlich zur Steigerung von Volumen und Durchblutung

der Schilddrüse stimuliert TSH den Iodidtransport, die Thyreoglobulin-Synthese, die Iodtyrosinbildung und die Proteolyse der iodierten Thyreoglobulin-Moleküle. Der schematische Regelkreis, der die Homöostase der Schilddrüsenfunktion erhält, ist in Abbildung 1 dargestellt.

Die Regulation der Schilddrüsenhormone erfolgt jedoch nicht ausschließlich auf Ebene der Schilddrüsenfunktion, sondern auch über den extrathyreoidalen Metabolismus der Schilddrüsenhormone. Thyroxin, das Hauptprodukt der Schilddrüse, fungiert als ein Prohormon und zeigt wenig biologische Aktivität. Die Konversion von  $T_4$  zu  $T_3$ , dem biologisch aktiven Schilddrüsenhormon, erfolgt hauptsächlich in peripheren Geweben durch Jodothyronin-Dejodinasen (Kohrle, 1999). Neben der Aktivierung von  $T_4$  durch die Dejodinierung des äußeren Rings (Phenolring) kann auch eine Inaktivierung durch Dejodinierung am Tyrosilring erfolgen, die ausgehend von  $T_4$  oder  $T_3$  inaktives  $rT_3$  oder  $3,3'$ - $T_2$  produziert.  $T_3$  bindet an nukleäre Schilddrüsenhormonrezeptoren, die nur eine geringe Affinität für  $T_4$  zeigen und über TREs (*thyroid hormone response elements*) die Expression von Zielgenen aktivieren oder inhibieren können. Diese komplexe Regulation spiegelt die essentielle Bedeutung von Schilddrüsenhormonen für die Funktion vieler Stoffwechselprozesse wider.

## 1.4 TRH-Signalsystem

### TRH

Das Tripeptid **TRH** (pyroGlu-His-ProNH<sub>2</sub>; Abb. 1.2) wird aus einem Prohormon gebildet, in dem die Vorläufersequenz -Gln-His-Pro-Gly- bei Maus und Ratte fünfmal vorhanden ist. Diese Sequenzen sind von basischen Aminosäuren flankiert, an denen die Spaltung durch spezifische Serin-Endopeptidasen, den sogenannten Prohormon-Konvertasen (PCs), erfolgt (Nilni *et al.*, 1996). Die Zyklisierung des N-terminalen Glutaminylrestes zu Pyroglutamat wird durch Glutaminylcyclasen (Fischer und Spiess, 1987) und die C-terminale Amidierung durch eine Peptidylglycin- $\alpha$ -amidierende Monooxygenase katalysiert (Bradbury *et al.*, 1982).

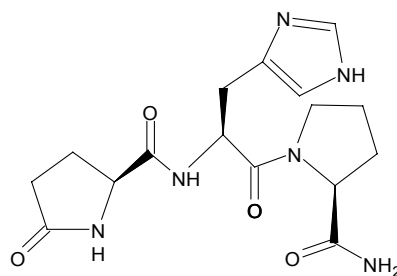


Abbildung 1.2: pyroGlu-His-ProNH<sub>2</sub>.

## TRH-Rezeptoren

Die Anwesenheit stereospezifischer, hochaffiner Bindungsstellen für TRH konnte trotz dessen weitläufiger Verteilung zunächst nur für wenige Organe wie Hypophyse (Grant *et al.*, 1973), Gehirn (Burt und Snyder, 1975), Retina (Burt, 1979) und Rückenmark (Prasad und Edwards, 1984) gezeigt werden. Die Isolation eines TRH-Rezeptors war mit biochemischen Standardmethoden in natürlichen Geweben nicht möglich (Johnson *et al.*, 1989).

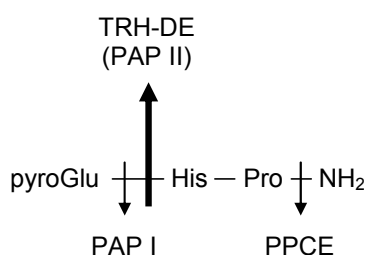
In der Arbeitsgruppe von Gershengorn gelang es erstmalig den **TRH-R1** Rezeptor aus TSH produzierenden Hypophysen-Tumorzellen der Maus zu klonieren (Straub *et al.*, 1990). TRH-R1 wurde als ein sieben Membrandomänen umspannender, GTP-Bindungsprotein gekoppelter Rezeptor (GPCR) identifiziert und nachfolgend auch für andere Spezies wie Ratte (de la Pena *et al.*, 1992a; Zhao *et al.*, 1992) und Mensch (Duthie *et al.*, 1993a; Matre *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993) beschrieben. Obwohl die genomische Organisation des Gens in den einzelnen Spezies zum Teil recht unterschiedlich ausfällt, beträgt die Homologie der Nukleinsäuresequenzen zwischen Maus und Mensch im kodierenden Bereich noch 90 % und weist auf die besondere phylogenetische Konservierung des Rezeptors hin. Sowohl in Maus (Duthie *et al.*, 1993b) als auch Ratte (de la Pena *et al.*, 1992b; Satoh *et al.*, 1993) wurden für TRH-R1 zwei alternativ gespleißte Isoformen gefunden, die sich nur hinsichtlich des C-terminalen Endes unterscheiden, aber zwischen Maus und Ratte nicht einheitlich sind.

Die Signaltransduktion erfolgt über den Phosphatidylinositolweg und involviert die G-Proteine  $G_q$  und  $G_{11}$  (Aragay *et al.*, 1992; Hsieh und Martin, 1992). Dabei entstehen Inositol-1-4-5-triphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerin (DAG). IP3 bewirkt eine rasche, transiente Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Zusammen mit DAG führt dies zur Aktivierung von Proteinkinase C und damit zu der Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle, die ihrerseits einen Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  ermöglichen und die  $Ca^{2+}$ -Konzentration langanhaltend in der Zelle erhöhen. In hormonproduzierenden Zellen der Hypophyse führt dies zur Exocytose der vesikulär gespeicherten Hormone (Fomina und Levitan, 1995; Nelson und Hinkle, 1994).

Ein zweiter Rezeptor, **TRH-R2**, der bei Säugern bisher nur in Maus und Ratte (Cao *et al.*, 1998; Itadani *et al.*, 1998) nachgewiesen werden konnte, ist auf Aminosäureebene mit TRH-R1 zu 51 % identisch und zeigt eine vergleichbare Bindungsaffinität gegenüber TRH (O'Dowd *et al.*, 2000). *In situ* histochemische Analysen beider Rezeptoren im Gehirn ließen eine deutlich von einander unterscheidbare, komplementäre Verteilung erkennen (O'Dowd *et al.*, 2000; Heuer *et al.*, 2000).

### TRH-abbauende Enzyme

Spezifische Enzyme, die auf TRH einwirken, lassen sich in Gehirn, Rückenmark, Hypophyse, Leber, Pankreas, Niere, Nebenniere und im Blut nachweisen. Insgesamt drei Enzyme sind in der Lage TRH zu degradieren: Während das postprolyl-spaltende Enzym (*PPCE*) die deamidierte freie Säure TRH-OH entstehen läßt, erzeugen die beiden Pyroglutamyl-Aminopeptidasen (*PAP*) I und II das stabile, zyklisierte Abbauprodukt His-Pro-Diketopiperazin (Yanagisawa *et al.*, 1980). Die Abbauwege sind in Abbildung 1.3 schematisch wiedergegeben. Im ZNS sind hauptsächlich die lösliche *PAP* I und die Membran-gebundene *PAP* II Aktivität für die Metabolisierung von TRH verantwortlich (Übersichtsartikel: Kelly, 1995).



**Abbildung 1.3:** Inaktivierung von TRH durch die TRH-abbauenden Enzyme.

Die Prolyl-Endopeptidase *PPCE* (EC 3.4.21.26) ist eine lösliche cytosolische Serin-Protease, die an der Carboxyseite des TRH-Prolinrestes spaltet (Walter, 1976; Hersh und McKelvy, 1979), aber auch *LHRH* (*lutening hormone releasing hormone*), Neurotensin und Substanz P als Substrat akzeptiert. Die Pyroglutamyl-Aminopeptidase *PAP* I (EC 3.4.19.3) ist eine lösliche, cytoplasmatische Cystein-Protease, die den N-terminalen pyroGlu-Rest von TRH entfernt (Browne und O'Cuinn, 1983; Horsthemke *et al.*, 1984), aber wie *PPCE* auch andere Peptide (*LHRH*, Neurotensin und Bombesin) spaltet. Beide Enzyme kommen in vielen Geweben gemeinsam vor. Dahingegen zeigt das Ektoenzym *PAP* II (EC 3.4.19.6) eine weitaus größere Substratspezifität (O'Connor und O'Cuinn, 1984; Garat *et al.*, 1985). Mit *PAP* I hat es nur gemeinsam, daß es ebenfalls den pyroGlu-Rest von TRH entfernt. Bei *PAP* II, das aufgrund der hohen Spezifität auch als **TRH-DE** (*TRH degrading ectoenzyme*) bezeichnet wird, handelt es sich um ein Typ II Transmembranprotein mit einem für Zink-Metalloproteasen charakteristischem Sequenzmotiv (HXXCH) im extrazellulär gelegenen C-terminalen Teil.

*TRH-DE* konnte in synaptosomalen Fraktionen aus dem ZNS, in adenohipophysären Plasmamembranen sowie in partikulären Fraktionen aus Leber und Serum nachgewiesen werden (O'Connor und O'Cuinn, 1984; Bauer, 1988). Die Aktivität von *TRH-DE* konnte nur auf

Neuronen und nicht in Gliazellen gezeigt werden (Bauer *et al.*, 1990). Im Gegensatz zum Gehirn wird die Expression von TRH-DE in Rattenhypophysen stringent durch Schilddrüsenhormone kontrolliert (Bauer, 1987). TRH-DE und TRH Rezeptor 1 werden dabei spiegelbildlich reguliert (Schomburg und Bauer, 1995). Während die mRNA-Konzentration von TRH-DE bei Gabe von T<sub>3</sub> in der Adenohypophyse ansteigt, nimmt die mRNA-Konzentration des Rezeptors in diesem Gewebe ab. Estradiol wirkt dabei dem Effekt von T<sub>3</sub> entgegen (Schomburg und Bauer, 1997). Zusätzlich wird TRH im Serum (Halbwertszeit von ca. fünf Minuten) und in vielen peripheren Organen durch eine lösliche Serumform dieses Enzyms inaktiviert (Scanlon *et al.*, 1996), das in der Leber proteolytisch aus dem Membran-gebundenem Ektoenzym hervorgeht (Schmitmeier *et al.*, 2002).

### **TRH in der hypothalamo-hypophysären Achse**

Neben seiner namensgebenden TSH freisetzenden Wirkung ist TRH in der Hypophyse auch ein starkes Sekretagog für Prolaktin (Bowers *et al.*, 1971) und kann unter pathophysiologischen Bedingungen (insbesondere Akromegalie) die Ausschüttung von Wachstumshormon (Winkler *et al.*, 1987) stimulieren.

### **TRH im Zentralnervensystem**

Obwohl der Hypothalamus die höchste TRH-Konzentration aufweist, sind über 70% des TRH-Gesamtgehaltes extrahypothalamisch zu finden (Jackson, 1982). Das Vorkommen von TRH in vielen Gehirnbereichen außerhalb des Hypothalamus unterstreicht die potentielle Rolle von TRH als Neuromodulator und/oder -transmitter neben der hypophysiotropen Funktion (Metcalf, 1974; Hokfelt *et al.*, 1975; Hedner *et al.*, 1981; Griffiths, 1985). Beispielsweise wird eine Beteiligung von TRH auch bei der Modulation spastischer Anfälle impliziert (Kubek *et al.*, 1989). Darüber hinaus wird TRH eine ganze Reihe pharmakologischer und verhaltensbiologischer Effekte zugeschrieben, die zum größten Teil zentralnervös ausgelöst werden. In der Funktion eines Neurotransmitters kann TRH außerhalb des Neurons allerdings effektiv nur durch ein Ektoenzym an der Zelloberfläche oder aber nach Endocytose in den Lysosomen abgebaut werden. Die physiologische Bedeutung der cytosolischen Enzyme PAP I und PPCE ist daher im Bezug auf das TRH-Signalsystem im Gehirn und Rückenmark völlig unklar. TRH-DE kommt als einziges TRH-abbauendes Enzym für die Hydrolyse des synaptisch ausgeschütteten Tripeptids in Frage und kann daher innerhalb des zentralen Nervensystems als Terminator für das TRH-Signal angesehen werden.



## TRH außerhalb des Zentralnervensystems

TRH wurde außerhalb des ZNS in der Retina, im gastrointestinalen Trakt, im Pankreas, in den Ovarien und Testikeln, in der Prostata und in der Plazenta gefunden (Lechan *et al.*, 1993).

Auffällig unter den TRH-beinhaltenen Geweben sind die gastrointestinalen Organe mit Magen, Zwölffinger-, Dünn-, Dick- und Enddarm (Morley, 1979), in denen TRH durch periphere Effekte die gastrointestinale Kontraktilität modulieren kann. Auch der Pankreas ist eine reichhaltige Quelle für TRH. In Neugeborenen stammt ein bedeutender Teil des zirkulierenden TRHs vom Pankreas (Jackson, 1982). Die mRNA von präproTRH wird von den  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Inseln gebildet (Leduque *et al.*, 1989; Dutour *et al.*, 1989). TRH und Somatostatin zeigen gegensätzliche Effekte im Zusammenhang mit der Glukagonsekretion (Lamberton *et al.*, 1985). In hoher Konzentration ist TRH im Urogenitalsystem vorhanden. TRH findet sich in der ventralen Prostata, den Leydigzellen, der Ependidymis und in den Samenvesikeln (Pekary *et al.*, 1987; Montagne *et al.*, 1996). Darüberhinaus findet es sich auch in der Plazenta, der Amnionflüssigkeit und in der Brustmilch (Morley, 1979; Shambaugh, III *et al.*, 1979). In den reproduktiven Geweben dient TRH vermutlich ebenfalls als parakriner Regulator.

## 1.5 Extrahypophysiotrope Wirkung von TRH im ZNS

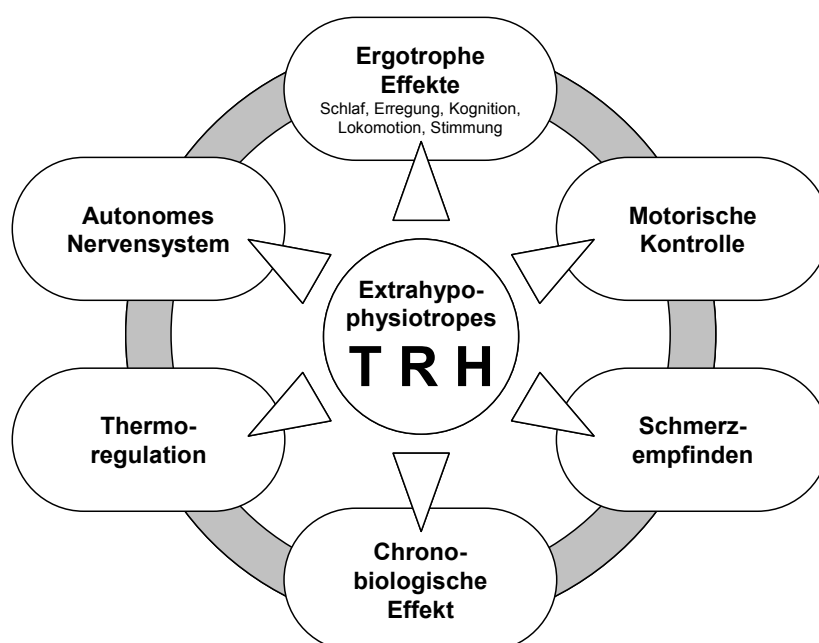


Abbildung 1.4: Wirkungskreis von extrahypophysiotropem TRH im ZNS (verändert nach Nilni *et al.*, 1996).

### **Ergotrophe Effekte**

Außerhalb der HPT-Achse ist der Einfluß von TRH für eine Reihe physiologischer Prozesse beschrieben worden. Aufgrund der allgemein ZNS aktivierenden Eigenschaft wird TRH von einigen auch als eine endogene ergotrophe Substanz bezeichnet (Metcalf und Dettmar, 1981). Die Infusion von TRH zeigte in Tieren auf verschiedene Weise anregende Wirkungen (Reichlin, 1986). Diese Aktivierung wird durch Effekte reflektiert, die den gesamten Organismus betreffen und sich auf Schlaf, Erregung, kognitive Leistung, lokomotorische Aktivität und auf die Stimmung auswirken (Horita, 1998).

### **Schlaf und Erregung**

Systemisch (Arnold *et al.*, 1991; Nishino *et al.*, 1997) und zentral (Koivusalo und Leppaluoto, 1979) steigert TRH die Wachzeit und/oder vermindert die Schlafzeit in mehreren Spezies. Wesentlich dramatischer ist jedoch die Fähigkeit von TRH, Tiere aus der Narkose zu erwecken, die durch Alkohol (Breese *et al.*, 1974; French *et al.*, 1993),  $\beta$ -Endorphin (Tache *et al.*, 1977), Tetrahydrocannabinol (Bhargava, 1980), Benzodiazepin (Glue *et al.*, 1992) und Barbiturate (Sharp *et al.*, 1984; Hashimoto *et al.*, 1993) induziert wurde. Wird anti-TRH Antiserum intracerebroventrikulär (icv) verabreicht, verdoppelt sich die anästhetisch-induzierte Schlafzeit. Bei Ratten, die sich von der sedierenden Wirkung des Alkohols erholen, erhöhen sich die TRH Konzentrationen im medialen Septum (Morzorati und Kubek, 1993). TRH verstärkt dabei die cholinerge Aktivität im septo-hippocampalen System (Kalivas *et al.*, 1981). Um die analeptische Wirkung von TRH zu unterbinden, muß sowohl der Neurotransmitter Acetylcholin als auch Noradrenalin blockiert werden (French *et al.*, 1993; Santori *et al.*, 1981).

### **Kognitive Leistung**

Die ergotropen Effekte von TRH auf das Bewusstsein und die Erregung gehen mit der Beobachtung einher, daß Verbesserungen im Bereich des Lernens und der Erinnerung gemessen werden können. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Rolle von Acetylcholin in beiden Prozessen (Bennett *et al.*, 1997). Die Effekte werden dabei größtenteils über eine gesteigerte Ausschüttung von Acetylcholin im Cortex (bei TRH-Infusion in den Meynert'schen Ncl. Basalis) und im Hippocampus (bei TRH Infusion in das mediale Septum) vermittelt (Itoh *et al.*, 1994). Die verbesserte Ausschüttung von Noradrenalin (Ogasawara *et al.*, 1996) und eine Aktivierung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren (Kasparov und Chizh, 1992) wird ebenfalls mit der durch TRH gesteigerten kognitiven Leistung in Verbindung gebracht.

### ***Lokomotorische Aktivität***

TRH antagonisiert die lokomotorische Depression, die durch Alkohol induziert werden kann (McCown und Breese, 1989). Die lokomotorische Aktivierung durch TRH wird vornehmlich von Dopamin vermittelt. Wiederholte Behandlung (icv) von Ratten mit TRH erhöht die Konzentration von Dopamin im cerebralen Cortex und steigert die Aktivität der Tyrosinhydroxylase im Hirnstamm. Diese Effekte korrelieren mit der Dosis- und Zeit-abhängigen Zunahme an lokomotorischer Aktivität (Agarwal *et al.*, 1976).

### ***Antidepressiver Effekt***

In verschiedenen Verhaltensstudien, die potentielle pharmakologische Substanzen auf ihre antidepressive Wirksamkeit untersuchten, wurde TRH positiv getestet (Nemeroff *et al.*, 1984). Die Verbesserung war dabei unabhängig von TSH- oder Schilddrüsenhormon-vermittelten Effekten. Jedoch konnte in Ratten die Wirkung bestimmter Antidepressiva in einem dafür geeigneten Schwimmtest gleichermaßen durch Gabe von TRH und Prolaktin potenziert werden (Drago *et al.*, 1990). In einem neueren Modell wird spekuliert, daß sich klinische Depression aus pathologisch übersteuerten Schaltkreisen des limbischen Vorderhirns ergibt, die nicht länger der inhibitorischen Kontrolle von TRH unterliegen (Sattin, 1998).

### ***Autonomes Nervensystem***

Die Verteilung von TRH im Hirnstamm stützt die Annahme, daß TRH bedeutend an der Funktion des autonomen Nervensystems beteiligt ist. Weit mehr als die Hälfte an TRH in der Medulla der Ratte ist im *Ncl. tractus solitarius* (NTS), *Ncl. intercalatus* und *commissuralis*, im dorsalen Motornukleus des Vagus (DMN) und im geringeren Maße auch im *Ncl. ambiguus* mit Neuronen des dorsalen Vagus-Komplexes (DVC) assoziiert (Kubek *et al.*, 1983). Während sich die Injektion von TRH in den DMN auf die dortigen Neuronen einheitlich exzitatorisch auswirkt, wirkt TRH in den NTS appliziert auf dessen Neuronen inhibitorisch (McCann *et al.*, 1989). Der größte Teil der TRH-Immunoreaktivität stammt von Fasern, die den DVC aus den Raphekernen der Medulla erreichen (M Palkovits 1986). Dennoch wird im DMN auch endogenes TRH exprimiert (Segerson *et al.*, 1987a). TRH-immunoreaktive Neuronen projizieren aus der ventralen Medulla bis in die intermediolaterale Zellsäule des Rückenmarks (Helke *et al.*, 1986). Fasern und Endigungen dieses bulbospinalen Trakts sind präganglionären sympathischen Neuronen dicht angelagert. In einem Großteil dieser Neuronen liegt TRH gemeinsam mit Serotonin (5-HT) vor .

### ***Gastrointestinale Funktion***

TRH inhibiert die Aufnahme von Nahrung und Wasser. Die hohen Konzentrationen von TRH im ventromedialen Hypothalamus (Winokur und Utiger, 1974; Brownstein *et al.*, 1974), einem für die Nahrungsaufnahme wichtigen Zentrum (Flier und Foster, 1997), und die Interaktion von TRH mit Neuropeptid Y und Noradrenalin, die beide wichtig für das Freßverhalten sind (Lechan und Kakucska, 1992), stehen damit im Einklang. Des Weiteren stimuliert TRH die Sekretion von Magensäure unabhängig von hypophysiotropen Effekten oder Effekten von Gastrin (Tache *et al.*, 1985; Szirtes *et al.*, 1984). Hierbei wird die stärkste Reaktion bei direkter Injektion von TRH in den DVC ausgelöst (Stephens *et al.*, 1988). Die intracerebrale Gabe von TRH regt in den meisten Spezies Magenkontraktionen und -entleerung an (Garrick *et al.*, 1987; LaHann und Horita, 1982). In Ratten stimuliert so verabreichtes TRH die Darmmotilität (Smith *et al.*, 1977).

### ***Pankreas***

TRH vermittelt zentrale Effekte auf die Sekretion des Pankreas. In die Cerebrospinalflüssigkeit gegeben oder direkt in den DVC injiziert, stimuliert TRH über den vagalen Abgang den exokrinen Umsatz, Protein- und Bicarbonatsekretion (Messmer *et al.*, 1993; Okumura *et al.*, 1995).

### ***Cardiovaskuläre Funktion***

TRH moduliert den Blutdruck durch kombinierte sympathische und parasympathische Effekte (Koskinen, 1989; Shinozuka *et al.*, 1997; Okuda *et al.*, 1987). Intracerebroventrikuläre Applikation von TRH in Ratten erhöht deren Blutdruck und Herzschlag deutlich. Für diese Effekte wurden die dorsalen Raphekerne verantwortlich gemacht. Vieles weist darauf hin, daß der neuroanatomische Pfad für die cardiovaskulären Effekte von TRH durch den absteigenden bulbospinalen Trakt, der in der intermediolateralen Zellsäule des Rückenmarks mit präganglionären sympathischen Neuronen in Kontakt steht, realisiert wird (Mattila und Bunag, 1990).

### ***Atmung***

Es gibt anatomische Hinweise dafür, daß TRH auch in der Kontrolle der Atmung eine Rolle spielt. Bötzinger Neuronen in der Medulla, die Motoneuronen des Atmungssystems inhibieren, gehen enge Kontakte mit TRH-immunoreaktiven Boutons ein (Sun *et al.*, 1996). Wird TRH in den Prä-Bötzinger Komplex von Medullaschnitten aus neonatalen Ratten injiziert, steigt die respiratorische Entladungsfrequenz (Greer *et al.*, 1996). TRH-immunoreaktive Boutons können auch in der Nähe von Motoneuronen des *Ncl. ambiguus* identifiziert werden, die eine rhythmische Fluktuation von Entladungen des Zwerchfellnervs zeigen (Sun *et al.*, 1995).

Entwicklungsstudien deuten auf einen direkten Effekt von TRH auf hypoglossale Motoneuronen in der caudalen Medulla. Diese Neuronen innervieren Zungenmuskel, die für die Kontrolle des Luftweges beim Einatmen kritisch sind, und zeigen eine mit der Atmung korrelierte Aktivität (Bayliss *et al.*, 1997).

### **Motorische Kontrolle**

Projektionen aus den TRH exprimierenden Raphekernen sorgen für eine dichte Innervierung der Motoneuronen des Rückenmarks und sind daher wahrscheinlich in der Lage die motorische Erregbarkeit proximaler Muskelgruppen zu verstärken (White, 1985; Hultborn und Kiehn, 1992). In der Ratte werden die höchsten TRH Konzentrationen im ventralen Horn des Rückenmarks gefunden (Kardon *et al.*, 1977). Entsprechende Rezeptoren können in Schichten, die  $\alpha$ -Motoneuronen enthalten, lokalisiert werden (Manaker *et al.*, 1985). Die Funktion von TRH scheint allerdings bei sich entwickelnden Tieren oder bei Verletzung der  $\alpha$ -Motoneuronen bedeutsamer zu sein als im gesunden adulten Tier (White *et al.*, 1989). In Mausmodellen für die Degeneration der Motoneuronen im Rückenmark wurde ein erhöhter TRH Metabolismus an den Orten der Verletzung beschrieben (Court JA *et al.*, 1987). In vorklinischen Studien wurde des Weiteren eine günstige Wirkung von TRH auf die *Rolling Mouse Nagoya*, ein Mausmodell für Ataxie, beobachtet. Auch in anderen Mausmodellen für Ataxie (*staggerer*, *reeler* und *weaver*) sowie in Mäusen mit einer Degeneration der Purkinjezellen im Cerebellum konnte eine wesentliche Verbesserung in entsprechenden Verhaltenstest durch Gabe von TRH erzielt werden (Mano *et al.*, 1986; Matsui *et al.*, 1994).

### **Thermoregulation**

TRH spielt eine wichtige Rolle in der Integration verschiedener thermogener Antworten auf Kälte (Arancibia *et al.*, 1996). Die Injektion von TRH in das ZNS erhöht die Körpertemperatur (Boschi und Rips, 1981) und TRH antagonisiert die hypothermen Effekte zahlreicher Stoffe wie Barbiturate, Ethanol, Chlorpromazine, Bombesin, Neurotensin und  $\beta$ -Endorphin (Horita *et al.*, 1986). Die Injektion von TRH in den präoptischen hypothalamischen Nucleus inhibiert Hitze-sensitive Neuronen und aktiviert Kälte-sensitive Neuronen (Hori *et al.*, 1988). Diese Effekte erfordern eine intakte Neurotransmission durch Catecholamine (Chi und Lin, 1983). Eine Kälte-induzierte Zunahme der mRNA von präproTRH kann sowohl im DMN als auch in den Raphekernen beobachtet werden, die sensorische Information von der Haut erhalten und zu präganglionären sympathischen Neuronen projizieren. Kälte erhöht darüber hinaus auch die Transkription und Sekretion von TRH im PVN und führt zu einer Aktivierung der HPT-Achse und einer gesteigerten Thermogenese in braunem Fettgewebe.

## **Schmerzempfinden**

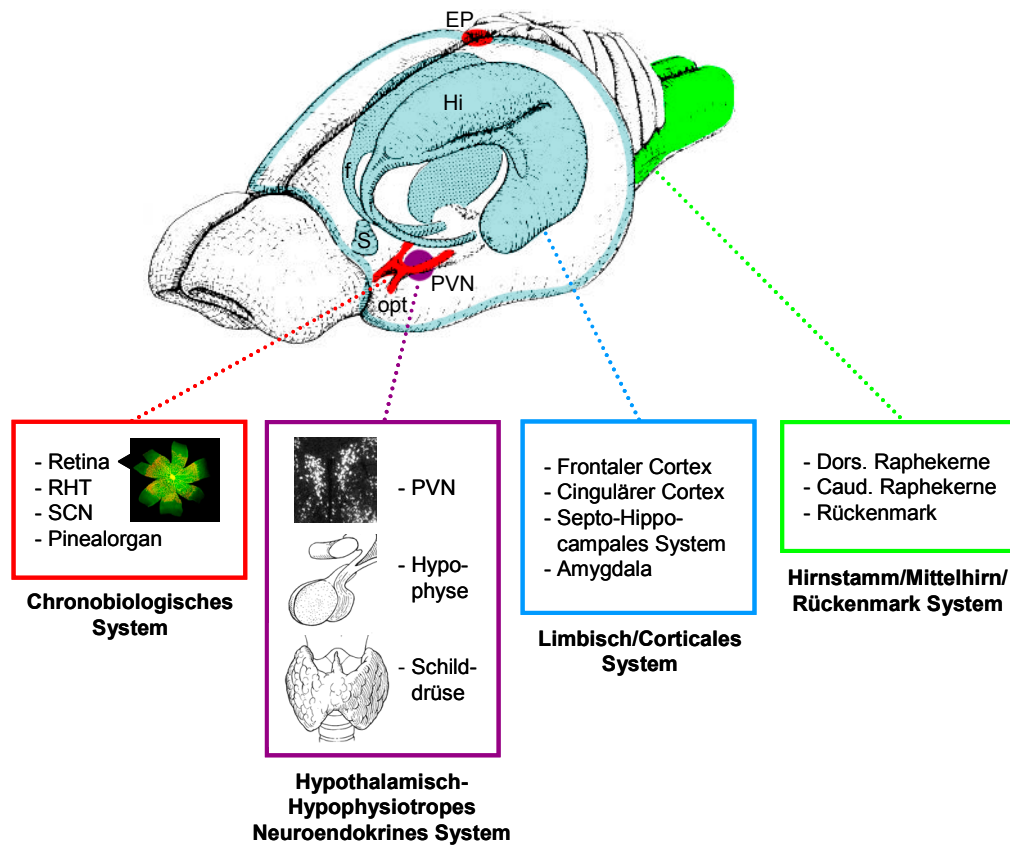
Die Anwesenheit von TRH und TRH-Rezeptoren im periaquäduktalen Grau des Mittelhirns (PAG), in den Raphekernen und in begrenztem Ausmaß auch im dorsalen Horn des Rückenmarks deutet auf eine Beteiligung von TRH in der Schmerzmodulation hin. Das PAG spielt für die Integration der Schmerzwahrnehmung und die entsprechende Verhaltensantwort eine kritische Rolle (Bandler und Shipley, 1994). Eine antinozizeptive Wirkung von TRH wurde in Mäusen und Ratten für verschiedenen Schmerzstimuli beschrieben (Cuenca *et al.*, 1978; Boschi *et al.*, 1983; Reny-Palasse *et al.*, 1989). Im Allgemeinen ist die antinozizeptive Wirkung von TRH sehr kurzlebig und dauert oft nicht länger als 15 Minuten (Brewster, 1983).

## **Chronobiologische Effekte**

Im suprachiasmatischen Nucleus (SCN), dem zentralen zirkadianen Schrittmacher, lassen sich sowohl TRH als auch TRH-Rezeptoren nachweisen (Manaker *et al.*, 1985). In Hamstern, die konstant unter schwacher Beleuchtung gehalten wurden, konnte gezeigt werden, daß die Mikroinjektion von TRH in den SCN während des subjektiven Tages im circadianen Muster der Laufradaktivität eine Phasenverschiebung bewirkt (Gary *et al.*, 1996). Auch in der Retina von Ratten und Menschen (Schaeffer *et al.*, 1977; Martino *et al.*, 1980) wurde TRH nachgewiesen. In Ratten wurde demonstriert, daß der TRH-Gehalt in der Retina durch Licht verändert wird (Schaeffer *et al.*, 1977).

## ***1.6 TRH als homöostatischer Modulator***

Die zahlreichen physiologischen und verhaltensbiologischen Effekte, die für TRH beschrieben wurden, sind nicht in allen Fällen einheitlich und lassen nach der Gabe von TRH eine große Variabilität von beobachtbaren Ergebnissen zu. Dadurch wird impliziert, daß der Effekt von TRH abhängig vom Zustand des Organismus zum Zeitpunkt der Verabreichung ist. Dies stützt die Auffassung, daß neuronale TRHerge Systeme einer breiten, homöostatischen Modulatorfunktion des ZNS dienen (Gary *et al.*, 2003). Vier große Systeme, die funktionell integriert an der Homöostase des Organismus beteiligt sind, können dabei anatomisch voneinander unterschieden werden: das hypothalamisch-hypophysiotrope neuroendokrine System, das Hirnstamm/Mittelhirn/Rückenmark System, das limbisch corticale System und das chronobiologische System. Die postulierte globale Funktion von TRH, zentralnervöse Aktivitäten zu modulieren und zu normalisieren, ist ein wichtiges Konzept, um für die Nutzung des pharmakologischen Potentials dieser Substanz den richtigen Ansatz zu wählen.



**Abbildung 1.5: TRH moduliert die Homöostase in vier verschiedenen, funktionell integrierten Systemen.**

Verändert nach (Gary *et al.*, 2003). Die drei-dimensionale Darstellung des Rattenhirns (Amaral und Witter, 1989) zeigt stellvertretend für das limbisch/corticale System die räumliche Organisation des Septo-Hippocampalen Systems (blau). Orientierungspunkte für die drei weiteren Systeme, in denen der Einfluß von TRH beschrieben wurde, sind ebenfalls farblich hervorgehoben. In Rot ist stellvertretend für das chronobiologische System die Position des Pinealorgans und des optischen Chiasmata gekennzeichnet. Der über dem Chiasma gelegene suprachiasmatische Nucleus steht über den retino-hypothalamischen Trakt mit der Retina in Verbindung und sendet unter anderem Licht- und circadiane Information an die Epiphyse. Der paraventriculäre Nucleus ist in Lila eingezeichnet und markiert das hypothalamisch-hypophysiotrope neuroendokrine System. Das Hirnstamm/Mittelhirn/Rückenmark System ist in Grün angedeutet. Die wichtigsten Komponenten des jeweiligen Systems sind in den Übersichtsboxen wiedergegeben. **Abkürzungen:** EP, Epiphyse (Pinealorgan); f, Fornix; Hi, Hippocampus; opt, optischer Nerv; PVN, paraventriculärer Nucleus; RHT, Retino-Hypothalamischer Trakt; S, Septum (medial); SCN, Suprachiasmatischer Nucleus.

## **1.7 Zielsetzung**

Die Pyroglutamyl-Peptidase TRH-DE, ein Typ II Transmembranprotein aus der Familie der Zink-Metalloproteasen, ist die einzige extrazellulär lokalisierte Peptidase, die in der Lage ist, TRH zu hydrolysieren und dessen Signalwirkung im Gehirn und auf der Hypophyse zu terminieren. Von allen pyroGlu-enthaltenden, physiologisch aktiven Verbindungen wird allein TRH als Substrat von TRH-DE akzeptiert. Diese außergewöhnlich hohe Substratspezifität bietet die Möglichkeit, durch eine biochemische oder genetische Inaktivierung von TRH-DE gezielt in das TRH-System einzugreifen. Da das TRH-Signalsystem auch von medizinischem Interesse ist, bestehen bereits Bemühungen, pharmakologisch nutzbare Inhibitoren für TRH-DE zu entwickeln. Die Herstellung einer TRH-DE defizienten Maus ist in diesem Zusammenhang ein konsequenter Schritt, der es erlaubt, die regulatorische Bedeutung von TRH-DE im Bezug auf die breite Wirkungsvielfalt von TRH zu studieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Konzeption, Erstellung und Analyse einer TRH-DE defizienten Mausmutante. Anstelle von TRH-DE sollte eine Reporter-kassette unter die Kontrolle des endogenen Promotors gebracht werden. Eine Reporterkombination aus bakterieller  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) und humaner plazentarer alkalischer Phosphatase (PLAP) sollte dabei sowohl die Lokalisierung von Zellkörpern (*lacZ*) als auch von Zellfortsätzen und neuronalen Projektionen (PLAP) ermöglichen. Die Aktivität des TRH-DE Promotors sollte durch den enzymatischen Nachweis beider Reporter im Verlauf der Embryogenese und im adulten Gehirn dargestellt werden.

Mit besonderem Blick auf TRH in der Funktion eines hypophysiotropen *releasing*-Faktors, der neben seiner namensgebenden Wirkung auf TSH auch eine stark sekretagoge Wirkung auf Prolaktin ausübt, sollten in TRH-DE defizienten Mäusen Veränderungen in der hypothalamisch-hypophysären Achse und im Schilddrüsenhormonstatus untersucht werden.

Um Hinweise auf die vielfältigen extrahypophysiotropen ergotropen bzw. chronobiologischen Funktionen von TRH zu erhalten, sollten Verhaltensauffälligkeiten der TRH-DE defizienten Mäuse in circadianen Laufradexperimenten charakterisiert werden.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Knock-out Technologie

Seit der Entwicklung der embryonalen Stammzell (ES-Zell) Technologie in den frühen 80er Jahren und der Generation der ersten *Knock-out* Maus vor mehr als 16 Jahren dient die Möglichkeit, Mäuse genetisch gezielt zu verändern als ein unschätzbare Werkzeug bei dem Versuch, die Funktion individueller Komponenten komplexer biologischer Systeme herauszuarbeiten.

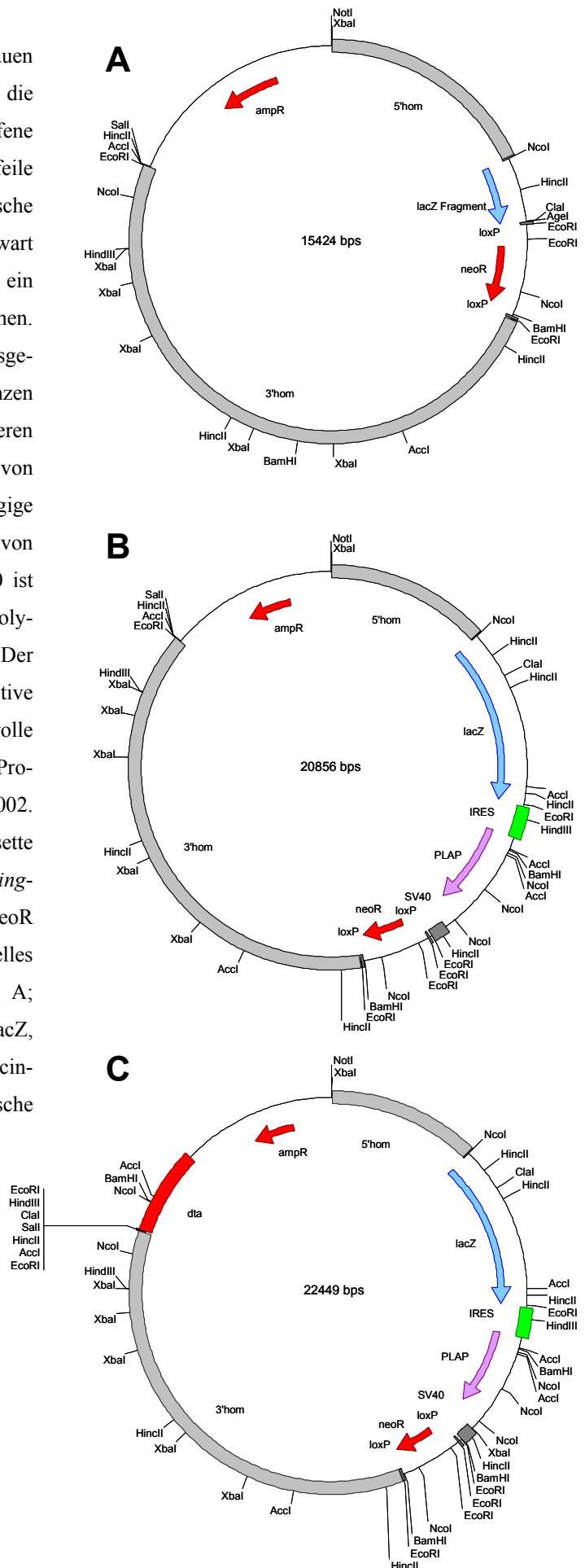
#### Klonierung des *Targeting*-Vektors

In einer BAC-Bibliothek des Mausgenoms (Genome Systems Inc., St. Louis), die aus partiell mit *HindIII* geschnittener DNA von RW4 Zellen (129/SvJ) hergestellt wurde, lagen genomische Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 120 kb in einem artifiziellen bakteriellen Chromosom (pBeloBAC11) vor. Mit einer spezifischen murinen cDNA-Sonde wurden fünf BAC-Klone, die das erste Exon des TRH-DE Gens beinhalten, isoliert und mit molekularbiologischen Standardtechniken detailliert charakterisiert. Im Startkodon für das TRH-DE Gen wurde dabei eine für die Klonierungsstrategie nützliche *NcoI* Schnittstelle identifiziert. Aus einem der fünf BAC-Klone (BAC7) ließ sich sowohl ein 5803 bp großes *BamHI-HindIII* Fragment in pBluescriptII [KS<sup>+</sup>] (Stratagene Europa) als auch ein 9599 bp großes *NcoI-EcoRI* Fragment in pGEM-T<sup>easy</sup> (Promega) subklonieren. Das 5803 bp große Fragment umfaßte 5-Strich des ersten Exons gelegene Bereiche und wurde als pBS-BAC7[BamHI-HindIII] bezeichnet. Das 9599 bp große Fragment umfaßte 3-Strich des ersten Exons gelegene Bereiche und wurde als pGEM-BAC7[NcoI-EcoRI] bezeichnet. Das Plasmid pBS-BAC7 wurde mit *XbaI* geschnitten und der Vektor durch Ligation wieder geschlossen. Dadurch wurde ein genomischer Bereich in unmittelbarer Nähe (10 bp) der 5-Strich gelegenen *BamHI* Schnittstelle eliminiert und das Plasmid pBS-5'hom erzeugt. Das freigesetzte 1462 bp *XbaI* Fragment wurde in pBluescript subkloniert und stellte die Basis für die externe 5-Strich Sonde (pBS-5'Sonde). Der religierte Vektor pBS-5'hom verfügte nun über 2766 bp genomische Homologie vom 5-Strich Ende bis zur *NcoI* Schnittstelle im ersten Exon des TRH-DE Gens. Aus dem Vektor pGNA (Le *et al.*, 1990) wurde ein *BamHI-EcoRI* lacZ-Fragment in pBluescript umkloniert. Daraus wurde dann ein kurzes *XbaI-BamHI* Fragment entfernt und durch ein synthetisches Fragment aus den Oligos A-lacZ-*NcoI* und B-lacZ-*NcoI* ersetzt. Hierdurch wurde ein geeignetes Startkodon mit *NcoI* Schnittstelle vor das lacZ-Fragment eingeführt und die dahinter gelegene *BamHI* Schnittstelle

eliminiert. Anschließend konnte die lacZ-Komponente als ein *NcoI-EcoRI* lacZ-Fragment in pBS-5'hom einkloniert werden (pBS-5'hom lacZ). Dieses Plasmid wurde mit *ClaI-EcoRI* geschnitten und um ein 7663 bp großes *ClaI-EcoRI* Fragment (3-Strich Homologie) aus pGEM-BAC7 erweitert. Dabei ging allerdings ein bedeutender 3-Strich Bereich der lacZ-Komponente verloren. Der Vektor wurde mit *ClaI* erneut geöffnet und es wurde eine von loxP Sequenzen flankierte Neomycinresistenz-Kassette aus pNeoflox8 [ $\Delta$ XbaI  $\Delta$ NotI  $\Delta$ SacI +AccI +AgeI] als ein *ClaI-AccI* Fragment eingefügt. Die Orientierung wurde geprüft und es wurde ein Ligationsprodukt gewählt, in dem die *ClaI* Schnittstelle zwischen dem restlichen 5-Strich Bereich der lacZ-Komponente und dem Neomycinresistenzgen erhalten blieb. Dieser Vektor verfügte zwar über keinen funktionalen Reporter, hätte aber durchaus nach homologer Rekombination in ES-Zellen die Aktivität des TRH-DE Gens unterbrechen können. Der Vektor enthielt die für die gezielte Rekombination benötigten Homologien und den Selektionsmarker (Neomycinresistenz) und wurde pJM2002 bezeichnet (Abb. 1 A).

Für die Erstellung einer geeigneten Reporter-Kassette, wurde ein *EcoRI* Fragment aus pGT0TMpfs (Leighton *et al.*, 2001) in den Vektor pIND-lacZ (Invitrogen) kloniert, um die Komponenten IRES und PLAP in Leserichtung 3-Strich von dem darin enthaltenen lacZ Gen zu positionieren. Die richtige Orientierung dieser Klonierung wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Der resultierende Vektor wurde mit *NotI* geschnitten und dessen Enden mit Hilfe der Klenow-Auffüllreaktion stumpf gemacht. Anschließend wurde nach der Restriktion mit *ClaI* ein 5064 bp großes Fragment erhalten, das in pJM2002 einkloniert werden konnte, um dort die über das IRES-Element verbundenen Reporter lacZ und PLAP im ersten Exon direkt an die Stelle des offenen Leserasters von TRH-DE zu setzen (Abb. 1 B). Der Vektor pJM2002 wurde dazu 3-Strich der *ClaI* Schnittstelle mit *AgeI* geschnitten, durch ein Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend auch mit *ClaI* verdaut. Das erhaltene *Targeting*-Konstrukt wurde über die Schnittstellen *NotI* und *SalI* aus dem pBluescript Plasmidgerüst gelöst und in den Vektor pPGK[neoR lox<sup>2</sup> dta] (Soriano, 1997) umkloniert, um einen darin enthaltenen negativen Selektionsmarker (dta) zu nutzen und eine eventuell störende Homologie der lacZ-Komponente mit dem lacZ- $\alpha$ -Fragment im pBluescript zu vermeiden. Der fertige *Targeting*-Vektor (Abb. 1 C) ließ sich über eine *NotI* Schnittstelle linearisieren und wurde als pTRHDE-KO[5'hom lacZ IRES PLAP neoR lox<sup>2</sup> 3'hom dta] bezeichnet.

**Abbildung 2.1: Targeting-Vektoren.** Mit hellgrauen Kästen wurden genomische Sequenzen für die homologe Rekombination markiert. Offene Leseraster einzelner Gene wurden durch Pfeile dargestellt. Mit loxP wurden zwei palindromische Sequenzen (34 bp) gekennzeichnet, die in Gegenwart von Cre-Rekombinase aus dem Phagen P1 ein gezieltes Rekombinationsereignis vermitteln können. Der loxP-flankierte Bereich wird dabei so ausgeschnitten, daß nur eine der beiden loxP Sequenzen zurückbleibt. IRES bezeichnet eine Sequenz, deren Tertiärstruktur in der mRNA das Rekrutieren von ribosomalen Untereinheiten für eine cap-unabhängige Translation erlaubt und damit die Expression von zwei Genen aus einer mRNA ermöglicht. SV40 ist die 3'-UTR eines viralen Gens und liefert die Polyadenylierungssequenz für die Reporter-kassette. Der negative Selektionsmarker *dta* und der positive Selektionsmarker *neoR* stehen unter der Kontrolle eines in Säugerzellen konstitutiv aktiven PGK-Promotors. **A.** Der minimale Targeting-Vektor pJM2002. **B.** Das Targeting-Konstrukt mit Reporter-kassette (pJM2002-Reporter). **C.** Der vollständige Targeting-Vektor pTRHDE-KO[5'hom lacZ IRES PLAP neoR loxP<sup>2</sup> 3'hom *dta*]. **Abkürzungen:** ampR, bakterielles Ampicillinresistenzgen; *dta*, Diphtheria Toxin A; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle; lacZ, bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase; *neoR*, Neomycinresistenzgen; PLAP, humane plazentare alkalische Phosphatase; PGK, humane Phosphoglyceratkinase; SV40, Simian Virus 40; UTR, untranslatierte Region.



### **ES-Zellkultur**

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

Für die ES-Zellkultur wurden E14-Zellen verwendet. Diese stammen vom 129/Ola Inzucht-Stamm und wurden von Dr. A. Berns (Amsterdam) generiert. Die Zellen wurden später von Dr. K. Rajewski, Universität Köln, subkloniert und als E14-1 bezeichnet. 129/Ola ist eine creme-farbene Maus mit hellroten bzw. rosa Augen.

Die Propagierung der ES-Zellen erfolgte auf Gelatine-vorbehandelten Kulturschalen unter Zusatz von LIF (*leukaemia inhibitory factor*, GibcoBRL). Um eine Differenzierung zu verhindern wurden ES-Kulturen, je nach Dichte, spätestens jedoch alle zwei Tage passagiert. Die Trypsin-Behandlung wurde so lange durchgeführt, bis eine Einzelzell-Suspension vorlag. Das Aussäen der Zellen erfolgte in verschiedenen Dichten, um zu vermeiden, daß die Zellen in einer zu hohen (Gefahr der Differenzierung) oder zu niedrigen Dichte (Verminderung der Teilungsgeschwindigkeit) vorlagen.

### **Elektroporation der ES-Zellen**

Für die Elektroporation wurden die ES-Zellen vollständig trypsiniert, kurz mit PBS gewaschen und in PBS in einer Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser II* Elektroporationssystem (Bio-Rad) in 4 mm Küvetten bei 250 Volt und 500  $\mu$ F. Vor der Elektroporation wurde der Zellsuspension 15-20  $\mu$ g linearisierter *Targeting*-Vektor zugesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurden entsprechend Zellen der gleichen Prozedur unterzogen, jedoch ohne vorherige Zugabe des Vektors. Nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen vorsichtig in ES-Zellmedium resuspendiert und auf Gelatine-beschichtete Kulturschalen überführt.

### **Selektion der ES-Zellen**

24 Stunden nach der Elektroporation erfolgte der erste Mediumwechsel und G418 (Neomycin-Selektion) wurde dem Medium zugefügt. Acht Tage nach Beginn der Selektion waren auf der Kontroll-Platte keine lebenden ES-Zellen mehr vorhanden. Auf den Transfektionsplatten ließen sich ES-Zellkolonien erkennen und leicht unter dem Stereomikroskop mit einer ausgezogenen Glaskapillare oder einer Pipettenspitze aufnehmen. Die ES-Zellklumpen wurden anschließend trypsiniert und auf Gelatine-beschichtete 96-Well-Platten überführt. Nach zwei- bis dreitägiger Kultur unter fortbestehendem Selektionsdruck (G418), wurden die Kolonien trypsiniert und auf zwei 96-Well-Platten verteilt. Nach weiteren zwei bis drei Tagen wurde eine Platte nach

entsprechender Vorbehandlung zur Aufbewahrung der Klone eingefroren. Die zweite Platte wurde für eine anschließende DNA-Präparation über mehrere Tage kultiviert.

### **Analyse der isolierten Klone**

Die genomische DNA der isolierten Klone wurde mit Hilfe des Southern Blot Verfahrens untersucht. Die DNA wurde hierfür mit *EcoRI* verdaut. Zur zuverlässigen Differenzierung zwischen homologer Rekombination und zufälliger Integration wurde für die Southern-Hybridisierung eine 5-Strich Sonde außerhalb des entsprechenden rekombinierenden Bereichs benutzt. Positive Klone wurden aufgetaut und erneut für die Gewinnung genomischer DNA propagiert. Eine Kopie dieser Klone wurde wiederum für die spätere Verwendung eingefroren. Die sorgfältige Southern Blot Charakterisierung der DNA erfolgte in vier unterschiedlichen Restriktionsverdauen (*EcoRI*, *BamHI*, *HincII* und *AccI*) mit jeweils vier verschiedenen Sonden (5'-, lacZ-, neo- und 3'-Sonde). Eindeutig positive Klone wurden für die Blastozysten-Injektion verwendet.

### **Gewinnung von Embryonen**

Um eine möglichst große Ausbeute an entwickelten Eizellen zu erhalten, wurde durch Hormongaben der Sexualzyklus der Spendertiere synchronisiert und die Ovulation induziert (Superovulation). Hierzu wurden NMRI-Tiere im Alter von fünf bis acht Wochen verwendet. Die Ovulation erfolgte bei Spenderweibchen nach je einmaliger intraperitonealer Injektion von 7,5 IU PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) und 5 IU hCG (human chorionic Gonadotropin) und anschließender Verpaarung. PMSG wurde 48 Stunden vor der hCG-Gabe jeder Spendermaus injiziert. Dies erfolgte in Abhängigkeit vom Hell/Dunkel-Rhythmus des Tierstalls meist am späten Vormittag. Die Verpaarung erfolgte am Tag der Hormongabe ca. drei Stunden vor Beginn der Nachtphase. Anhand der Vaginalpfropfe war am nächsten Tag erkennbar, ob eine Befruchtung stattgefunden hatte. Je nach Alter konnten unbefruchtete Mäuse nach etwa zwei Wochen erneut superovuliert werden.

Zur Gewinnung von Blastozysten wurde am Tag 3,5 nach der Kopulation der Eileiter mit einem kurzen Uterusstück präpariert und in ein Schälchen mit M2-Medium (Sigma) überführt. Anschließend wurden die Eileiter mit einer Dumont-Pinzette fixiert und mit einer feinen Kanüle (33G, Hamilton) durchspült. Intakte Embryonen von gleichmäßiger Form und Farbe wurden verwendet, der Rest verworfen. Mit Hilfe ausgezogener und abgeschmolzener Glaskapillaren wurden die Embryonen gesammelt und bis zu ihrer Verwendung in Tropfen von M16-Medium (Sigma) mit 4 mg/ml BSA (Sigma, *cell culture tested*) überführt. Diese wurden mit Mineral-Öl (Sigma) überschichtet und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### **Blastozysten-Injektion**

Bei der Blastozysten-Injektion wurden einzelne ES-Zellen mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur in den Blastozoen-Hohlraum von Präimplantations-Blastozysten injiziert. Meist kollabierten die Blastozysten nach der Injektion, regenerierten sich jedoch wieder bei 37 °C in Kultur. Reexpandierte Blastozysten wurden anschließend in den Uterus scheinträchtiger (*Foster*-)Mäuse transferiert.

### **Erzeugung scheinträchtiger Mäuse**

Um einen Embryotransfer durchführen zu können, wurden scheinträchtige Leihmütter (*Foster*-Weibchen) benötigt. Hierfür wurden reproduktiv intakte NMRI-Weibchen mit vasktomierten Männchen verpaart. Ein Transfer von Blastozysten in den Uterus konnte aufgrund der induzierten hormonellen Änderungen erfolgreich nur an Tag 2,5 nach der Kopulation durchgeführt werden.

### **Uterus-Transfer**

Für den Uterus-Transfer wurden entsprechende *Foster*-Mäuse narkotisiert und der Uterus durch vorsichtiges Herausziehen am Fettgewebe des Ovars dargestellt. In das obere Stück des Uterus wurde nun mit einer feinen Nadel (27G) ein Loch gestochen. Durch dieses Loch wurde die Transferkapillare eingeführt. Anschließend wurden bis zu acht Blastozysten in M16-Medium pro Schenkel in den Uterus eingespült. Nach vorsichtiger Repositionierung des Uterus/Ovars wurde das Bauchfell vernäht und das Fell geklammert.

### **Keimbahn-Chimären**

Eine chimäre Maus entsteht durch die Beteiligung von ES-Zellen an der Entwicklung des Spender-Embryos. Besiedeln ES-Zellen hierbei auch die Keimbahn der entstehenden Maus, so spricht man von einer Keimbahn-Chimäre oder vom *Germline-Transmitter*. Um den Grad des Chimarismus zu bestimmen, wurden Fellfarben-Marker verwendet, d.h. der Spender-Embryo hatte hinsichtlich der Fellfarbe einen anderen Genotyp als die ES-Zellen.

In den Chimären resultierte der Beitrag der NMRI-SpenderBlastozyste in einem unpigmentierten Albino-Phänotyp, während an den cremefarbenen Fellpartien dieser Mäuse die Beteiligung der ES-Zellen identifiziert werden konnte. Eine Beteiligung der ES-Zellen an der Keimbahn ließ sich in Tieren mit möglichst scheckiger Fellmarkierung erwarten. Ein hoher Anteil ES-Zell bedingter Fellfärbung war dahingegen kein Garant für eine Keimbahn-Chimäre, sondern zeichnete oft infertile Tiere aus. Dies wird häufig und unabhängig vom eigentlichen KO beobachtet. Wenn der Anteil der kultivierten, eventuell nicht mehr ganz ursprünglichen ES-

Zellen bei der Bildung des Embryos zu hoch ist, reicht der Anteil der Zellen aus der Spenderblastocyste wahrscheinlich nicht aus, um einen korrekten Kontext für alle wichtigen Differenzierungsschritte zu bieten, die für eine spätere Fertilität notwendig sind.

Für die Analyse der Keimbahn-Transmission wurden E14/NMRI-Chimäre mit NMRI-Mäusen verpaart. Unpigmentierte Nachkommen beruhen auf dem NMRI Hintergrund der beteiligten Keimzellen. Wurde der genetische Hintergrund der ES-Zellen vererbt, wurde dies bereits bei der Geburt an der Pigmentierung der Augen ersichtlich. Pigmentierte Nachkommen bekamen später ein stahlgraues Fell. Die Genotypisierung dieser Tiere erfolgte über PCR und wurde für heterozygote Tiere durch Southern-Analytik (siehe ES-Zellklone) bestätigt.

### **Anmerkung**

Bei der Realisierung der TRH-DE *Knock-out* Maus wurde auf die Erfahrung der im eigenen Haus befindlichen Arbeitsgruppe von Dr. M. Leitges zurückgegriffen. Im Rahmen einer bezahlten Auftragsarbeit wurde die ES-Zellkultur gemeinsam von Frau U. Braun und Frau M. Heuer, die Elektroporation der ES-Zellen von Dr. M. Leitges und die Blastozysten-Injektion sowie der Uterus-Transfer von Frau F. Kruse durchgeführt. ES-Zellen, Embryonen-Spendertiere und scheinträchtige Weibchen wurden von der Arbeitsgruppe gestellt. Eine Cre-Deleter Maus (Schwenk *et al.*, 1995) auf C57BL/6-Basis wurde dankenswerter Weise von M. Leitges ebenfalls zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden

### Mauslinien

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden für die Generierung der Chimären und die Propagierung des mutanten Allels insgesamt drei Mausstämme verwendet. Eine genaue Auflistung anatomischer, physiologisch/biochemischer und Verhaltens-Charakteristika befindet sich für 129/svJ und C57BL/6J auf der entsprechenden Referenz-Seite des Jackson Laboratoriums:

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

und für NMRI auf der Seite der Firma Taconic:

<http://www.taconic.com/anmodels/NMRI.htm>

### 129/SvJ

129/svJ Mäuse wurden für die Propagierung des mutanten Allels verwendet. Der genomische Hintergrund ist nahezu isogen mit dem der verwendeten ES-Zellen (E14-1). Der 129er Inzucht-Stamm wurde 1928 durch Kreuzung der englischen Fancier-Maus mit einem Chinchilla-Bestand aus Castle erzeugt. Fast alle Substämme tragen das White-bellied Agouti Gen AW. 129/Sv hat ein Agouti-farbenes Fell mit hellem Bauchfell und pigmentierten Augen. 129/Sv Mäuse haben unterdurchschnittliche Verpaarungseigenschaften mit kleinen Wurfgrößen. Die meisten Zelllinien der embryonalen Stammzellen wurden vom Stamm 129Sv abgeleitet.

### C57BL/6J

C57BL/6J Mäuse wurden für die Propagierung des mutanten Allels verwendet. Ursprung der C57BL-Stämme ist die Verpaarung von Weibchen Nummer 57 mit Männchen 52 (jeweils *Mus musculus domesticus*) aus dem Bestand von Abbie Lathrop durch Little 1921. C57BL/6 wurde vor 1937 von C57BL/10 getrennt und ist der am häufigsten Verwendete aller Inzucht-Stämme. Tiere dieses Stammes haben eine schwarze Fellfarbe und dunkelbraun pigmentierte Augen. Sie zeigen durchschnittliche bis gute Verpaarungseigenschaften bei mittlerer Wurfgröße.

### NMRI

NMRI (Naval Medical Research Institute) Mäuse wurden als Blastozystenspender für die Injektion der ES-Zellen, als Leihmütter für das Austragen der Embryonen und für die Propagierung des mutanten Allels verwendet. Erzeugt wurde dieser Auszucht-Stamm 1937 von Lynch und Poiley auf der Basis von Schweizer Auszucht-Mäusen. NMRI-Mäuse haben ein Albino-Phänotyp mit unpigmentiertem Fell und ebenfalls nichtpigmentierten Augen. Sie haben überdurchschnittliche Verpaarungs- und Aufzuchtseigenschaften bei überdurchschnittlichen Wurfgrößen.



**Tierhaltung**

Die Tiere wurden den Richtlinien des *Animal Welfare Committee* der Medizinischen Hochschule Hannover entsprechend behandelt. Die Tiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50% in einem zwölfstündigen Rhythmus von Licht und Dunkel gehalten. Futter (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten) und sterilisiertes Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Um die zeitbezogene Aktivität der Mäuse zu protokollieren, wurden diese in einem akkustisch isolierten Raum unter programmierbaren Lichtbedingungen in Einzelkäfigen mit frei zugänglichen Laufrädern gehalten. Die Umdrehungen der Laufräder wurden von einem Computer registriert und gespeichert.

**Probenentnahme**

Zur Gewinnung verschiedener Proben wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Das Rumpfblood wurde aufgefangen und Gehirn, Hypophyse und Leber präpariert. Das Rumpfblood wurde 30 min auf Eis gehalten und anschließend mit der Tischzentrifuge für 2 min bei 6500 Umdrehungen abzentrifugiert. Die Serumfraktion wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Für RNA-Analysen wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Für *in situ* Hybridisierungen und lacZ/PLAP-Färbungen wurden die Gewebe uneingebettet oder in OCT-Medium (*optimal cutting temperature*, TissueTec, Plano) eingebettet in -30 °C kaltem 2-Methylbutan eingefroren. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Bei der Entnahme von Embryonen wurden diese ab einem Alter von 12,5 Embryonaltagen vor der eigentlichen Kryokonservierung auf Eis durch Unterkühlung getötet.

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die tiefgekühlten Gewebe und Embryonen in einem Kryotom (Leica) mit einer Schnittdicke von 16 µm (Hypophysen) bzw. 20-25 µm (Embryonen, Gehirne und Leber) geschnitten. Hierbei wurde eine Objekt-Temperatur von -13 °C und eine Kammer-Temperatur von -15 °C gewählt. Die Schnitte wurden mit vorbeschichteten Objektträgern (Menzel-Gläser, SuperFrostPlus) aufgenommen und bei RT für 15 min getrocknet. Diese wurden bis zur Fixierung und weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Genotypisierung der verwendeten Tiere erfolgte durch Southern-Blot Analyse bzw. PCR von genomischer DNA aus Schwanz-Biopsien bzw. dem Dottersack von Embryonen.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### Standardbedingungen und -methoden der Molekularbiologie

Allgemeine gentechnologische Arbeitsschritte wie z.B. Präzipitation von Nukleinsäuren, Phenolextraktion von Nukleinsäuren, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Ligation von DNA-Fragmenten, Transformation von *E.coli*-Zellen, analytische Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*-Zellen, photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren und auch Agarose-Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA-Fragmenten wurden nach den molekularbiologischen Standardmethoden durchgeführt, wie sie z.B. in Sambrook *et al.* (1989) oder Ausubel *et al.* (1992) niedergelegt sind. Verwendete Medien, Puffer und sonstige Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Ihre Zusammensetzung und Herstellung wurde, sofern nicht anders erwähnt, Protokollen aus den Methodenbüchern "Molecular Cloning" (Sambrook *et al.*, 1989) und "Current Protocolls in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, 1992) entnommen bzw. daran angelehnt. Reagenzien und Proben für die Vorbereitung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Enzymatische Reaktionen wurden mit den angebotenen Puffern nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Isolierung von DNA im präparativen Maßstab wurde mit dem Midi-Präparation System der Firma Quiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Elektrophorese wurde ein in Sambrook *et al.* (1989) entsprechend beschriebenes Gel-System verwendet. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach Angaben des Herstellers mit dem QuiaQuick Gel-Extraktionskit der Firma Quiagen erreicht. Sequenzreaktionen wurden nach der Methode des Fluoreszenz-basierten ddDNA Zyklussequenzierung (Zimmermann *et al.*, 1988) mit dem BigDye 3.0 Reagenz der Firma PE Applied Biosystems nach deren Angaben durchgeführt und in einem Gerät dieser Firma (ABI Prisma 377) ausgewertet.

## Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

### Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen und Gewebe-Biopsien

#### *Lösungen*

- **DNA-Extraktionspuffer/ES-Zellen:** 0,5 % Sarcosyl; 10 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
- **DNA-Extraktionspuffer/Gewebe:** 1 % SDS; 100 mM NaCl; 50 mM EDTA, pH 8,0; 20 mM Tris/HCl, pH 7,5

#### *ES-Zellen*

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Pro Kammer einer 96-Wellplatte wurden 50 µl DNA-Extraktionspuffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K zugegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Lysate wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und nach dem Protokoll der ethanolischen Fällung von DNA behandelt. Die DNA wurde jeweils in 50 µl Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen und über Nacht bei 55 °C resuspendiert.

#### *Gewebe*

Die Gewebe wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 600 µl DNA-Extraktionspuffer und 1 mg/ml Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55 °C im Brutschrank inkubiert. Die Lysate wurden für 5 min aufgeschüttelt und die Proteine durch Zugabe von 200 µl gesättigter NaCl-Lösung gefällt. Nach erneutem fünfminütigem Aufschütteln wurden die Lysate für 10 min bei maximaler Umdrehung in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände einer DNA-Fällung mit Isopropanol unterzogen. Die DNA wurde jeweils in 100 µl Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen und über Nacht bei 55 °C resuspendiert.

## Southern-Blot Genotypisierung

#### *Lösungen:*

- **1x TBE:** 90 mM Tris/Borsäure, pH 8,0; 2 mM EDTA, pH 8,0
- **Denaturierungslösung:** 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
- **Renaturierungslösung:** 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl, pH 7,0
- **20x SSC:** 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,2
- **Church-Strip:** 0,1 % SDS; 2 mM EDTA, pH 8,0
- **Church-Wash:** 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; 1 % SDS
- **Church-Hyb:** 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; 7 % SDS; 1 mM EDTA, pH 8,0

### ***Gelaufreinigung und Blotting***

Jeweils 10 µg genomische Maus-DNA wurden nach den jeweiligen Bedingungen des verwendeten Enzyms vollständig verdaut. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in einem 0,6 %igen Agarose-Gel, in einer 25 cm Gel-Apparatur bei 70 V in 1x TBE. Anschließend wurden die Gele für 35 min in Denaturierungslösung auf dem Schüttler inkubiert, kurz in Leitungswasser gespült und für zweimal 20 min in Renaturierungslösung geschwenkt. Die Volumina betragen dabei das Dreifache des Gelvolumens.

Für den Transfer der DNA wurden die Gele mit der Oberseite auf eine Plastikfolie gelegt. Eine trockene Hybond N-Blotmembran (Amersham Pharmacia) wurde auf das Gel luftblasenfrei aufgebracht. Auf die Membran wurden zwei angefeuchtete Lagen Whatman-Papier und ein Stapel (trockener) Papiertücher oder Zellstoff-Bögen gelegt und gleichmäßig mit Glasplatten beschwert. Der Transfer der DNA-Fragmente erfolgte über Kapillarkräfte und durch die im Gel vorhandene Flüssigkeit. Nach sechs bis 16 Stunden wurde die Membran vom Gel genommen und die DNA mit 2.400 Joule im UV-Crosslinker kovalent an die Membran gebunden.

### ***Sondensynthese und Hybridisierung***

Bei der Sondensynthese wurden cDNA-Fragmente mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP unter Verwendung des *ladderman labeling kits* (TaKaRa) nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die Blot-Membran wurde bei 65 °C für mindestens 15 min in einer rotierenden Hybridisierungsflasche (Hybridisierungssofen GFL 7601, Burgwedel) mit Church-Hyb vorinkubiert. Anschließend wurde das Produkt der Sondensynthese durch dreiminütiges Erhitzen bei 94 °C denaturiert und direkt in die vorgewärmte Hybridisierungsflasche auf den Blot gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C für mindestens 10 Stunden.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Nukleinsäuren wurden die Blots bei 60 °C zweimal für fünf und zweimal für 20 min in Church-Wash inkubiert. Bei Bedarf wurden die Blots für 10 min bei 65-70 °C nachgewaschen. Die Visualisierung der Signale erfolgte nach dem Einschweißen der Blots in Plastikfolie durch Auflegen einer Phosphoimager-Platte (Fujix, Imaging Plate BAS-II S) und ein entsprechendes Phosphoimager-Detektionssystem (Fujix, Phosphoimager BAS 1000) bzw. durch Autoradiographie (Kodak, Biomax-MS).

Für weitere Hybridisierungen mit anderen Sonden wurden die Blots mit kochendem Church-Strip übergossen und für 15 min bei 80 °C geschwenkt, um bereits hybridisierte Sonden wieder zu entfernen.

## PCR-Genotypisierung

### *10x Ansatz TRH-DE*

- 1,5 µl TRH-DE 5'-Primer
- 1,5 µl TRH-DE 3'-Primer (wt)
- 2,0 µl TRH-DE 3'-Primer (ko)
- 51 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- 10 µl 10x PCR-Puffer (Quiagen)
- 20 µl 5x Q-Puffer (Quiagen)
- 3 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl Taq-Polymerase (Quiagen)

### *10x Ansatz DE-neo<sup>R</sup>*

- 1,5 µl DE-neo<sup>R</sup> 5'-Primer
- 1,5 µl DE-neo<sup>R</sup> 3'-Primer
- 53 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- 10 µl 10x PCR-Puffer (Quiagen)
- 20 µl 5x Q-Puffer (Quiagen)
- 3 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl Taq-Polymerase (Quiagen)

### *10x Ansatz TRH-R1*

- 3,0 µl TRH-R1 5'-Primer
- 3,3 µl TRH-R1 3'-Primer (wt)
- 0,7 µl TRH-R1 3'-Primer (ko)
- 28 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- 10 µl 10x PCR-Puffer (Quiagen)
- 20 µl 5x Q-Puffer (Quiagen)
- 3 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl Taq-Polymerase (Quiagen)

### *10x Ansatz Cre-Rek*

- 1,5 µl Cre-Rek 5'-Primer
- 1,5 µl Cre-Rek 3'-Primer
- 53 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- 10 µl 10x PCR-Puffer (Quiagen)
- 20 µl 5x Q-Puffer (Quiagen)
- 3 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl Taq-Polymerase (Quiagen)

## **PCR**

Spezifische Primer wurden in einer Konzentration von 50 pmol/µl eingesetzt. Mit Ausnahme der TRH-R1 Genotypisierung wurde jeweils 1 µl genomische DNA mit 9 µl 10x Ansatz versetzt. Bei der TRH-R1 Genotypisierung wurde 1 µl genomische DNA mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt. Anschließend wurden 3,1 µl aus dieser Verdünnung mit 6,9 µl 10x Ansatz versetzt. Alle Reaktionen wurden in einem RoboCycler (Stratagene) nach dem folgenden Programm durchgeführt:

- 3 min 94 °C; 35 Zyklen (1:30 min 94 °C; 2:30 min 59 °C; 3 min 72 °C); 7 min 72 °C

## Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-angereicherter RNA

### Lösungen

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

### Dynabeads

Zur Gewinnung von Poly(A)<sup>+</sup>-angereicherter-RNA wurden 25 bis 100 mg Gewebe in einem Dismembrator zerkleinert oder mit einem Teflon-Glashomogenisator aufgeschlossen und anschließend in 4 ml Lysis-Puffer aufgenommen. Freigesetzte chromosomale DNA wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Kanüle (Durchmesser: 0,9 mm) geschert. Das erhaltene Lysat wurde mit 5 mg Dynabeads (Oligo-dT-Affinitätsmatrix, Deutsche Dynal) versetzt, auf vier Reaktionsgefäße (2 ml) verteilt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dynabeads wurden zweimal mit Waschpuffer 1 und je einmal mit Waschpuffer 2 und 3 gewaschen. Anschließend wurde die mRNA mit 1 mM EDTA, pH 8.0 bei 65°C für 3 min in einem Gesamtvolumen von 200 µl eluiert. Nach phenolischer Extraktion wurde die mRNA als Natriumsalz ethanolisch ausgefällt und bei -80 °C aufbewahrt.

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

### cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Invitrogen Thermoscript RT-PCR Systems (Invitrogen, San Diego) wurde nach den Protokollen des Herstellers aus Poly(A)<sup>+</sup>-angereicherter-RNA cDNA generiert und mit RNase verdaut.

### Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative Real-Time PCR wurde das iQ Multi-Color Real-time PCR Detection System und der iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München) benutzt. Für die Normalisierung der Ergebnisse wurde Cyclophilin (*house keeping gene*) als Standard verwendet.

### Radiochemischer Aktivitätstest

Bei diesem radiochemischen Test wurde die Aktivität des TRH-abbauenden Ektoenzym unter Verwendung von (PyroGlu-<sup>3</sup>H)-TRH als Substrat bestimmt (Bauer *et al.*, 1990). Die Spaltprodukte der Reaktion wurden über eine Kationenaustauschersäule aus Zellulosephosphat getrennt. Das schwach basische Substrat TRH wurde ebenso wie His-Pro-NH<sub>2</sub> bzw. DKP (Diketopiperazin) an die Säule gebunden, während das saure, radioaktiv markierte Reaktionsprodukt Pyroglutaminsäure mit Wasser eluiert werden konnte. Die im Eluat enthaltene, freigesetzte Pyroglutaminsäure wurde durch Szintillationszählung quantifiziert.

Zur Präparation der Trennsäulen wurden Pasteurpipetten, deren unteres Ende mit Watte gestopft war, mit Zellulosephosphat gefüllt und solange mit Wasser gespült, bis ein pH-Wert von sieben erreicht wurde. Der Inkubationsansatz wurde auf Eis in Spitzröhrchen pipettiert. Bis zu 80 µl Probe wurden mit 10 µl Inhibitorlösung und 10 µl Tritium-markierter TRH-Lösung (~ 1000 cpm/µl) versetzt und gegebenenfalls mit 200 mM Natriumphosphatpuffer auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Inhibitorlösung enthielt 1 mM Iodacetamid zur Inhibition der PAP I (Pyroglutamylpeptidase I) und 1 mM Diisopropylfluorophosphat zur Inhibition des PPCE (*post prolyl cleaving endopeptidase*). Die Inkubationsansätze wurden kurz bei 3500 rpm anzenrifugiert (Varifuge, Heraeus).

Aliquots von 10 µl wurden zum Zeitpunkt  $t = 0$  und im Abstand von 10 min während der Inkubation bei 30 °C aus dem Inkubationsansatz entnommen, gut gemischt, auf die Säulen aufgegeben und sofort mit 200 µl Wasser in das Säulenmaterial eingespült. Die Säulen wurden anschließend dreimal mit je 500 µl Wasser gespült. Das Eluat wurde in Szintillationsröhrchen aufgefangen und mit je 10 ml Ready Flow III Szintillator-Lösung versetzt. Um die Werte zu normieren wurde am Schluß ein Aliquot direkt aus dem Inkubationsansatz mit 1,7 ml Wasser und 10 ml Szintillations-Lösung versetzt. Die Auswertung erfolgte am Szintillationszähler.

## ***2.4 Histologische Methoden***

### ***In situ Hybridisierung***

Zum Nachweis von mRNA-Transkripten auf Gewebeschnitten (Schafer und Day, 1995) wurden radioaktiv markierte RNA-Sonden synthetisiert, die entweder als komplementäre Gegenstränge zur nachzuweisenden mRNA mit dieser hybridisieren konnten (*antisense*-Sonden), oder aber identisch zur mRNA waren und entsprechend keine Hybridisierung zeigen sollten (*sense*-Sonden). Die RNA-Sonden wurden auf vorbehandelte Gewebeschnitte aufgegeben. Nach Hybridisierung wurden nicht korrekt gepaarte RNA-Doppelstränge durch Steigerung der Stringenz der Waschbedingungen (Abnahme der Ionenstärke der Waschlösungen und Erhöhung der Waschtemperatur) voneinander getrennt und einzelsträngige RNA-Moleküle durch Behandlung mit RNasen entfernt. Die Detektion des Hybridisierungssignals erfolgte über Röntgenfilmexposition und Fotoemulsionsexposition.

### **Fixierung und Prähybridisierung**

Die tiefgefrorenen Gewebeschnitte wurden ca. 30 min bei RT aufgetaut bzw. getrocknet und anschließend für 60 min bei RT in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS (150 mM NaCl; 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4) fixiert. Zur Verbesserung der Gewebspenetration und der Zugänglichkeit der mRNA wurden die Schnitte einer zehnminütigen Behandlung mit 0,4 % Triton X-100 in PBS unterzogen. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Objektträger für 10 min mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) inkubiert. Durch diese Behandlung wurden Aminogruppen acetyliert und somit unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den RNA-Sonden und dem Gewebe verhindert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in eine 50 %ige und 70 %ige ethanolische Lösung entwässert, für mindestens 30 min an der Luft getrocknet und anschließend bei -80 °C bis zur Hybridisierung gelagert.



## Sondensynthese

### Lösungen

- **Transkriptionslösung:** 0,5 mM ATP; 0,5 mM GTP; 10 mM DTT; 8 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; 2 mM Spermidin; 2,5 U/μl RNAsin (Promega); 40 mM Tris/HCl, pH 8,0

### *In vitro* Transkription

Für die Darstellung radioaktiv markierter cRNA-Moleküle wurden 15 μl α-[<sup>35</sup>S]-UTP und 15 μl α-[<sup>35</sup>S]-CTP (>1000 Ci/mmol; 10 μCi/μl; Amersham) zur Trockene eingengt und anschließend in 8 μl Transkriptionslösung aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde 1 μl linearisierte Matrizen-cDNA (1 μg/μl) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl Polymerase (T7- bzw. T3- oder SP6-RNA-Polymerase, 50 U/μl; Stratagene) gestartet (90 min, 37 °C für T7- und T3- bzw. 40 °C für die SP6-RNA-Polymerase) und durch Zugabe von 1 μl DNase (10 U/μl, Boehringer Mannheim) beendet (15 min, 37 °C).

Die Synthese der DIG-markierten Sonden erfolgte im 20 μl Ansatz mit einem kommerziell erhältlichen Nucleotid-Mix (inklusive DIG-markiertem UTP) bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen.

Bei einer Transkriptgröße von über 250 nt wurde im Anschluss an die *in vitro* Transkription eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurde der Transkriptionsansatz auf 20 μl mit Wasser aufgefüllt, mit 20 μl 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10,2) versetzt und bei 60 °C für eine nach folgender Formel berechnete Hydrolysezeit inkubiert:

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

$L_o$ : Ausgangslänge des Fragmentes in kb

Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 2 μl 10 %iger Essigsäure beendet. Die Abtrennung nicht inkorporierter Nucleotide erfolgte mit Microspin-Säulchen (Amersham Pharmacia, G50) durch Größenausschluss-Chromatographie. Zur Bestimmung der Einbaurate radioaktiver Sonden wurde ein Aliquot vor und nach der Aufreinigung entnommen und mit Szintillationsflüssigkeit (Ready Flow III, Beckmann Instruments) versetzt. Anschließend wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Die [<sup>35</sup>S]-markierten RNA-Sonden wurden bis zu einer finalen Konzentration von 5x 10<sup>4</sup> cpm/μl in Hybridisierungspuffer verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Bei DIG-markierten Sonden wurde die optische Dichte bestimmt und eine Konzentration von 5 ng/μl eingestellt.

## Hybridisierung und Posthybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

### Lösungen

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

### Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden die Gewebsschnitte vorsichtig mit Hybridisierungspuffer überschichtet. Dieser enthielt  $5 \times 10^4$  cpm/µl der radioaktiv-markierten, durch *in vitro*-Transkription hergestellten RNA-Sonde. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas versehen (eingedeckelt) und über Nacht in einer feuchten Kammer mit 50 % Formamid bei 58 °C inkubiert.

### Posthybridisierung

Die Objektträger wurden entdeckelt, in 2x und 1x SSC gewaschen und für 30 min bei 37 °C einem RNase-Verdau unterzogen. Es folgten Waschschrte in Lösungen abnehmender Ionenstärke: (1x, 0,5x, 0,2x SSC; jeweils 20 min, RT). Abschließend wurden die Objektträger bei 65 °C für 60 min in 0,2x SSC inkubiert und nachfolgend kurz bei RT in 0,2x SSC und Wasser gewaschen.

### Detektion

Zur Detektion der Hybridisierungssignale wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 % und 70 %) entwässert. Nach dem Trocknen wurde über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt (BioMax MR, Kodak). Zur Feinanalyse der *in situ* Signale wurden die Objektträger in eine Fotoemulsionslösung getaucht (Kodak NTB2, 1:1 mit Wasser verdünnt und auf 42 °C erwärmt), über Nacht getrocknet und in Abhängigkeit von der zu erwarteten Signalstärke für fünf Tage bis vier Wochen bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Objektträger in Kodak D19 (4 min) entwickelt, mit Rapid Fix (Kodak) fixiert (15 min) und über Nacht gewässert. Am nächsten Tag wurden ausgewählte Schnitte mit Kresylviolett gefärbt und zusammen mit den übrigen Schnitten mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert.

Anschließend wurden sie im Hell- bzw. Dunkelfeld (Olympus BH2 bzw. Olympus AX70) analysiert und mit einer Digitalkamera (Intas 302, Polaroid) fotografiert.

## **Hybridisierung und Posthybridisierung mit DIG markierten Sonden**

### ***Lösungen***

- **P1:** 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl
- **P2:** 1 % Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) in P1
- **P3:** 0,1 M Tris/HCl, pH 9,5; 0,15 M NaCl

### ***Hybridisierung***

Die Hybridisierung erfolgte wie für die radioaktive Methode beschrieben, aber mit 5 ng/µl DIG markierter RNA-Sonde und bei 50 °C.

### ***Posthybridisierung***

Die Posthybridisierung erfolgte wie für die radioaktive Methode beschrieben.

### ***Detektion***

Die Schnitte wurden in P1 gewaschen und anschließend zwei Stunden in P2 inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsplätze abzusättigen. Die Schnitte wurden, nachdem sie mit einem hydrophoben Stift eingerahmt worden waren, vorsichtig mit 40 µl Anti-DIG-Antikörperlösung (Anti-DIG FAB-Fragment mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, Boehringer Mannheim, 1:1500 in P2) überschichtet und bei 4 °C in einer feuchten Kammer ca. 16 Stunden inkubiert. Darauf folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und anschließendes zweimaliges Waschen in P1. Die alkalische Phosphatase wurde durch 15 minütiges Waschen in P3 aktiviert. Dann wurden die Objektträger für einen Zeitraum von 30 min bis zu 4 Stunden in P3 mit 338 µg/ml Nitroblautetrazolium (NBT, Biomol) und 175 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Dinatriumsalz (X-Phosphat, Biomol) inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Waschen in Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Objektträger für 12 bis 15 Stunden gewässert und mit wässrigem Einbettungsmedium (Gelmount, Biomed) eingedeckelt.

## **Immunohistochemie**

### **Diaminobenzidin-Nickel-Färbung**

Frisch entnommene Hypophysen wurden über Nacht in Bouin-Lösung (Sigma) fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gewebe so lange in 70 % Isopropanol gewaschen bis die Waschlösung farblos blieb und dann in Paraffin eingebettet. Mit einem Microtom (Leica) wurden 9 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach dem Entparaffinisieren wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation in 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol geblockt. Die Schnitte wurden 30 min in PBS mit 5% BSA inkubiert und unspezifische Avidin-Biotin Bindungen mit dem Biotin/Avidin Blocking Kit (Vector Laboratories) inaktiviert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 18 °C über Nacht, gefolgt von einer Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C. Nach dem Waschen der Schnitte mit Wasser und PBS wurden die Schnitte mit Spezies-spezifischen biotinylierten sekundären Antikörpern (Dianova) für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte eine Inkubation mit ABC-Komplex (Vectastain ABC-Kit; Vector Laboratories) für 30 min bei 37 °C und die Färbung der Schnitte durch eine Nickel-verstärkte Diaminobenzidin-Reaktion (0,125 µg/ml Diaminobenzidin und 0,75 µg/ml Ammonium-Nickel-Sulfat) für 10 min bei RT. Die primären Antikörper für die Immunhistochemie wurden freundlicherweise von Dr. A.F. Parlow (National Hormone & Peptide Program, Torrance, California) zur Verfügung gestellt. Polyklonale Kaninchen-Antisera gegen Prolaktin (NIDDK-anti-rPRL-IC-5) und β-TSH (NIDDK-anti-rBetaTSH-IC-1) wurden in einer Verdünnung von 1:30.000 eingesetzt.

### **Fluoreszenz**

Tiefgefrorene Gewebeschnitte wurden aufgetaut, getrocknet und anschließend für 30 min bei RT in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS (150 mM NaCl; 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4) fixiert. Nach zwei zehninütigen Waschschritten in PBS wurden die Schnitte für weitere 10 min in PBS mit 0,4 % Triton getaucht. Daraufhin wurden die Schnitte 60 min in PBS mit 0,4 % Triton und 10 % normalem Ziegen Serum inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Ziegen Serum abzusättigen. Über Nacht wurde dann mit dem entsprechenden Primärantikörper (rabbit anti lacZ, 1:250, bzw rabbit anti TRH-DE, 1:100) in PBS mit 0,4 % Triton und 1 % normalem Ziegen Serum bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS für 20 min bei RT gewaschen und für eine Stunde mit dem Spezies-spezifischen sekundär Antikörper (Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:800 in PBS mit 0,4 % Triton und 1 % normalem Ziegen Serum erneut inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte wässrig eingedeckelt (Gelmount, Biomedica)

und mit dem Epifluoreszenzmikroskop Olympus AX70 unter Verwendung entsprechender Filter betrachtet. Bilder der Fluoreszenzen wurden mit der Digitalkamera DP50 (Olympus) aufgenommen. Für die immunohistochemische Darstellung von lacZ wurde polyklonales Kaninchen Antiserum freundlicherweise von Dr. A. Gossler, Hannover, zur Verfügung gestellt. Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen TRH-DE wurde in unserer Arbeitsgruppe von K. Hübel hergestellt und von A. Weiß Affinitäts-aufgereinigt.

## Reporternachweis

### $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*)

Die vom bakteriellen *lacZ*-Gen kodierte  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) katalysiert die Spaltung von Laktose in Glukose und Galaktose. Diese Aktivität kann man mit chemischen Substraten, zum Beispiel mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal), nachweisen. Bei Studien zur Untersuchung der Genregulation *in vivo* und *in vitro* hat sich die Verwendung des bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase Gens als Reporter bewährt. Das *lacZ*-Expressionsmuster wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl in embryonalen Ganzpräparaten als auch in Kryotomschnitten transgener Mäuse untersucht. Bis zum Tag 12,5-13,5 der embryonalen Entwicklung war eine *lacZ*-Anfärbung der Embryonen als Ganzpräparat ohne weiteres möglich. Zu einem späteren Zeitpunkt empfahl sich aufgrund der schweren Erreichbarkeit der Gewebe durch das Substrat (X-Gal), die zu analysierenden Embryonen zunächst zu schneiden.

### Lösungen

- **PBS:** 150 mM NaCl; 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4
- **Lösung A:** 5 mM EGTA und 2 mM MgCl<sub>2</sub> in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4
- **Lösung B:** 0,2 % Glutaraldehyd in Lösung A
- **Lösung C:** 0,01 % Natriumdesoxycholat und 0,02 % NP40 in Lösung A
- **Färbelösung D:** 1 mg/ml X-Gal (aus 40 mg/ml in DMSO); 5 mM KFe(CN)<sub>6</sub>III; 5 mM; KFe(CN)<sub>6</sub>II; in Waschlösung C

### *lacZ*-Färbung von Embryonen

Nach der Isolierung wurden die Embryonen in PBS gesammelt und gewaschen. Die Fixierung in Lösung B erfolgte bei RT für 5 min bei Embryonen bis zum Tag 9,5 dpc und für 15 min bei Embryonen zwischen 10,5 und 12,5 dpc. Nach dreimaligem Waschen in Lösung C (Waschzeiten wie zuvor, je nach Alter der Embryonen) folgt die Färbung mit X-Gal bei 37 °C über Nacht (Lösung D). Anschließend wurden die Embryonen in Lösung C gewaschen. In einer aufsteigenden Glycerin-Reihe wurde das Gewebe geklärt und in 80 % Glycerin bei 4 °C gelagert.

### *lacZ*-Färbung von Gewebeschnitten

Die Fixierung der Kryotomschnitte für die *lacZ*-Färbung erfolgte in Lösung B für 5 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in Lösung C, fand die Färbung mit X-Gal bei 37 °C über Nacht in Lösung D statt. Nach der Färbung wurden die Schnitte zunächst 5 min in Lösung C, dann 5 min in Wasser gewaschen und anschließend mit Gelmount (Biomedica) eingedeckelt.

## **Plazentare alkalische Phosphatase (PLAP)**

Die humane plazentare alkalische Phosphatase (PLAP) ist ein hitzestabiles Isoenzym der alkalischen Phosphatase und wird normalerweise von plazentaren Syncytiotrophoblasten gebildet. Die Verwendung als Reporter für die Zellkultur wurde zuerst von P. Henthorn 1988 beschrieben. Die Vorteile von PLAP als histochemischer Marker liegen im Besonderen darin, daß PLAP als Glykanphosphatidyl-Inositol verankertes Membranprotein vorliegt und bei ausreichend starker Expression die Darstellung bemerkenswerter morphologischer Details von Neuronen und Zellfortsätzen ermöglicht. Die Lokalisation in der Membran erlaubt darüber hinaus die gleichzeitige Verwendung von Markern, die im Zellkern oder Cytoplasma befindlich sind.

### ***Lösungen***

- **PBS:** 150 mM NaCl; 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4
- **Fixierlösung :** 0,2 % Glutaraldehyd in PBS
- **Aktivierungspuffer:** 0,1 M Tris/HCl, pH 9,5; 0,15 M NaCl

### ***PLAP-Färbung von Gewebeschnitten***

Die Fixierung von Kryotomschnitten für die PLAP-Färbung erfolgte in Fixierlösung für 5 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBS, wurden die Schnitte für 30 min bei 65 °C in PBS erhitzt, um unspezifische alkalische Phosphatasen zu inaktivieren. Die Schnitte wurden daraufhin in PBS bei RT abgekühlt und für 10 min im Aktivierungspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe bei RT an einem lichtgeschützten Platz in BM-Purple (Boehringer, Mannheim) über Nacht gefärbt. Die Zugabe von 0,4 mg/ml Levamisol (Sigma) zeigte keine wesentliche Änderung in Bezug auf den unspezifischen Hintergrund durch endogene Phosphatasen. Die Färbereaktion wurde durch mehrfaches Waschen in Wasser gestoppt und die Schnitte wässrig eingedeckelt (Gelmount, Biomeda).

Eine Doppelfärbung mit lacZ und PLAP war möglich. Für diesen Fall musste die lacZ-Färbung zuerst durchgeführt werden, da die  $\beta$ -Galaktosidase nicht hitzestabil ist. Vor der PLAP-Färbung mussten alle Reste von Detergenzien sorgfältig mit PBS ausgewaschen werden, da sie sonst im alkalischen Milieu präzipitierten und die Qualität der Schnitte stark beeinträchtigten.

## **2.5 Radioimmuno-Assay**

### **Schilddrüsenhormone**

Die Ermittlung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen erfolgte mit Hilfe von Radioimmunoassays in Zusammenarbeit mit Dr. Theo Visser (Rotterdam). <sup>125</sup>I-markierte Iodthyronine wurden von Amersham, T<sub>4</sub> Antiserum von Sigma bezogen. Das T<sub>3</sub> Antiserum wurde in Rotterdam hergestellt (Visser *et al.*, 1977). Die finale Antikörperkonzentration betrug 1:20.000 für T<sub>4</sub> und 1:250.000 für T<sub>3</sub>. Das Probenvolumen war 10 µl für T<sub>4</sub> und 20 µl für T<sub>3</sub>. Die Inkubationsansätze wurden in 0,5 ml RIA-Puffer (0,06 M Barbital, 0,15 M HCl, 0.1 % BSA, 0,6 g/l 8-Anilino-1-Naphthalin-sulfonsäure [Sigma]) angesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und die Antikörper-gebundene Radioaktivität mit Sac-Cel Cellulose gekoppeltem sekundärem Antikörper (IDS, Boldon) präzipitiert.

### **Hypophysäre Hormone**

Die hypophysären Hormone wurden von Dr. A.F. Parlow (National Hormone & Peptide Program, Torrance, California) bestimmt.



## 2.6 Primer und Plasmide

### Primer

Primer wurden in einer Konzentration von 250 pmol/μl bei -20 °C gelagert. 5-Strich Primer sind im Folgenden in Groß- und 3-Strich Primer in Kleinbuchstaben aufgeführt. Für die Klonierung wurden die Primer A-lacZ-NcoI und B-lacZ-NcoI vereinigt, hitzedenaturiert und bei RT zu einem doppelsträngigen Oligomer zusammengelagert. Bei der Genotypisierung konnte mit den verwendeten Primern zum einen das wildtyp (wt) bzw. mutante (ko) Allel von TRH-R1 bzw -DE identifiziert und zum anderen die An- (in) oder Abwesenheit (out) der Cre-Rekombinase (Cre-Rek) und des Neomycinresistenzgens in TRH-DE Mutanten (DE-neo<sup>R</sup>) überprüft werden. Die Länge des jeweiligen Amplikons ist in Klammern hinter der entsprechenden Primerkombination aufgeführt. Sequenzen in grauer Schrift kennzeichnen wiederholt aufgeführte Primer, die abhängig von der DNA-Matrize an der Amplifikation unterschiedlicher Produkte beteiligt sind.

### Klonierung

A-lacZ-NcoI: 5'-CTAGAGATCGGTAGCCATGGGC-3'

B-lacZ-NcoI: 5'-gatcgcccatggctaccgatct-3'

### Genotypisierung

TRH-R1:	5'-TGAGTGTGGCTTGATTGG/gtgctggtgaagcatctg-3'	(wt, 926 bp)
	5'-TGAGTGTGGCTTGATTGG/gactgtcctggccgtaac-3'	(ko, 650 bp)
TRH-DE:	5'-CAATGACTGCGCTGGAGGTG/cgtaggagctgcggaagaag-3'	(wt, 968 bp)
	5'-CAATGACTGCGCTGGAGGTG/gcgcatacgtaccgtgcatc-3'	(ko, 485 bp)
DE-neo <sup>R</sup> :	5'-CATCCAGCCACCACCTACAG/agcgctctaaggcaggcttg-3'	(in, 1673 bp)
	5'-CATCCAGCCACCACCTACAG/agcgctctaaggcaggcttg-3'	(out, 470 bp)
Cre-Rek.:	5'-GCCAGGTATCTCTGACCAGA/caagttgaataaccggaaatg-3'	(in, 800 bp)
	5'-GCCAGGTATCTCTGACCAGA/caagttgaataaccggaaatg-3'	(out, 0 bp)

### Real-Time PCR

Cyclophilin:	5'-GCAAGGATGGCAAGGATTGA/agcaattctgcctggatagc-3'	(102 bp)
β-TSH:	5'-CCGCACCATGTTACTCCTTA/gttctgacagcctcgtgtat-3'	(104 bp)
PRL:	5'-GCAGTCACCATGACCATGAA/agattggcagaggctgaaca-3'	(112 bp)
TRH-R1:	5'-AACTGCCGCTCTGAAGACTG/actctgtcagctgcctggt-3'	(136 bp)
TRH-DE:	5'-CAGTTACCTGTGGCAGATTC/ccagcttcctctgtctaagt-3'	(130 bp)

## Plasmide

Die für die Klonierung des *Targeting*-Vektors sowie für verschiedene Sondensynthesen verwendeten Plasmide sind in den nachfolgenden Tabellen mit entsprechender Vermerken aufgelistet. Für die Herstellung markierter cDNA- bzw. cRNA-Sonden wurden Plasmide benutzt, die aus dieser Arbeit hervorgegangen sind (Asterisk) bzw. aus früheren Arbeiten in der Arbeitsgruppe bereits vorlagen (1: R. Rabeler; 2: J. Ehrchen).

## Klonierung

Vektor	Referenz
pBeloBAC11	(Kim <i>et al.</i> , 1996)
pBluescript II KS <sup>+</sup>	Strategene
pGEM-T <sup>easy</sup>	Promega
pGNA	(Le <i>et al.</i> , 1990)
pIND-lacZ	Invitrogen
pGT0-2TMpfs	(Leighton <i>et al.</i> , 2001)
pNeoflox8	(Hennet <i>et al.</i> , 1995)
pPGK neo <sup>R</sup> lox <sup>2</sup> dta	(Soriano, 1997)

## Southern

Vektor	Fragment		Zweck
pBS-(r)TRHDE <sup>(1)</sup>	<i>NotI-XmaI</i>	(635 bp)	ExonI-Sonde
pBS-5'-Sonde <sup>(*)</sup>	<i>PmeI-XbaI</i>	(391 bp)	5'-Sonde
pGNA	<i>SacI-AccI</i>	(824 bp)	lacZ-Sonde
pNeoflox8	<i>EcoRI</i>	(1020 bp)	neo-Sonde
pGEM-BAC7 <sup>(*)</sup>	<i>HindIII-EcoRI</i>	(1040 bp)	3'-Sonde

## ISH (radioaktiv)

Vektor	Fragment		Schnitt	Polymerase	Orientierung
pLS-(m)TRHDE <sup>(1)</sup>	<i>EcoRV</i>	(475 bp)	<i>EcoRI</i>	T3	antisense
			<i>HindIII</i>	T7	sense
pLS-(m)ppTRH <sup>(1)</sup>	<i>EcoRV</i>	(531 bp)	<i>EcoRI</i>	T3	antisense
			<i>HindIII</i>	T7	sense
pLS-(m)TRHR1 <sup>(*)</sup>	<i>HincII-EcoRV</i>	(630 bp)	<i>PstI</i>	T3	antisense
			<i>HindII</i>	T7	sense
pcDNA3-(r)TRHR2 <sup>(1)</sup>	<i>EcoRV-XbaI</i>	(1337 bp)	<i>HindIII</i>	Sp6	antisense
			<i>XbaI</i>	T7	sense

**ISH (DIG)**

Vektor	Fragment		Schnitt	Polymerase	Orientierung
pLS-PRL <sup>(2)</sup>	nt 1566-1749	(184 bp)	HindIII	T7	antisense
			PstI	T3	sense
pLS-βTSH <sup>(2)</sup>	nt 190-445	(880 bp)	HindIII	T7	antisense
			PstI	T3	sense
pLS-GH <sup>(2)</sup>	nt 248-445	(198 bp)	HindIII	T7	antisense
			PstI	T3	sense

**2.7 Statistische Absicherung**

Zum Vergleich zweier Meßreihen wurde der Student'sche t-Test verwendet. Überprüft wurde die Entfernung zweier Mittelwerte ( $X_a$ ,  $X_b$ ) zueinander. Als Maß hierfür diente die Größe  $t$ . Zu einem  $t$  ließ sich die Wahrscheinlichkeit ( $P$ ) errechnen. Betrug die Wahrscheinlichkeit ( $P$ ) der Übereinstimmung  $< 5\%$  ( $P < 0,05$ ) so wurde von einem signifikanten Unterschied gesprochen. Die statistischen Berechnungen erfolgten durch die Microsoft Excel Tabellenkalkulation.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 Herstellung TRH-DE defizienter Mäuse

#### Klonierung des *Targeting*-Vektors

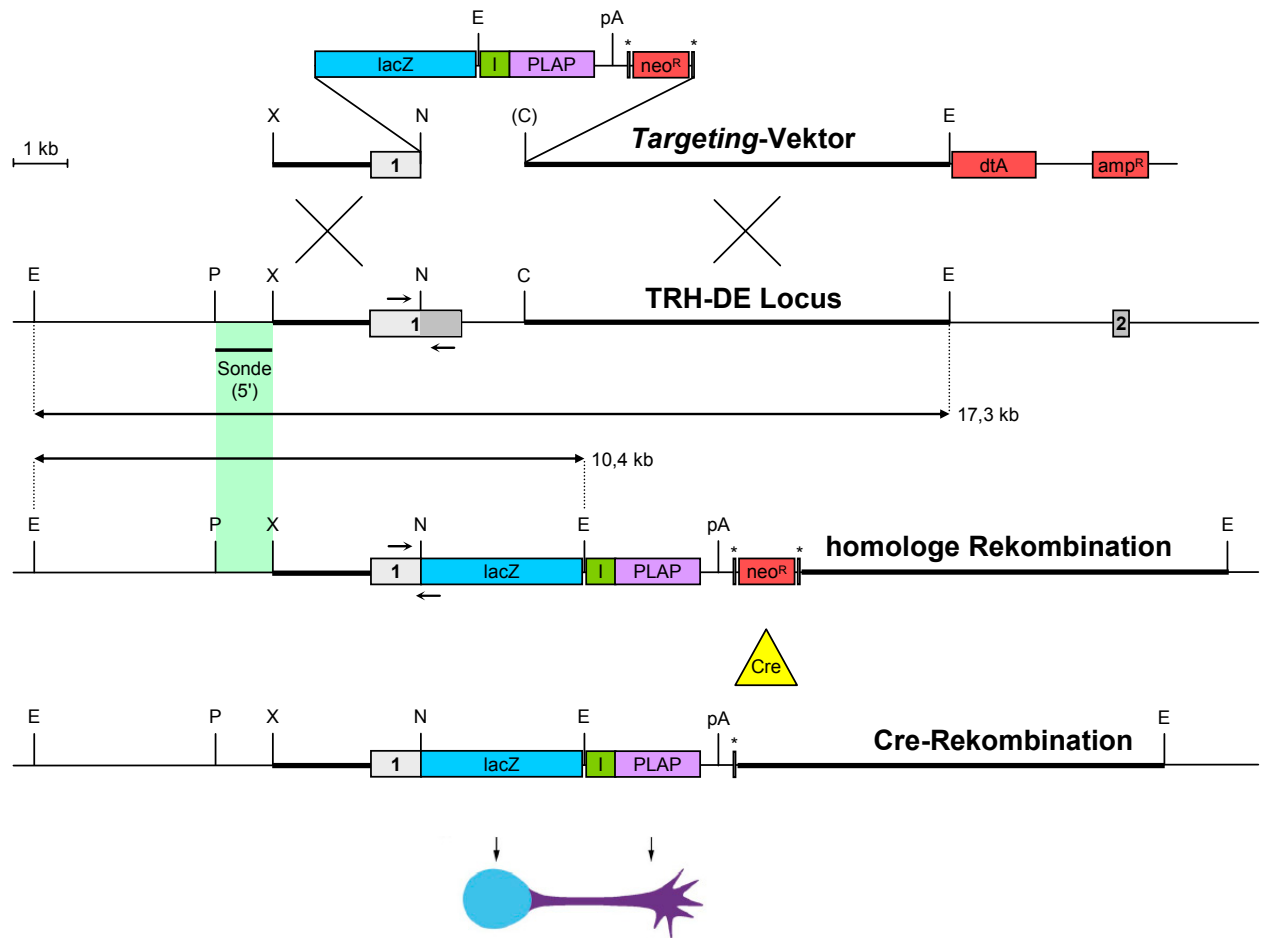
Ein *Targeting*-Vektor ist darauf ausgelegt, mit einem definierten chromosomalen Locus zu rekombinieren und diesen zu mutieren. Der minimale Aufbau eines solchen Vektors besteht aus Sequenzen, die mit der gewünschten chromosomalen Integrationsstelle homolog sind, sowie einem Plasmidgrundgerüst, das für die bakterielle Klonierung benötigt wird. Darüberhinaus erfordert die geringe Transfektionseffizienz und Rekombinationsfrequenz in eukaryotischen Zellen den Einsatz positiver und eventuell auch negativer Selektionsmarker, die eine starke Selektion auf stabil transfizierte Zellen mit gezielter Integration erlauben. Positive Marker sind Resistenzgene, die transfizierten Zellen das Wachstum in Gegenwart eines Antibiotikums erlauben, wohingegen negative Marker cytotoxische Effekte bewirken, die bei einer unspezifischen Integration des *Targeting*-Vektors aktiviert werden. Generell werden *Targeting*-Vektoren in *Replacement*- und in *Insertion*-Vektoren unterschieden. Während ein *Insertion*-Vektor vollständig über ein einzelnes Rekombinationsereignis in das Genom integriert, wird bei einem *Replacement*-Vektor ausschließlich eine zwischen zwei rekombinierenden Armen gelegene Sequenz mit der genomischen Zielsequenz ausgetauscht.

Die Strategie, die für den auf Chromosom 10 gelegenen TRH-DE Locus verfolgt wurde, konzentrierte sich auf das offene Leseraster im ersten Exon des Gens. Mit einem klassisch aufgebauten *Replacement*-Vektor sollte dieser Teil deletiert und durch ein promotorloses Reporterkonstrukt ersetzt werden. Beabsichtigt war, die funktionelle Expression von TRH-DE zu unterbinden und stattdessen eine Reporteraktivität unter die Kontrolle des endogenen TRH-DE Promotors zu stellen.

Für die Klonierung der homologen Sequenzen aus dem TRH-DE Locus wurde eine genomische Maus-Bibliothek aus BAC (*bacterial artificial chromosome*) Klonen mit einer das erste Exon umfassenden cDNA-Sonde durchsucht. Fünf positive Klone konnten auf diese Weise isoliert werden. Anhand von Sequenzinformationen aus der Celera-Datenbank wurden geeignete Enzyme für eine detaillierte Restriktionsanalyse der BAC-Klone ausgewählt. Es ließ sich ein Klon bestimmen, aus dem das erste Exon in zwei überlappenden Fragmenten subkloniert werden konnte. Es wurde ein genomischer Abschnitt von fünf Kilobasen aus der 5-Strich Umgebung und ein Abschnitt von neun Kilobasen aus der 3-Strich Umgebung des ersten Exons kloniert. Aus

diesen Sequenzen wurden die Homologiebereiche des *Targeting*-Vektors gewählt und in das Plasmidgrundgerüst (pBluescript) übernommen. Als positive Selektionskassette wurde zwischen die rekombinierenden Arme ein von loxP-Sequenzen umgrenztes Neomycin-Resistenzgen (TK-neo loxP<sup>2</sup>) in den *Targeting*-Vektor eingeführt. Das bakterielle Resistenzgen sollte nachträglich in der Maus durch die Aktivität einer eingekreuzten Cre-Rekombinase entfernt werden, da berichtet wurde, daß es in eukaryotischen Zellen die Expression umliegender Gene negativ beeinflussen kann (Artelt *et al.*, 1991). Des Weiteren wurde eine promotorlose Reportereinheit aus den kodierenden Regionen der bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ) und der humanen plazentaren alkalischen Phosphatase (PLAP) zusammengestellt. Beide Leseraster wurden durch ein IRES-Element zu einer bicistronischen Sequenz verbunden, die durch ein einzelnes SV40 Polyadenylierungssignal terminiert wurde. Das gesamte Reporterkonstrukt wurde im *Targeting*-Vektor so eingefügt, daß das Start-ATG vom lacZ-Reporter und dem TRH-DE Gen identisch blieben. Während die lacZ-Aktivität dafür gedacht war, Zellen kernnah zu färben, wurde die Membran-assoziierte PLAP-Aktivität gewählt, um auch deren Projektionen darzustellen (Leighton *et al.*, 2001). Abschließend wurde das Grundgerüst des *Targeting*-Vektors vollständig durch einen Plasmidkörper ersetzt, der bereits eine negative Selektionskassette (PGK-dtA) beherbergte. Dabei wurden auch die im pBluescript enthaltenen Genfragmente der  $\beta$ -Galaktosidase entfernt, die vorher mit Sequenzen des Reporters zu unerwünschten Homologien innerhalb des *Targeting*-Konstrukts geführt hatten.

Eine schematische Übersicht des linearisierten *Targeting*-Vektors und des genomischen Bereichs vor und nach der homologen Rekombination ist in Abbildung 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Targeting-Strategie.**

Die nummerierten Kästen entsprechen den ersten beiden Exons des TRH-DE Locus. Der kodierende Bereich ist dunkel abgesetzt dargestellt. Das Startkodon des TRH-DE Gens liegt in der *NcoI* Schnittstelle (N) im ersten Exon. Die dicken Linien bezeichnen die genomischen DNA-Sequenzen, die im Targeting-Vektor als rekombinierende Arme verwendet wurden. Die roten Kästen markieren die Selektionskassetten, die für die positive ( $neo^R$ ) und negative (dtA) Selektion der ES-Zellen sowie die Propagation des Vektors in *E.coli* ( $amp^R$ ) eingesetzt wurden. Die neo-Kassette ist durch loxP-Sequenzen (\*) flankiert, so daß sie in Gegenwart von Cre-Rekombinase (Cre, gelbes Dreieck) aus dem Genom entfernt werden kann. Das IRES-Element (I, grüner Kasten) verbindet die Leseraster der bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ, blauer Kasten) und der humanen plazentaren alkalischen Phosphatase (PLAP, lila Kasten) zu einem bicistronischen Reporterkonstrukt, das in der Lage ist, Zellen mit TRH-DE Promotoraktivität zu lokalisieren (lacZ, perinukleär) und gleichzeitig ihre Projektionen (PLAP, Membran-assoziiert) darzustellen. Das 1083 bp *PmeI-XbaI* Fragment (Sonde), das zur Identifikation der diagnostischen 17,3 kb und 10,4 kb *EcoRI* Fragmente (Doppelpfeil) in genomischen Southern-Blots eingesetzt wurde, ist ebenfalls eingezeichnet. Mit kleinen Pfeilen sind die Primerpositionen markiert, die für die Genotypisierung mittels PCR verwendet wurden.

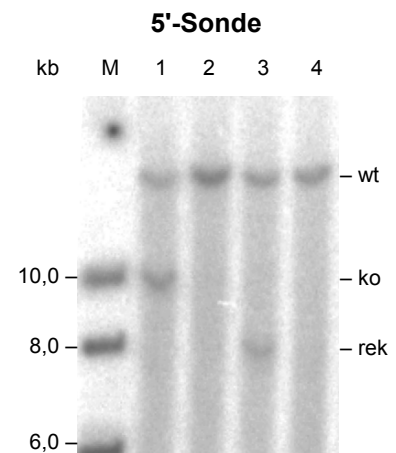
**Abkürzungen:** C, *Clal*; dtA, Diphtheria Toxin A; E, *EcoRI*; I, IRES; N, *NcoI*; pA, SV40 Polyadenylierungssignal; P, *PmeI*; X, *XbaI*.

### **Gene Targeting in murinen embryonalen Stammzellen**

Die Transfektion der murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mit dem linearisierten *Targeting*-Vektor erfolgte durch Elektroporation. Stabil transfizierte Zellen wurden in Gegenwart von G418 selektiert. Anschließend wurden pro Elektroporationsexperiment 384 wachsende Kolonien einer genaueren Analyse unterzogen. Dafür wurde die genomische DNA eines Teils dieser Zellen mit *EcoRI* verdaut und mittels Southern-Hybridisierung analysiert. Als radioaktive Sonde wurde ein im *Targeting*-Vektor nicht enthaltenes genomisches *PmeI/XbaI*-Fragment 5-Strich vom ersten Exon gewählt (5'-Sonde). Im Fall der homologen Rekombination konnte das mutante Allel anhand eines Restriktions-Fragmentlängen Polymorphismus (RFLP) vom wildtyp Allel unterschieden werden. Die zu erwartenden Fragmentlängen waren durch die Restriktionskartierung der BAC-Klone und die Sequenzen der Celera-Datenbank (C57BL/6 Genom) bereits bekannt. In positiven ES-Zellklonen ließ sich sowohl das wildtyp Fragment (17,3 kb), als auch das durch die Einführung einer zusätzlichen *EcoRI*-Schnittstelle kleinere mutante Fragment (10,4 kb) detektieren (Abb. 3.2). Insgesamt konnten bei einer Frequenz von 1:150 neun unabhängige Klone mit einem korrekten RFLP-Muster isoliert werden.

#### **Abbildung 2: Screening der ES-Zellen mit der 5'-Sonde.**

10 µg genomische DNA aus stabil transfizierten ES-Zellen wurden mit *EcoRI* verdaut, elektrophoretisch getrennt, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit einer externen 5'-Sonde hybridisiert. In allen Spuren ist eine 17 kb große wildtyp-Bande (wt) sichtbar. In der ersten Spur kann zusätzlich eine 10 kb große Bande identifiziert werden, die dem erwarteten Fragment aus dem mutanten Allel entspricht (ko). Eine ca. 8 kb große Bande in der dritten Spur weist auf einen rekombinanten Klon mit fehlerhafter Integration hin (rek). Die Markerspaur (M) wurde mit einer kreuzhybridisierenden 1 kb DNA-Leiter beladen.

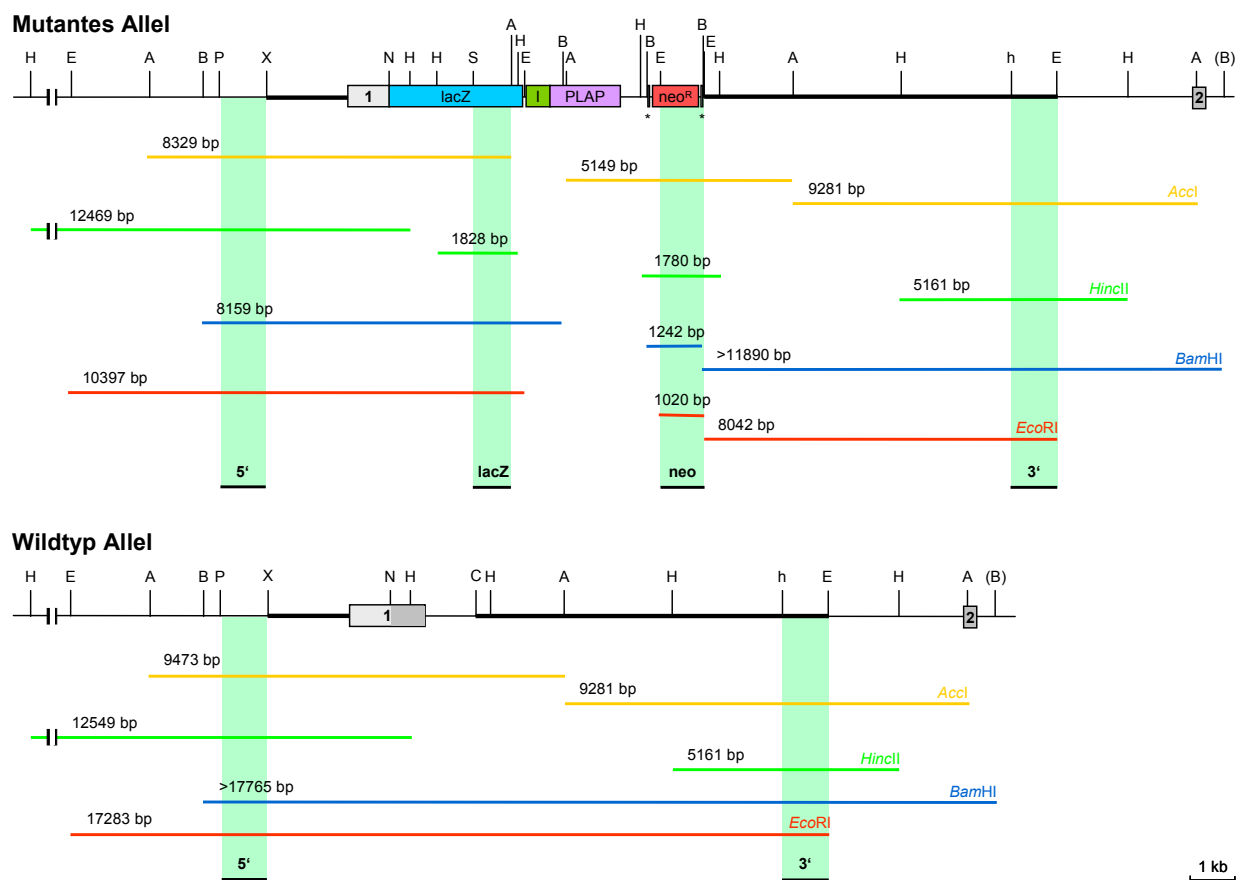


#### **Analyse rekombinanter Klone**

Um in den neun positiven ES-Zellklonen die gewünschte Mutation des TRH-DE Locus zu verifizieren, wurden weitere Southern-Blot Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die genomische DNA der Klone mit vier unterschiedlichen Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *BamHI*, *HincII* und *AccI*) verdaut und anschließend jeweils mit vier verschiedenen Sonden mittels Southern Blot Hybridisierung untersucht. Dabei dienten zwei Sonden aus der Umgebung der äußeren Enden der rekombinierenden Arme (5'-Sonde und 3'-Sonde) dazu die Integrität des mutierten TRH-DE Locus zu überprüfen, während zwei interne Sonden aus der  $\beta$ -Galaktosidase-Sequenz (*lacZ*-Sonde) und dem Neomycin-Resistenzgen (*neo*-Sonde) zusätzlich dafür genutzt

wurden, mehrfache Integrationen des *Targeting*-Vektors sichtbar zu machen. Während zwei von den neun positiven Klonen bei Verwendung der internen Sonden multiple Banden zeigten, die auf eine mehrfache Integration des *Targeting*-Konstrukts hindeuteten, konnten sieben ES-Zellklone mit einer gezielten Inaktivierung des TRH-DE Gens bestätigt werden. Eine Übersicht der verwendeten Enzyme und Sonden sowie der erwarteten Fragmentlängen findet sich in Abbildung 3.3[A]. In Abbildung 3.3[B] ist die vollständige Southern-Blot Charakterisierung eines ES-Zellklons gezeigt, der für die Blastula-Injektion verwendet wurde.

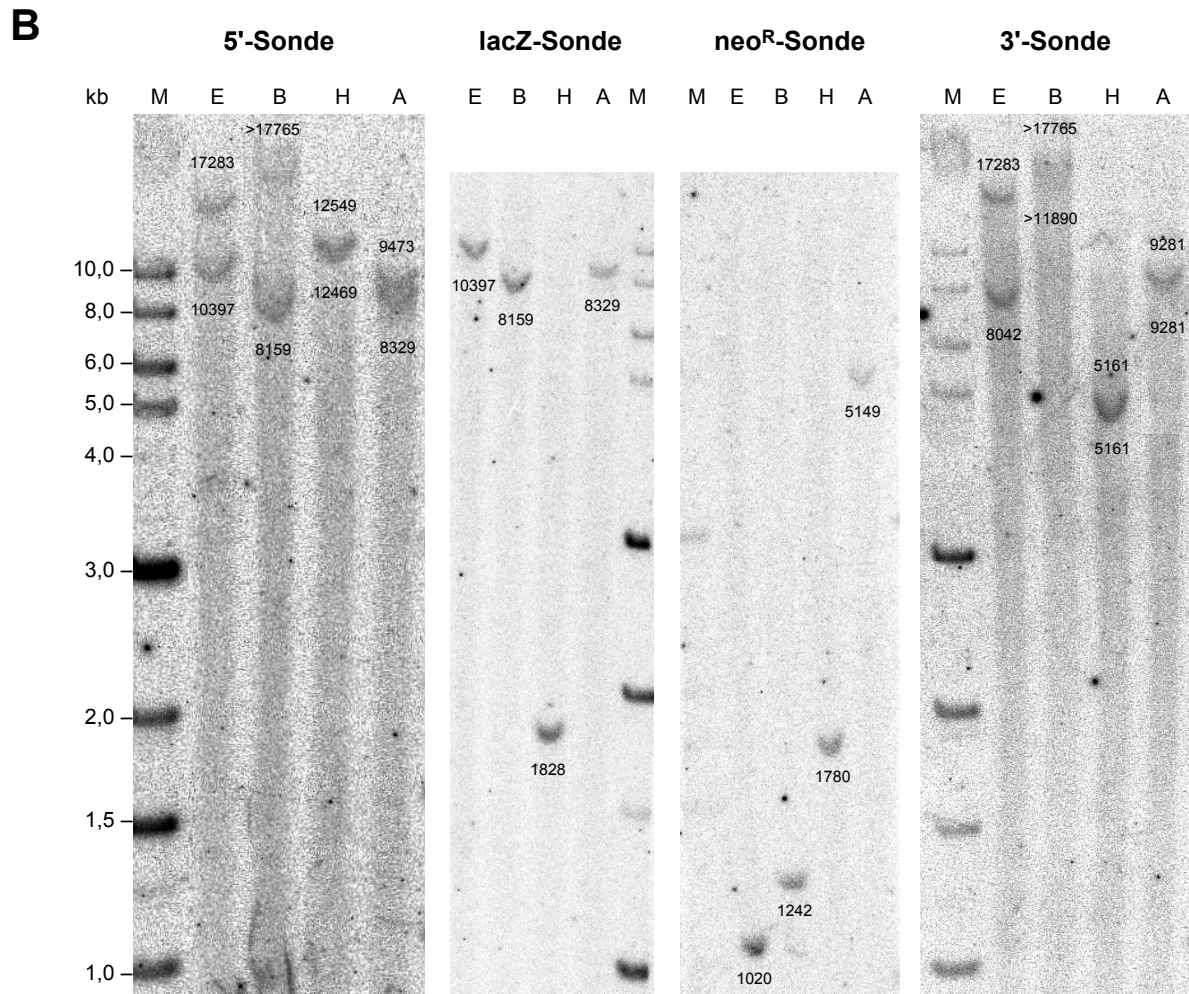
## A



**Abbildung 3.3: Southern-Blot Analyse positiver ES-Zellklone.**

**A.** Schematische Darstellung der Southern-Blot Analyse. Mutantes Allel und wildtyp Allel sind skizziert wie in **Abb. 3.1**. Die Bereiche mit denen die jeweiligen Sonden hybridisieren sind hellgrün unterlegt. Eine *BamHI*-Schnittstelle 5' vom zweiten Exons, die für das C57BL/6J Genom kartiert wurde, liegt im Genom der ES-Zellen (129/ola) nicht vor. Daher ließ sich für den *BamHI*-Verdau nur die Fragmentlänge für das mutante Allel unter Verwendung der 5'- bzw. lacZ-Sonde vorhersagen. **Abkürzungen:** A, *AccI*; B, *BamHI*; C, *ClaI*; E, *EcoRI*; H, *HincII*; h, *HindIII*; N, *NcoI*; S, *SacI*; P, *PmeI*; X, *XbaI*





**Abbildung 3.3: Southern-Blot Analyse rekombinanter ES-Zellklone.**

**B.** 10 µg genomische DNA aus stabil transfizierten ES-Zellen wurden jeweils mit den Enzymen *EcoRI*, *BamHI*, *HincII* und *AccI* verdaut, elektrophoretisch getrennt, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit den Sonden 5', 3', lacZ und neo hybridisiert. Die resultierenden Banden korrespondierten mit den erwarteten Fragmenten aus **Abb. 3.3A**. In jeder Spur bezeichnen zwei Zahlen die jeweilig erwartete Fragmentgrößen in Basenpaaren, wobei sich die obere Zahl auf das wildtyp und die untere auf das mutante Fragment bezieht. **Abkürzungen:** A, *AccI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HincII*; M, 1 kb DNA-Leiter.

### **Produktion von Chimären und Aufrechterhaltung der gezielten Mutation**

Aufgrund morphologischer Kriterien und im Hinblick auf gutes Wachstum unter Kulturbedingungen wurden fünf ES-Zellklone ausgewählt, propagiert und für die Blastula-Injektion verwendet. Die injizierten Blastozysten wurden über Nacht kultiviert und anschließend in pseudoschwangere Leihmütter (*Foster*) transferiert. Die Spendertiere (NMRI), denen die Blastozysten entnommen wurden, zeichneten sich durch einen Gendefekt aus, der aufgrund fehlender Tyrosinaseaktivität zum Albinismus führt. Das Genom der ES-Zellen (129/ola) wies diesen Defekt dahingegen nicht auf. In den chimären Tieren, die mosaikartig Zellen beider Ursprungs zufällig verteilt in sich vereinten, konnte anhand der pigmentierten Fellmarkierungen Anteil und Verteilung der von ES-Zellen abstammenden Zellen geschätzt werden. Aus den insgesamt 43 chimären Nachkommen wurden elf Männchen mit deutlicher und gleichmäßiger Fellmarkierung ausgewählt und auf Keimbahntransmission untersucht. Die chimären Männchen wurden zu diesem Zweck mit wildtyp NMRI-Weibchen verpaart, so daß bei pigmentierten Nachkommen eindeutig auf die Beteiligung von ES-Zellen an der Keimbahnentwicklung der jeweiligen Chimären geschlossen werden konnte (Abb. 4.4). Chimären, bei denen die Fellfarbe hauptsächlich durch den genetischen Hintergrund der ES-Zellen bestimmt wurde, waren entweder steril oder zeigten keinerlei Keimbahntransmission, ein Phänomen das unabhängig von der Mutation auftritt. Von den insgesamt vier chimären Männchen mit erwiesener Keimbahntransmission konnte ein Tier identifiziert werden, das zu 100% aus ES-Zellen abgeleitete Nachkommen zeugte. Die Frequenz der anderen Tiere lag lediglich bei ein bis zwei dieser Nachkommen in 100 Lebendgeburten. Pigmentierte Nachkommen der Chimären wurden zunächst per PCR genotypisiert. Das Ergebnis der PCR wurde für jeweils ein heterozygotes Tier aus jeder Chimärenverpaarung mittels Southern-Blot Analyse überprüft (Abb. 4.5). Alle weiteren Genotypisierungen erfolgten per PCR. Ausgehend von drei unabhängigen ES-Zellklonen ließen sich heterozygote Tiere der ersten Filialgeneration (F1) produzieren. Diese Tiere wurden als Gründertiere (*Founder*) für die weitere Zucht verwendet.

Die günstigen Zuchteigenschaften von NMRI-Tieren wurden für eine zügige Expansion der Kolonie genutzt. Heterozygote *Founder* genauso wie später ihre heterozygoten Nachkommen wurden jeweils mit wildtyp NMRI-Mäusen verpaart, um tiefer in den genetischen Hintergrund der NMRI-Mauslinie einzukreuzen. Zunächst in der F3- und dann erneut in der F5-Generation wurden heterozygote Geschwister untereinander verpaart, um anschließend homozygot mutante Mäuse und entsprechende wildtyp Kontrollen für den tierexperimentellen Teil der Arbeit zu produzieren.

Die Mutation des TRH-DE Locus wurde über fünf Generationen der Tieferverpaarung ebenfalls in den C57BL/6-Hintergrund eingebracht, wobei in einem frühen Schritt durch die Kreuzung mit einem konstitutiv Cre-Rekombinase exprimierenden C57BL/6-Weibchen (*Deleter*) das Neomycin-Resistenzgen aus dem mutanten Allel der Folgegeneration entfernt wurde. In der F5-Generation konnten Tiere identifiziert werden, die weder das Neomycin-Resistenzgen noch das Gen für die Cre-Rekombinase aufwiesen (Abb. 3.5). Aus Geschwisterverpaarungen der F5-Generation wurden homozygote Mutanten und wildtyp Kontrollen erzeugt.

Zusätzlich wurde die Mutation auch in einer 129/svJ-Mauslinie etabliert, die dem genetischen Hintergrund der ES-Zellen (129/ola) weitestgehend entspricht. Hier wurden schon aus der ersten Filialgeneration homozygote Tiere und deren wildtyp Kontrollen abgeleitet.

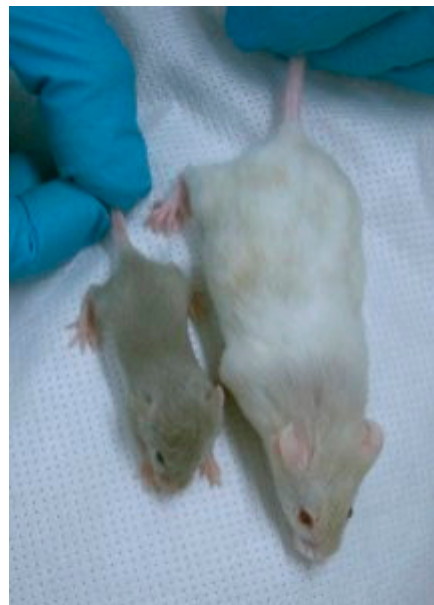
**Abbildung 3.4: Keimbahntransmission.**

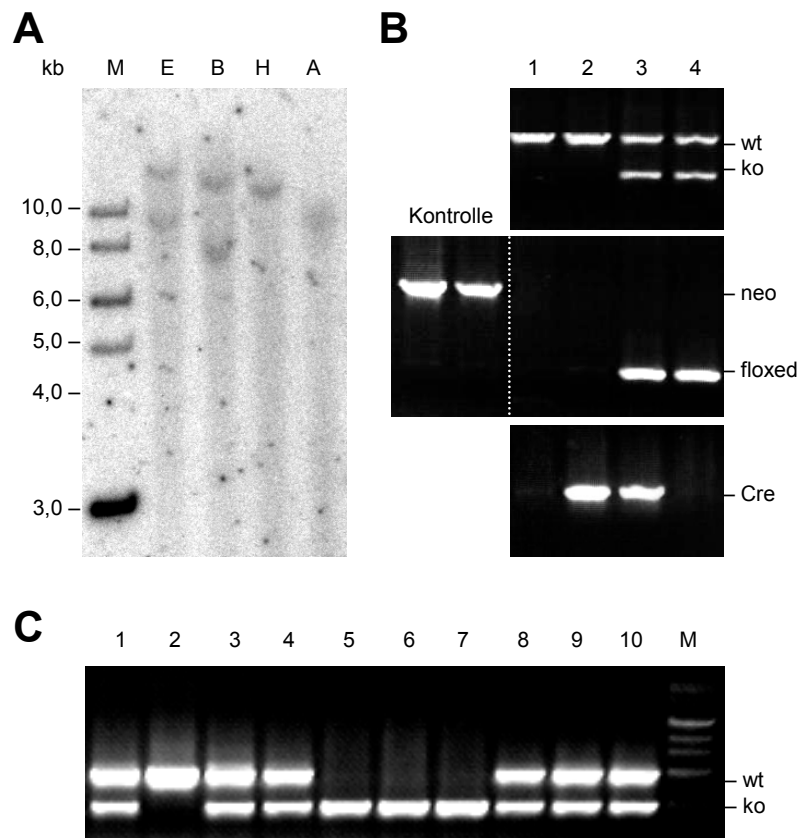
**A.** Bei Neugeborenen konnte bereits am pigmentierten Augenhintergrund der Einfluß des ES-Zell Genoms erkannt werden. Unpigmentierte Geschwister hatten stattdessen den Albinophänotyp der Spenderblastocyste. **B.** Abgebildet ist ein chimäres Tier mit 100 % Keimbahntransmission (rechts). Die Maus zeigte eine durchgehende Marmorierung mit beigem Fell, die zum Kopf hin dichter wurde. Die Verpaarung mit NMRI-Weibchen erzeugte ein graues Fell bei den Nachkommen (links). Erwartungsgemäß waren ca. 50 % dieser Nachkommen heterozygot für die Mutation im TRH-DE Locus.

**A**



**B**





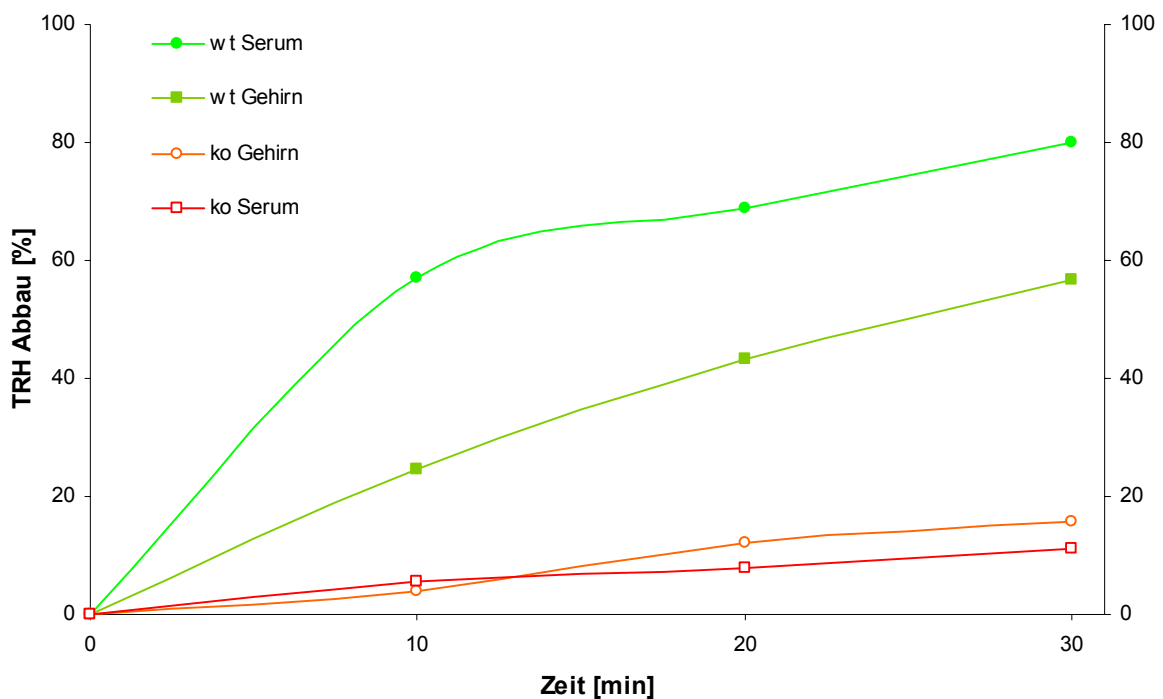
**Abbildung 3.5: DNA-Analyse der transgenen Mäuse.**

**A.** 10 µg genomische DNA aus der Schwanzspitzenbiopsie einer heterozygoten F1-Maus wurden mit den Enzymen *EcoRI* (E), *BamHI* (B), *HincII* (H), *AccI* (A) verdaut, elektrophoretisch getrennt, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit der externen 5'-Sonde hybridisiert. Mit Ausnahme der *BamHI* wildtyp Bande entsprachen die übrigen Banden den erwarteten Fragmenten wie in **Abb. 3.3** skizziert. Der abweichende RFLP für das wildtyp Allel im *BamHI*-Verdau ergab sich aus dem NMRI-Hintergrund der F1-Tiere. Die für die Charakterisierung des mutanten Allels relevante *BamHI*-Schnittstelle (5' vom ersten Exon) befand sich jedoch in allen untersuchten Mausgenomen an der gleichen Position. **B.** 500 ng genomische DNA aus Schwanzspitzenbiopsien der F5-Generation (C57 Bl/6J) wurden per PCR genotypisiert. In Gegenwart des TRH-DE wildtyp Allels wurde ein Produkt von 968 bp (wt) und in Gegenwart des mutanten Allels ein Produkt von 485 bp (ko) amplifiziert (oberes Gelbild). Mit zwei Primern, die das Neomycin-Resistenzgen flankieren, konnte in heterozygoten Tieren der F5-Generation die Cre-vermittelte Rekombination und der Verlust des Resistenzgens durch ein verkürztes PCR-Produkt von 672 bp (floxed) nachgewiesen werden (mittleres Gelbild). Die Kontroll-DNA mit dem Resistenzgen lieferte dahingegen ein Produkt von 1673 bp (neo). Das wildtyp Allel konnte kein PCR-Produkt ergeben. Für die weitere Zucht wurden Tiere bestimmt, in denen die Cre-Rekombinase nicht mehr als spezifisches 800 bp Amplikon (Cre) nachgewiesen werden konnte (unteres Gelbild). **C.** Typisches Ergebnis einer PCR-Genotypisierung für TRH-DE am Beispiel eines Wurfes aus einer Heterozygoten-Verpaarung. Als Marker (M) wurde eine 1 kb DNA-Leiter benutzt.

### Untersuchungen zum Verlust der TRH-DE Genaktivität

Nachdem in heterozygoten transgenen Tieren die gezielte Veränderung des Genoms im mutanten Allel bestätigt werden konnte, wurden Gewebe von deren homozygoten Nachkommen sowohl enzymatisch als auch auf RNA- und Protein-Ebene hinsichtlich der funktionellen Inaktivierung des TRH-DE Gens (*Knock-out*) untersucht.

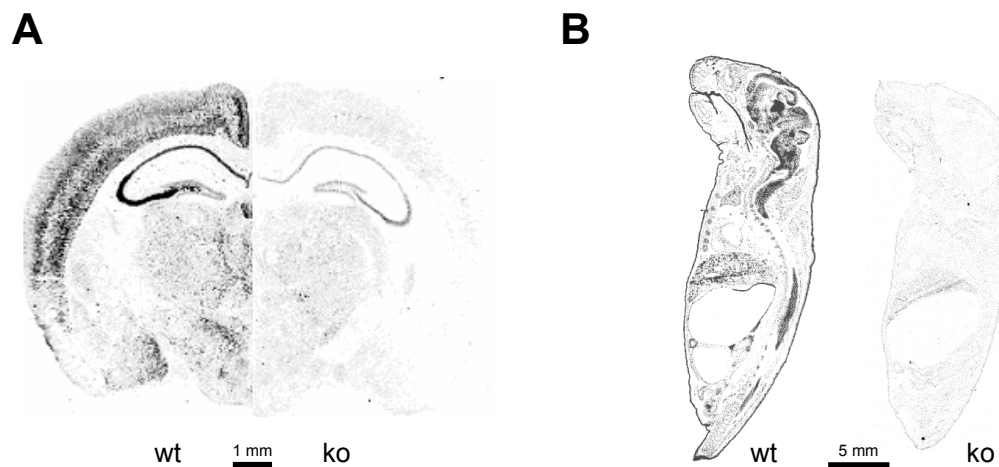
Die Abwesenheit von funktionellem TRH-DE Protein in den Homozygoten konnte aufgrund der spezifischen enzymatischen Aktivität in einem radiochemischen *Assay* (Bauer *et al.*, 1990) überprüft werden. Der Verlust der TRH-abbauenden Aktivität wurde sowohl in den Seren als auch in den Hirnhomogenaten dieser Mäuse gezeigt (Abb. 3.6).



**Abbildung 3.6: Radiochemischer TRH-DE Assay.**

Die Kinetik der TRH-abbauenden Aktivität ließ sich unter Verwendung eines Tritium-markierten Substrats zu festgelegten Zeitpunkten am Szintillationszähler verfolgen. Die Aktivität unspezifischer Serin- und Cystein-Peptidasen wurde durch ein Inhibitorgemisch unterdrückt. Es wurden jeweils 80  $\mu$ l Serum und 30  $\mu$ l fünfmal verdünntes Hirnhomogenat aus adulten Männchen eingesetzt. Die Proben aus homozygot mutanten Mäusen (ko) zeigten im Gegensatz zu ihren wildtyp Kontrollen (wt) keine spezifische TRH-abbauende Aktivität. Es wurde eine Doppelreihe bestimmt. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert.

Gewebedünnschnitte aus dem adulten Gehirn (coronal) und von Neugeborenen (sagittal) wurden *in situ* mit einer radioaktiven cRNA-Sonde für TRH-DE hybridisiert. Die Präparate wurden mit Fotoemulsion überzogen und für zwei Wochen exponiert. Schnitte homozygot mutanter Tiere wurden den entsprechenden wildtyp Kontrollen gegenübergestellt (Abb. 3.7). Auf den Geweben der homozygot mutanten Mäuse konnte lediglich ein ähnlich unspezifischer Hintergrund festgestellt werden, wie er auch bei Verwendung der *sense*-Sonde auf vergleichbaren wildtyp Geweben zu beobachten war.



**Abbildung 3.7: Nachweis von TRH-DE Expression in verschiedenen Geweben.**

**A.** *In situ* Hybridisierung coronaler 25  $\mu\text{m}$  Kryo-Dünnschnitte aus adulten Gehirnen mit einer radioaktiven cRNA-Sonde gegen TRH-DE mRNA. Die wildtyp Hemisphäre (wt) zeigt starkes Signal im Cortex sowie im Hippocampus, während die mutante Hemisphäre (ko) kein spezifisches Hybridisierungssignal aufweist. **B.** *In situ* Hybridisierung sagittaler 20  $\mu\text{m}$  Schnitte neugeborener Mäuse mit der gleichen Sonde wie unter A. Im Wildtyp (wt) gehen die stärksten Signale vom Zentralen Nervensystem aus. In der Peripherie lassen sich Signale auch im Thymus, in der Leber und im Darm detektieren. Der Schnitt aus dem homozygot mutanten Tier (ko) ist dahingegen frei von Signal.

Die homozygot rekombinanten Tiere werden im Weiteren als TRH-DE defiziente Mäuse bezeichnet (TRH-DE<sup>-/-</sup>, *Knock-out*).

### ***3.2 Reporteraktivität unter der Kontrolle des TRH-DE Promoters***

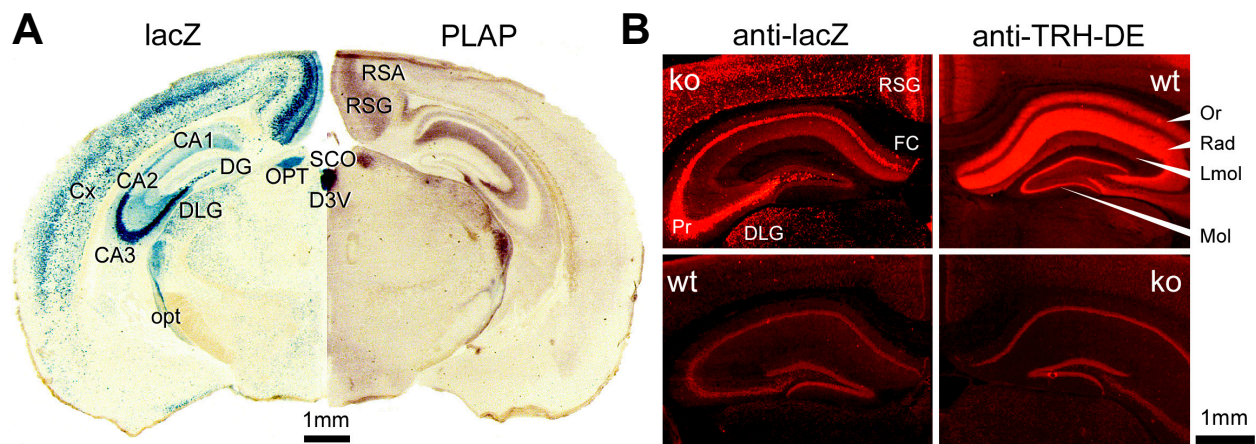
#### **Darstellung der Reporteraktivität**

Ein wesentliches Ziel bei der Generierung der TRH-DE *Knock-out* Maus war die Einführung von Reporteraktivitäten unter der Kontrolle des endogenen TRH-DE Promotors. Mit Blick auf die TRH-DE exprimierenden Neuronen des Zentralen Nervensystems sollten nicht nur deren Zellkörper markiert, sondern auch ihre Projektionen sichtbar gemacht werden. Es wurde daher die transkriptionelle Kopplung einer perinukleären  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit einer Membran-assoziierten alkalischen Phosphatase-Aktivität gewählt, um beiden Anforderungen zu entsprechen.

In 20  $\mu$ m Kryo-Gewebedünnschnitten adulter TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse konnte die Expression beider Reporterenzyme nachgewiesen werden. Der Vorteil der Doppelmarkierung konnte insbesondere an der Struktur des Hippocampus deutlich gemacht werden. Während durch die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Hippocampus hauptsächlich eine Anfärbung der kernreichen Pyramidalzellschicht möglich war, konnten durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase auch die zugehörigen molekularen Schichten gefärbt werden (Abb. 3.8[A]). Im Wesentlichen entsprach dabei die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung im *Knock-out* dem Signal der radioaktiven *in situ* Hybridisierung von TRH-DE mRNA im Wildtyp (vergl. Abb. 3.7). Eine Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen TRH-DE identifizierte das Enzym in den gleichen Regionen des Wildtyp Gehirns, die im *Knock-out* von der Membran-assoziierten alkalischen Phosphatase markiert wurden (Abb. 3.8 [B]).

Die Verteilung der Reporteraktivität war in den Geweben homozygoter und heterozygoter TRH-DE *Knock-out* Mäuse nicht von einander zu unterscheiden.





**Abbildung 3.8: Nachweis der Reporterexpression.**

**A.** Coronale 20 µm Kryo-Dünnschnitte aus dem adulten Gehirn einer TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus. Die perinukleäre β-Galaktosidase-Färbung (lacZ, linke Hemisphäre) identifiziert Zellkörper mit TRH-DE Promotoraktivität. Die Membran-assoziierte humane plazentare alkalische Phosphatase (PLAP, rechte Hemisphäre) erlaubt es, die Projektionen dieser Zellen zu verfolgen. Die stärkste Reporterexpression läßt sich dabei in Bereichen des Cortex, des Hippocampus und im subcommissuralen Organ nachweisen. **B.** Dünnschnitten von adulten wildtyp und *Knock-out* Tieren wurden jeweils mit Antikörpern gegen bakterielle β-Galaktosidase und TRH-DE inkubiert und anschließend mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Die Immunfärbung der β-Galaktosidase (lacZ) entspricht im *Knock-out* ihrem enzymatischen Nachweis in den Pyramidalzellen des Hippocampus. Die Immunfärbung von TRH-DE im Wildtyp bezieht sich dahingegen deutlich auf die molekularen Schichten des Hippocampus und liefert ein vergleichbares Signal wie die membrangebundene alkalische Phosphatase im *Knock-out*. Die jeweiligen Negativkontrollen zeigen einen unspezifischen Hintergrund, der auch bei alleiniger Inkubation des Gewebes mit dem Sekundärantikörper auftritt. **Abkürzungen:** CA1-3, hippocampale Felder; D3V, dorsaler dritter Ventrikel; DG, Gyrus dentatus; DLG; Ncl. geniculatus dorsolateralis; Lmol, Stratum lacunare; OPT, Nucleus praetectalis olivaris; opt, optischer Trakt; Or, Stratum oriens; Mol, Stratum moleculare (Gyrus dentatus); Pr, Stratum pyramidale (Hippocampus); Rad, Stratum radiatum; RSA, retrospleniale agranuläre Schicht; RSG, retrospleniale granuläre Schicht; SCO, subcommissurales Organ.



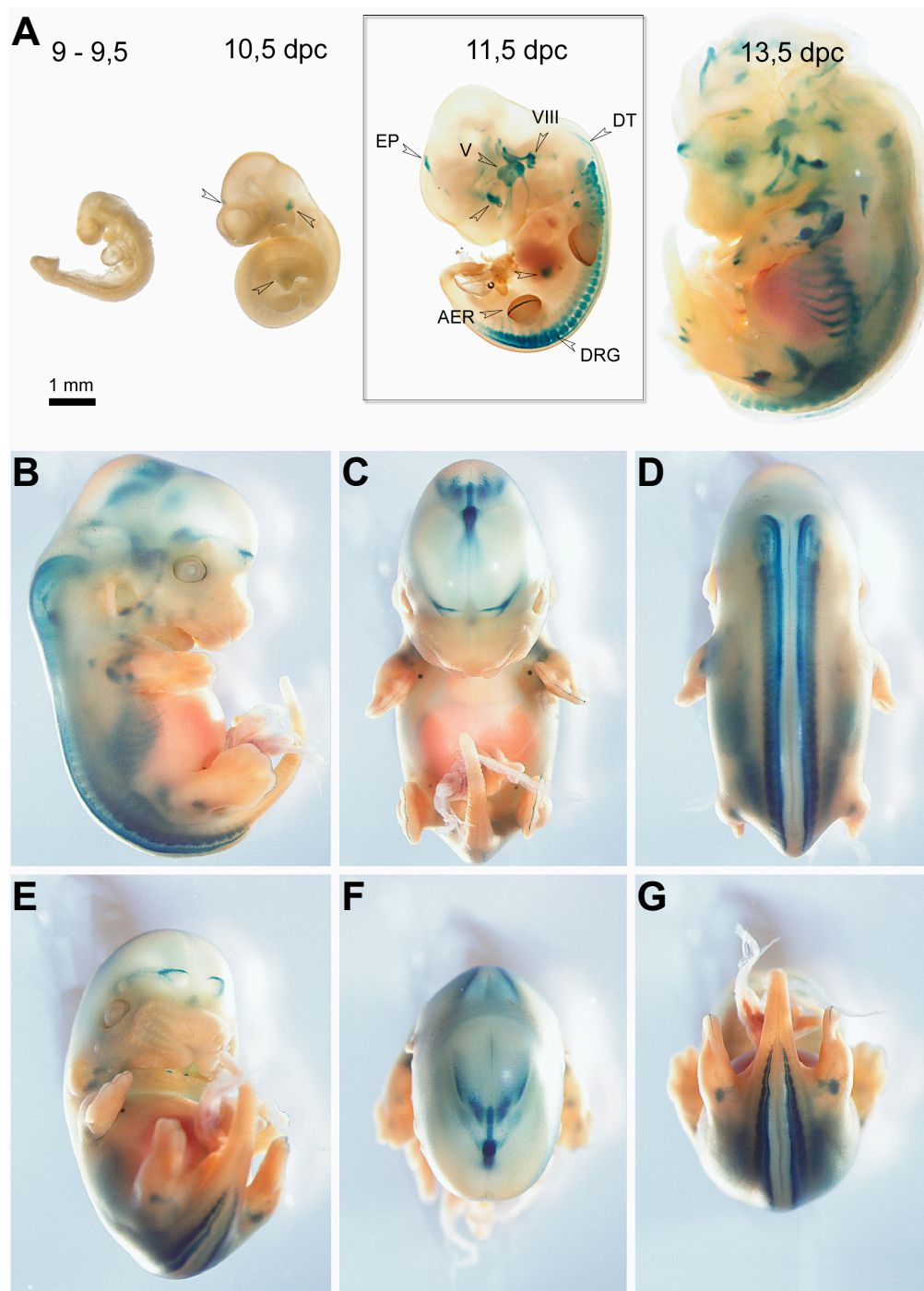
### Embryonale Verteilung der lacZ-Aktivität in Ganzpräparaten

Hetero- und homozygote Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien wurden als Ganzpräparate (*whole-mount*) mit Glutaraldehyd fixiert und anschließend für den enzymatischen Farbnachweis von bakterieller  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ-Färbung) verwendet (Abb. 3.9). Wildtyp Kontrollen zeigten in keinem der untersuchten Stadien unspezifische Färbung durch endogene  $\beta$ -Galaktosidasen.

Die Expression des lacZ-Reporters konnte in der Embryonalentwicklung homozygoter Tiere erstmalig **10,5 dpc** (*dies post coitum*) beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im entstehenden Trigeminalganglion sowie in einer Vertiefung zwischen den mes- und telencephalitischen Vesikeln detektiert. Eine Struktur unterhalb des Leberprimordiums wurde ebenfalls spezifisch angefärbt.

Bereits einen Entwicklungstag später (**11,5 dpc**) waren alle drei Äste des *Nervus trigeminus* deutlich hervorgehoben. Ein weiterer gefärbter Ganglienkomplex nahe der Ohranlage wurde dem *Nervus vestibulocochlearis* zugeschrieben. Die schon einen Tag zuvor aufgetretene Färbung zwischen Mes- und Telencephalon ließ sich nun besser bestimmen und konnte als Anlage der Epiphyse erkannt werden. Die Färbung unterhalb der Leber wurde dem Bereich zugeordnet, in dem sich die Gallenblase und der Pankreas entwickeln. Reporteraktivität konnte ab diesem Stadium auch in den dorsalen Wurzelganglien des Rückenmarks und im dorsalen Trakt festgestellt werden. Eine weitere sehr intensive Färbung ging an den Extremitäten von einer dünnen Leiste aus, die entlang der Grenzfläche des als ventral und dorsal determinierten Gewebes lag.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurde das Expressionsmuster des Reporters zunehmend komplexer (**12,5 dpc**; Abb. 3.9[B-G]). Zum Zeitpunkt **13,5 dpc** konnte in der Peripherie eine lacZ-Färbung in verschiedenen Bereichen der Extremitäten, insbesondere der Gelenk-Primordien, und entlang der Rippenbögen beobachtet werden. Neben der deutlich abgesetzten Pinealdrüse war im Gehirn die stärkste Färbung in Bereichen des Mesencephalon zu verzeichnen.



**Abbildung 3.9: Embryonale Verteilung der lacZ-Aktivität in Ganzpräparaten.**

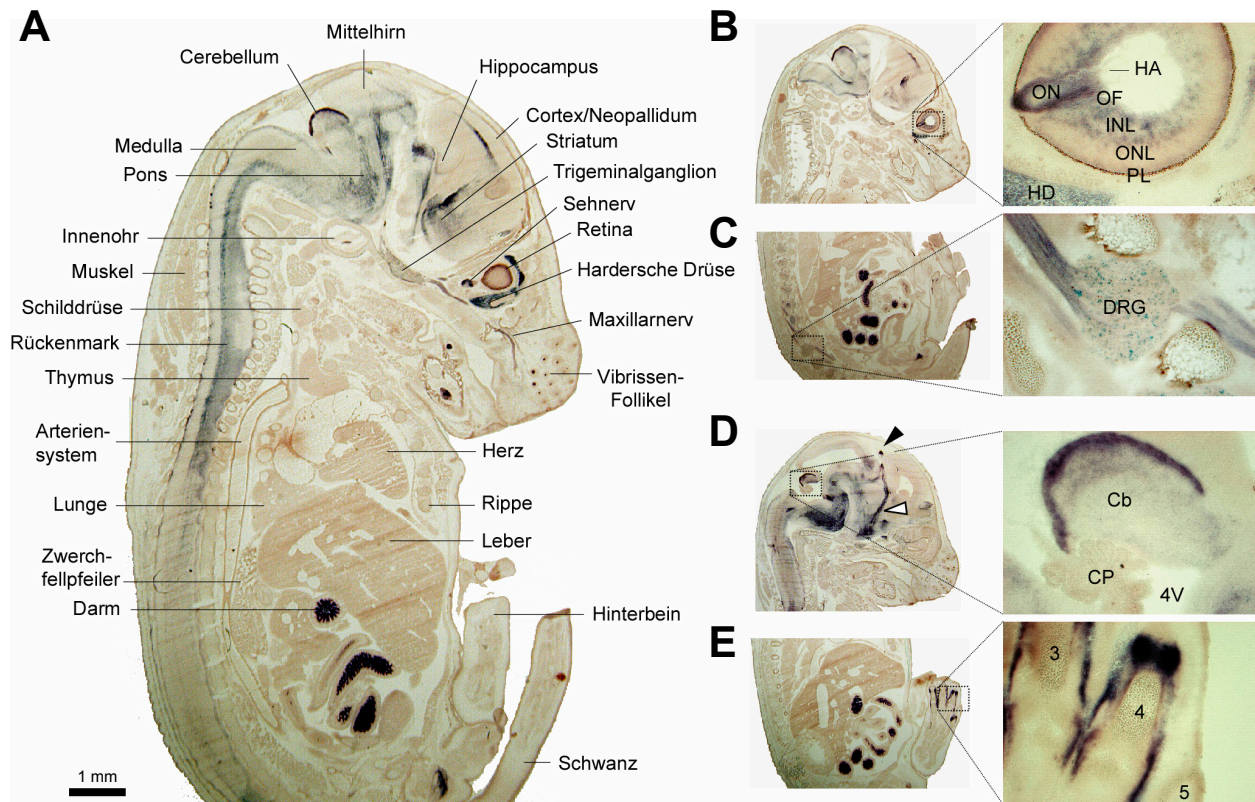
Glutaraldehyd fixierte transgene Embryonen wurden einer lacZ-Färbung unterzogen. **A.** Repräsentative Entwicklungsstadien wurden durch Klärung des Gewebes in Glycerin transparent gemacht. An Tag 11,5 pc konnten intensive Farbreaktionen in der Anlage der Pinealdrüse/Epiphyse (EP), im Trigeminalganglion (V), in den Ganglien des *Nervus vestibulocochlearis* (VIII), in den dorsalen Wurzelganglien (DRG), im dorsalen Trakt (DT), und in der apikalen ektodermalen Leiste (AER) der Extremitäten beobachtet werden. Eine Färbung nahe des Auges (evtl. Hardersche Drüse) und eine weitere unterhalb der Leber im Bereich von Gallenblase/Pankreas konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. **B-G.** Darstellung verschiedener Perspektiven eines lacZ-gefärbten Embryos (12,5 dpc) ohne vorherige Glycerinbehandlung (plastische Darstellung). Maßstab wie in (A).

### **Embryonale und neonatale Verteilung der lacZ- und PLAP-Aktivität**

Für die Untersuchung der TRH-DE Promotoraktivität in Embryonalstadien des letzten Trimesters und in Neugeborenen wurden entsprechende Kryotomschnitte entweder einer lacZ- bzw. PLAP-Färbung oder einer Kombination aus beiden unterzogen. Zwischen den Expressionsmustern hetero- und homozygoter Mutanten konnten keine Unterschiede festgestellt werden. In Mutanten und Wildtypen (ab 14,5 dpc) konnte eine auf das Darmepithel beschränkte endogene Aktivität von  $\beta$ -Galaktosidase und alkalischer Phosphatase beobachtet werden. Insbesondere die endogene Phosphataseaktivität im Darm konnte weder durch Fixierung, Hitze-denaturierung oder den Einsatz von Levamisol unterdrückt werden und war somit nicht von einer möglichen transgenen Aktivität zu unterscheiden. Alle anderen Gewebe waren dahingegen frei von endogenem Hintergrund.

Eine Übersicht über die Verteilung der Reporter-Aktivität zum Zeitpunkt **15,5 dpc** in der Embryonalentwicklung einer TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus ist in Abbildung 3.10 gegeben. Im ZNS ging in diesem Stadium eine starke Expression beider Reporter von der äußeren Körnerzellschicht des cerebellaren Primordiums aus. Weitere intensive Färbungen erstreckten sich von Bereichen des Hypothalamus über thalamische Regionen bis hin zu Pons und Medulla, von wo sie sich abgeschwächt über den gesamten ventralen Aspekt des Rückenmarks verteilten. Besonders auffällig erschien in medialsagittalen Schnitten die Färbung der Epiphyse, die über stark gefärbte Ausläufer rostral mit dem Hypothalamus und caudal mit dem subcommissuralen Organ verbunden war (Abb.3.10[D]). Wie schon in den früheren Stadien zeigten die dorsalen Wurzelganglien und das Trigeminalganglion eine deutliche Reporter-Aktivität, die sich allerdings nicht homogen auf alle Zellen dieser Strukturen erstreckte. Die Nervenfasern der Ganglien ließen sich durch die Aktivität des Membran-assoziierten PLAP gut verfolgen. Im Bereich des Auges wurden die inneren Schichten der Retina sowie der Sehnerv angefärbt. Die das Auge umgebende Hardersche Drüse zeigte eine der stärksten Reporter-Aktivitäten außerhalb des Gehirns. In den Extremitäten wurde an Finger- und Zehengliedern eine perichondriale Färbung beobachtet, die speziell zwischen den Gelenken ihre höchste Intensität hatte. Herz, Lunge, Leber und Niere sowie Skelettmuskulatur wiesen weder in diesem noch in einem späteren Stadium ein Signal auf.



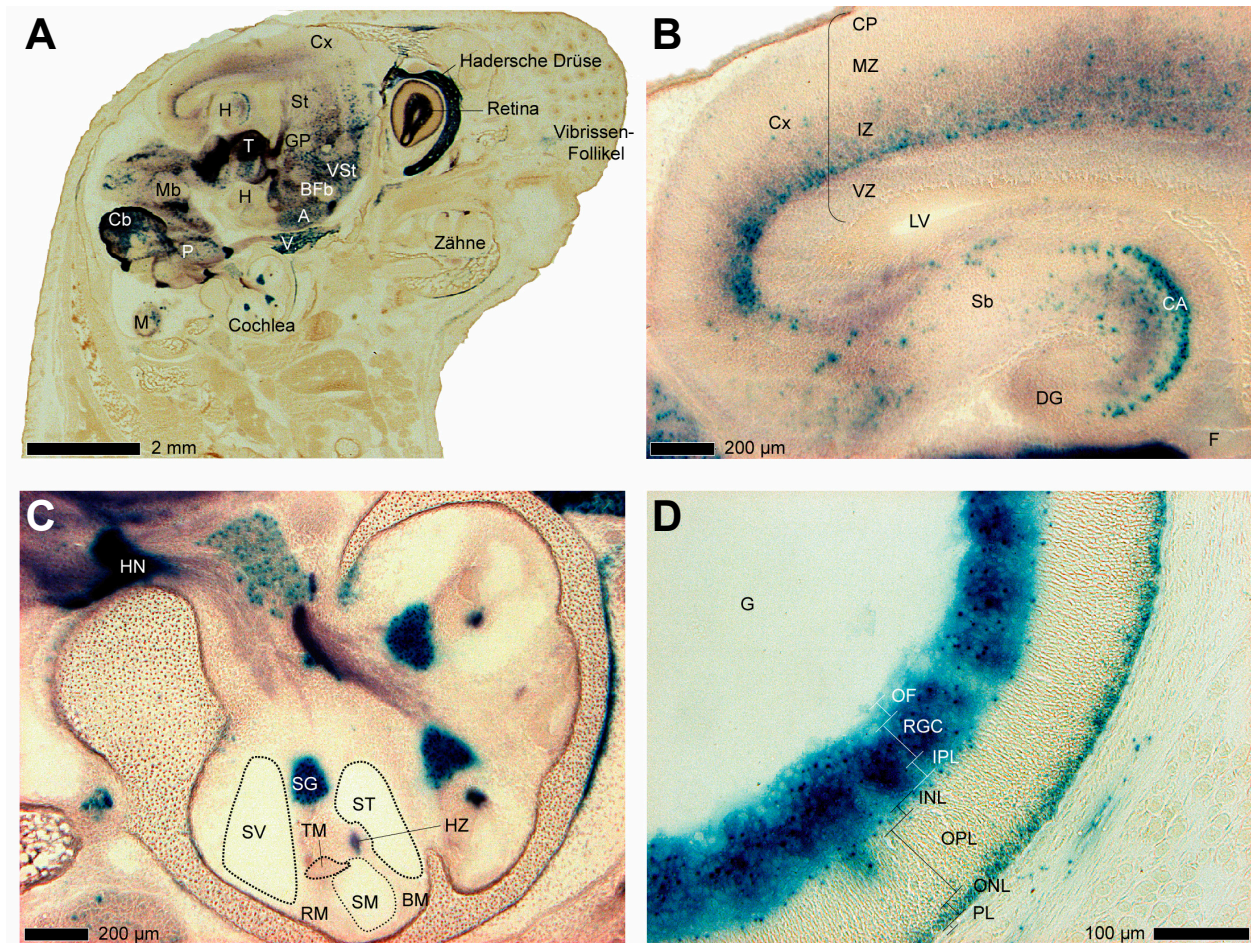


**Abbildung 3.10: Übersicht der lacZ- und PLAP-Aktivität an Embryonaltag 15,5.**

Sagittale 20 µm Kryo-Dünnschnitte eines TRH-DE<sup>-/-</sup> Embryos. Die Schnitte wurden sequentiell der lacZ- und PLAP-Färbung unterzogen. Endogene Phosphatasen wurden nach der lacZ-Färbung Hitze-inaktiviert. **A.** Die intensive Färbung (lacZ und PLAP) des Darmlumens wurde als einzige unspezifische Färbung auch in wildtyp Kontrollen beobachtet. In zahlreichen Strukturen des ZNS konnte die Aktivität beider Reporter spezifisch nachgewiesen werden. Durch den Membran-assoziierten PLAP-Reporter konnten neuronale Projektionen wie der Verlauf des Maxillarnervs ausgehend vom Trigeminalganglion deutlich dargestellt werden. **B.** Im Bereich des Auges wurden sowohl der optische Nerv (PLAP) als auch Zellen der inneren Kernschicht (lacZ) in der Retina markiert. Die Zellen der Hardersche Drüse zeigten eine auffällig hohe Aktivität der Reporter. **C.** In den dorsalen Wurzelganglien ließen sich einzelne lacZ-positive Zellen darstellen. Die Faserbündel der Ganglien wurden durch die PLAP-Aktivität angefärbt. **D.** In der Übersicht markiert ein schwarzer Pfeil die Epiphyse. Eine direkte Verbindung dieser Struktur mit dem Hypothalamus (weißer Pfeil) und dem subcommissuralen Organ (nicht markiert) wurde durch eine äußerst starke PLAP-Färbung hervorgehoben. Im cerebellaren Primordium ging die intensivste Färbung (lacZ und PLAP) von den Zellen der äußeren Körnerzellschicht aus. **E.** In den Extremitäten konnte an Fingern und Zehen eine perichondriale Färbung ausgemacht werden, die in den Bereichen der Gliedgelenke am stärksten ausgeprägt war. **Abkürzungen:** **(B)** ONL, äußere Kernschicht; HA, Hyloidarterie; HD, Hardersche Drüse; INL, innere Kernschicht; OF, optische Faserschicht; OP, optischer Nerv; PL, pigmentierte Schicht. **(C)** DRG, dorsales Wurzelganglion. **(D)** 4V, vierter Ventrikel; Cb, Cerebellum; CP, Choroid Plexus. **(E)** 3-4, Position der Zehen.

In der neugeborenen TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus (**P0**, Übersicht Abb. 3.11) war die allgemeine Verteilung der Reporter-Aktivität immer noch gut mit der Situation an Embryonaltag 15,5 zu vergleichen. Das Cerebellum und einzelne hypothalamische und thalamische Bereiche, wiesen im Gehirn der neugeborenen Maus die höchsten Aktivitäten beider Reporter auf. Im Hippocampus konnte bereits die Pyramidalzellschicht in allen Feldern des *Cornu Ammonis* anhand der lacZ-Färbung identifiziert werden und auch eine erste molekulare Schicht wurde durch die PLAP Färbung hervorgehoben. Im Cortex konzentrierten sich die Zellen mit TRH-DE Promotoraktivität noch überwiegend im Grenzbereich zwischen ventrikulärer und intermediärer Zone. Ihre Projektionen ließen sich allerdings schon bis in die marginale Zone verfolgen. In der Peripherie konnte die Expression der Reporter besonders in den neuronalen Anlagen von Auge und Ohr gut zugeordnet werden, da bereits weitestgehend alle Elemente zu erkennen waren. Es ließ sich zum einen sowohl der Hör- als auch der Sehnerv durch eine intensive PLAP-Färbung markieren. Zum anderen konnten innerhalb der Cochlea (Abb. 3.11[C]) die Spiralganglien und innerhalb der Retina (Abb. 3.11[D]) die retinale Ganglienzellschicht durch lacZ-Aktivität gefärbt werden. Auch die eigentlichen Sinneszellen, die Haarzellen des Cortischen Organs sowie die Zellen der äußeren Kernschicht der Retina, aus der später die Photorezeptorzellen hervorgehen, wurden durch die Reporter angefärbt.



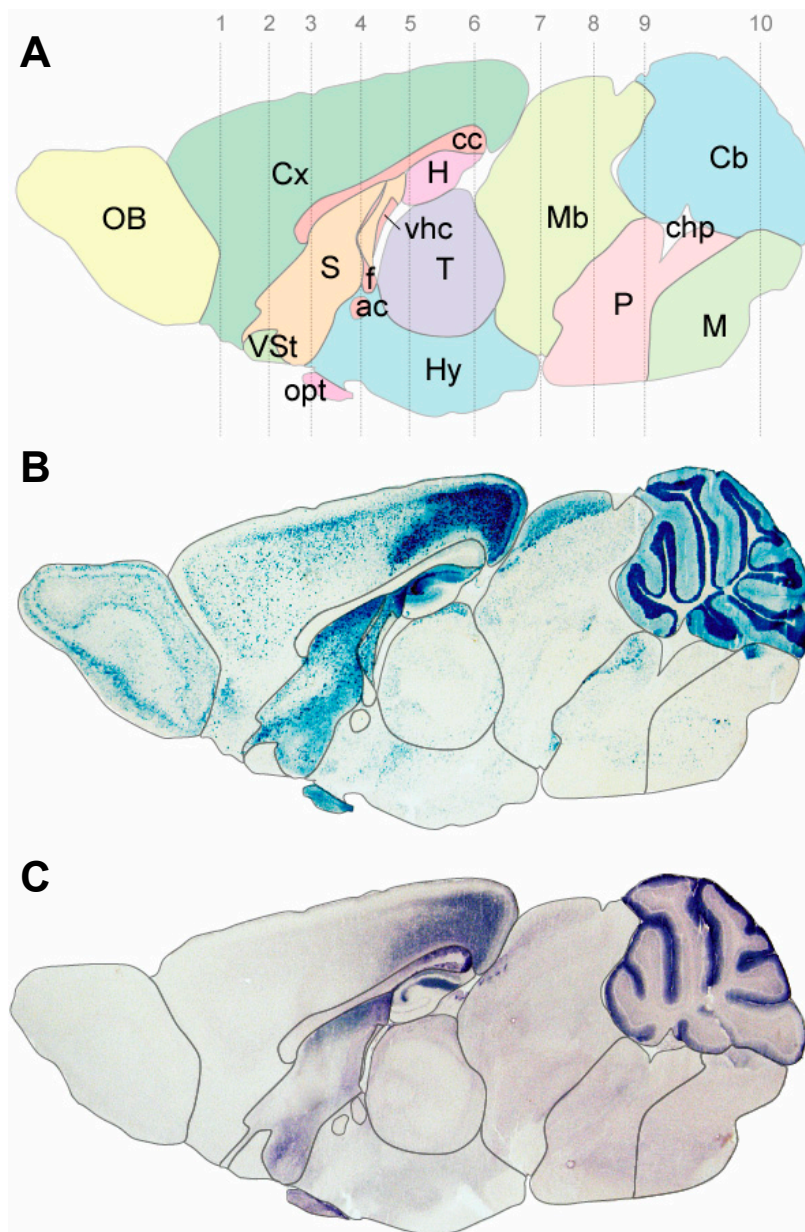


**Abbildung 3.11: Übersicht der lacZ- und PLAP-Aktivität in der neugeborenen Maus.**

Lateralsagittale 20 µm Kryo-Dünnschnitte einer neugeborenen TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus (Kopfbereich). **(A)-(C)** Doppelfärbung wie in **Abb. 10**. **(D)** lacZ-Färbung. **A.** Neben dem Cerebellum zeigten Teile des Thalamus die stärkste Färbung im Gehirn. Weitreichende Projektionen ließen sich insbesondere im Cortex sowie als Faserbündel im Bereich des Trigeminalganglions und der Cochlea identifizieren. **B.** Der Hippocampus zeigte eine intensive lacZ-Färbung in der Struktur des Cornu Ammonis. Im Cortex wurden Zellen gefärbt (lacZ), die ihren Ursprung in der untersten Schicht der intermediären Zone hatten. Ihre Projektionen (PLAP) durchzogen die intermediäre Zone vollständig. **C.** In der Cochlea wiesen die Haarzellen im Cortischen Organ sowie die Spiralganglien und der Hörnerv eine deutliche Färbung auf. **D.** Im Auge konnte lacZ-Aktivität in den retinalen Ganglienzellen sowie der inneren und äußeren Kernschicht detektiert werden. **Abkürzungen:** **(A)** A, Amygdala; BFb, basales Vorderhirn; Cb, Cerebellum; Cx, Cortex/Neopallidum; GP, Globus pallidus; H, Hippocampus; M, Medulla; Mb, Mittelhirn; P, Pons; St, Striatum; T, Thalamus; V., Trigeminalganglion; VSt, ventrales Striatum. **(B)** CA, Cornu Ammonis; Cp, cortikale Platte; Cx, Cortex/Neopallidum; DG, Dentatus gyrus; F, Fornix; IZ, intermediäre Zone; LV, Lateralventrikel; MZ, marginale Zone; Sb, Subiculum; VZ, ventrikuläre Zone. **(C)** BM, Basalmembran; HN, Hörnerv, HZ, Haarzellen; RM, Reissner-Membran; SG, Spiralganglion; ST, Scala tympani; SM, Scala media; SV, Scala vestibuli; TM, Tektorialmembran. **(D)** G, Glaskörper; INL, innere Kernschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; OF, optische Faserschicht; ONL, äußere Kernschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; PL, Pigmentschicht; RGC, retinale Ganglienzellen.

### Adulte Verteilung der lacZ- und PLAP-Aktivität im Gehirn

Um eine möglichst umfassende Kartierung der TRH-DE Promotor-Aktivität im adulten Gehirn zu erreichen, wurden sagittale (Abb. 3.12) und coronale (Abb. 3.13) Kryo-Dünnschnitte alternierend nach dem lacZ- bzw. PLAP-Protokoll gefärbt. Während insgesamt eine gute Übereinstimmung mit bestehenden *in situ* Hybridisierungs-Daten gezeigt werden konnte, ermöglichte der spezifische Nachweis des lacZ-Reporters im Gehirn zusätzlich auch eine eindeutige Identifizierung von Zellen mit schwacher TRH-DE Promotoraktivität. Die Verteilung und Intensität der lacZ-Färbung in den einzelnen Hirnarealen und Kerngebieten wurde subjektiv beurteilt und in Tabelle 1 zusammengefasst. Generell gab es keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Expressionsmustern bei hetero- und homozygoten Tieren.



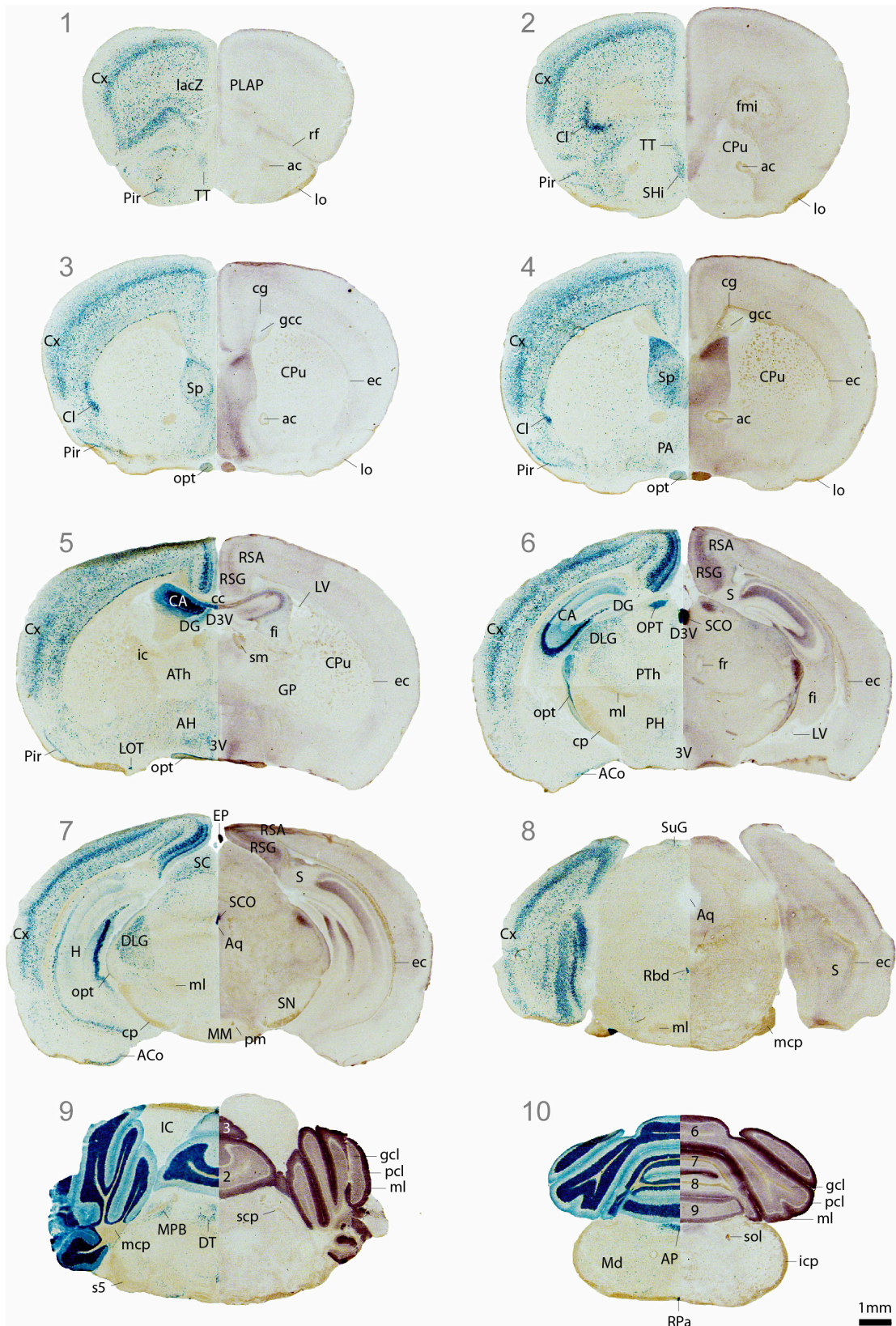
**Abbildung 3.12: Übersicht der lacZ- und PLAP-Aktivität im adulten Gehirn (sagittal).**

Sagittale 20  $\mu$ m Kryo-Dünnschnitte durch das Gehirn einer adulten TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus. **A.** Schematische Darstellung anatomischer Hirnstrukturen. Dünne vertikale Linien markieren die ungefähre Position der coronalen Schnitte in **Abb. 3.13**.

**B.** Verteilung der lacZ-Aktivität. **C.** Verteilung der PLAP-Aktivität.

**Abkürzungen:** (A) ac, anteriore Commissur; Cb, Cerebellum; cc, Corpus callosum; chp, choroidaler Plexus, Cx, Cortex; f, Fornix; H, Hippocampus; Hy, Hypothalamus; M, Medulla; Mb, Mittelhirn; OB, olfaktorischer Bulbus; opt, optischer Nerv; P, Pons, S, Septum; T, Thalamus; vhc, ventrale hippocampale Commissur; VSt, ventrales Striatum.





**Abbildung 3.13: Übersicht der lacZ- und PLAP-Aktivität im adulten Gehirn (coronal).**

Coronale 20 µm Kryo-Dünnschnitte aus dem Gehirn einer adulten TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus. Die lacZ-Färbung der linken Hirnhälfte wurde jeweils der PLAP-Färbung der rechten Hirnhälfte gegenübergestellt. Die Schnitte sind entsprechend ihrer Position in **Abb. 3.12** nummeriert. **Abkürzungen:** (umseitig).



**Abbildung 3.13: Übersicht der lacZ- und PLAP-Aktivität im adulten Gehirn (coronal)**

**Abkürzungen:** [2, 3, 6-9], cerebellare Lobuli; 3V, dritter Ventrikel; ac, anteriore Commissur; AH, Area hypothalamica anterior; ACo, Ncl. amygdaloideus corticalis; AP, Area postrema; Aq, Aquädukt; ATh, Area thalamica anterior; CA, Cornu Ammonis; cc, Corpus callosum; Cl, Claustrum; cg, Cingulum; cp, Pedunculus cerebialis basalis; CPu, Caudatus putamen (Striatum); Cx, Cortex; D3V, dorsaler dritter Ventrikel; DLG, Ncl. geniculatus dorsolateralis; DG, Gyrus dentatus; DT, Ncl. tegmentalis dorsalis; ec, externe Kapsel; EP, Epiphyse; fi, Fimbria hippocampi; fmi, Forceps minor; fr, Fasciculus retroflexus; gcc, Corpus callosum (genu); gcl, Lamina granularis (Cerebellum); GP, Globus pallidum; H, Hippocampus; ic, interne Kapsel; IC, Colliculus inferior; icp, Pedunculus cerebellaris inferior; lo, lateraler olfaktorischer Trakt; LOT, Ncl. tractus olfactorius lateralis; LV, lateraler Ventrikel; mcp, Pedunculus cerebellaris medius; Md, Medulla; ml, Lamina molecularis (Cerebellum); MM, Mammillarkörper; MPB, Ncl. parabrachialis medialis; opt, optischer Nerv (II); OPT, Nucleus praetectalis olivaris; PA, Area praeoptica; pcl, Purkinjzellschicht (Cerebellum); PH, Area hypothalamica posterior; Pir, Cortex piriformis; pm, tractus mammillaris princeps; PTh, Area thalamica posterior; Rbd, Ncl. rhabdoideus; RPa, Ncl. raphe pallidus; rf, rhinale Fissur; RSA, Cortex agranularis retrosplenialis; RSG, Cortex granularis retrosplenialis granularis; S, Subiculum; s5, sensorische Wurzel des Trigeminalnervs; SC, Superior colliculus; SCO, subcommissurales Organ; sep, Pedunculus cerebellaris superior; SHi, Nucleus septohippocampalis; Sm, Stria medullaris (Thalamus); SN, Substantia nigra; sol, Tractus solitarius; Sp, Septum; SuG, Lamina grisea superficialis (Superior colliculus); TT, Taenia tecta.

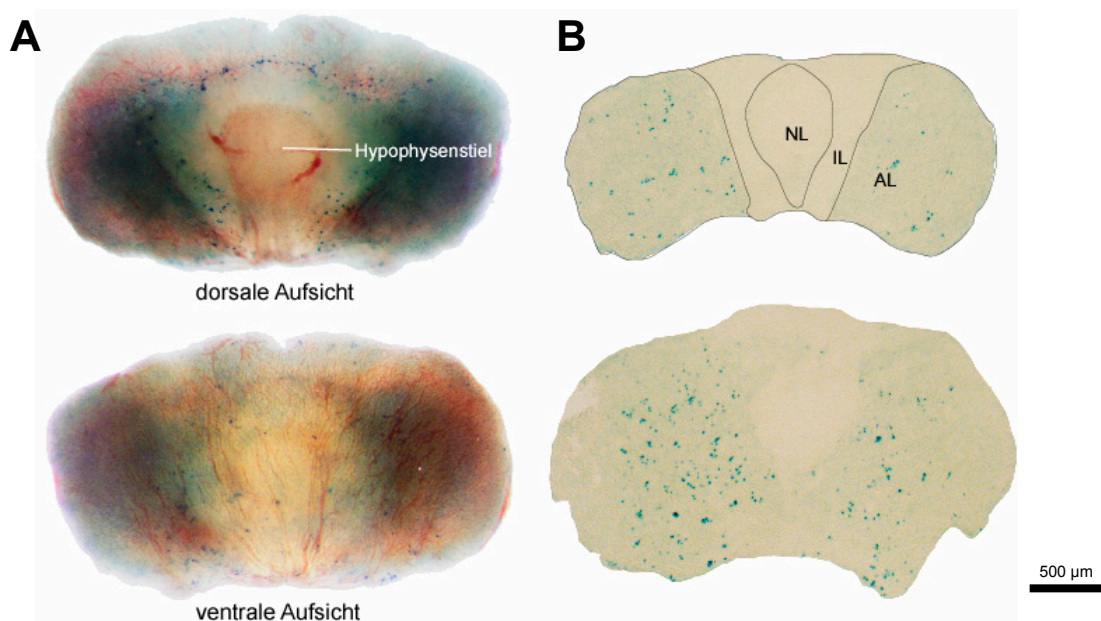
<b>Rhinencephalon</b>		<b>Diencephalon</b>	
<i>Bulbus Olfactorius</i>		<i>Hypothalamus</i>	
Lamina glomerulosa	++	Area hypothalamica anterior	++
Lamina plexiforma externa	++++	Area hypothalamica lateralis	++*
Lamina mitralis	+++	Area hypothalamica posterior	++
Lamina plexiforma interna	+++	Ncl. arcuatus hypothalami, pars dorsalis	++*
Lamina granularis	++	Ncl. arcuatus hypothalami, pars ventralis	++*
Ncl. olfactorius anterior	+++	Ncl. hypothalamicus dorsomedialis	++
Bulbus olfactorius accessorius	+++++	Ncl. hypothalamicus ventromedialis	+++
<b>Telencephalon</b>		Ncl. paraventricularis hypothalami	+++
<i>Cortex cerebri</i>		Ncl. periventricularis hypothalami	++*
Lamina 1	-	Ncl. praeopticus anterodorsalis	++*
Lamina 2	+	Ncl. praeopticus medialis	++
Lamina 3	+++	Ncl. supraquiasmaticus	-
Lamina 4	+++++	Ncl. supramammillaris	-
Lamina 5	+++*	Ncl. supraopticus	-
Lamina 6a	+++(+)	<b>Mesencephalon</b>	
Lamina 6b	+	Ncl. commissurae posterioris	-
Lamina 7 (Subplate)	+++	Ncl. Darkschewitsch	++*
Cortex agranularis insularis	+++*	Ncl. geniculatus dorsolateralis	+++
Cortex granularis retrosplenialis	+++++	Ncl. geniculatus medialis	+++
Cortex perirhinalis	-	Ncl. interpedunculus intermedialis	+++
Cortex entorhinalis	++	Ncl. interpedunculus dorsolateralis	+++
Cortex piriformis	+++	Ncl. oculomotorius accessorius, p. med.	+
Cortex endopiriformis dorsalis	++*	Ncl. praetectalis olivaris	+++++
Ncl. tractus olfactorius lateralis	+++++	Ncl. rapidoideus	+++
Taenia tecta	++*	Ncl. tractus opticus	++*
<i>Septum</i>		Substantia grisea centralis mesencephali	+
Ncl. parastriatalis	-	Substantia nigra	
Ncl. septi lateralis, pars dorsalis	++++	Pars compacta	++
Ncl. septi lateralis, pars intermedialis	+++	Pars reticulata	++
Ncl. septi lateralis, pars ventralis	++	Superior colliculi	
Ncl. septi medialis	+	Lamina grisea superficialis	+++
Ncl. septi triangularis	+++	Stratum opticum	++*
Ncl. septofimbrialis	+++	Lamina grisea intermedialis	++**
Ncl. septohippocampalis	+++	Lamina alba intermedialis	++**
Stria diagonalis (Broca)	+	Lamina grisea profunda	++*
<i>Basalganglien</i>		Inferior colliculi	
Caudatus Putamen	+++**	Cortex dorsalis	++*
Clastrum	++++	Stratum album mediale	-
Ncl. parasubthalamicus	++*	<b>Cerebellum</b>	
<i>Amygdala/erweiterte Amygdala</i>		Lamina granularis	++++
Area amygdalohippocampalis	-	Lamina molecularis	+++**
Area transitoria cortico-amygdalaris	-	Purkinjenzellschicht	-
Ncl. accumbens, Kern	+++**	Ncl. lateralis cerebelli	-
Ncl. accumbens, Schale	+++**	Ncl. interpositus cerebelli	-
Ncl. amygdaloideus basomedialis	++*	Ncl. medialis cerebelli	-
Ncl. amygdaloideus centralis	++*	<b>Medulla oblongata</b>	
Ncl. amygdaloideus corticalis	+++	Barrington's Ncl.	-
Ncl. amygdaloideus intercalatus	++	Lamina cochlearis granularis	+++
Ncl. amygdaloideus lateralis	++	Locus coeruleus	-
Ncl. amygdaloideus medialis	++*	Ncl. ambiguus	-
Ncl. interstitialis striae terminalis	++*	Ncl. cochlearis dorsalis	+++**
Ncl. commissurae anterior	++	Ncl. cochlearis ventralis	+++**
<i>Hippocampus</i>		Ncl. nervi hypoglossi	-
CA1	++	Ncl. olivaris inferior	++++**
CA2	++++	Ncl. prepositus hypoglossi	-
CA3	+++++	Ncl. parabrachialis medialis	+++*
Subiculum	+++**	Ncl. parabrachialis lateralis	++*
Parasubiculum	+++	Ncl. raphe dorsalis	-
Praesubiculum	+++**	Ncl. raphe linearis	-
Gyrus dentatus		Ncl. raphe medianus	-
Lamina granulosa	-	Ncl. raphe obscurus	+++*
Lamina moleculare	+	Ncl. raphe pallidus	++++
Lamina polymorpha	+++*	Ncl. raphe paramedianus	++
ventraler Gyrus dentatus	-	Ncl. reticularis lateralis	-
<b>Diencephalon</b>		Ncl. spinalis nervi trigemini	++
<i>Habenula</i>		Ncl. tegmentalis laterodorsalis	-
Ncl. habenulae lateralis	++	Ncl. tegmentalis dorsalis	+++*
Ncl. habenulae medialis	+++	Ncl. tractus solitarius	+++
<i>Epithalamus</i>		Ncl. trigeminalis mesencephali	-
Glandula pinealis	+++++	Ncl. vestibularis medialis	+
<i>Thalamus</i>		Ncl. vestibularis lateralis	-
Ncl. reuniens thalami	++*	Ncl. vestibularis descendens (spinalis)	-
Ncl. thalamicus centralis medialis	-	<b>Ventrikel und Circumventriculare Organe</b>	
Ncl. thalamicus mediodorsalis	++*	Choroid Plexus	-
Ncl. thalamicus paraventricularis	-	Ependym der Ventrikel u. d. Aquädukts	-
Ncl. thalamicus reticularis	-	Area postrema	+++
Ncl. thalamicus rhomboideus	-	Eminentia mediana	-
Ncl. thalamicus subparafascicularis	++	Organum subcommissurale	+++++
Ncl. thalamicus ventralis posterior	++*	Organum subfornicale	-
Ncl. thalamicus xiphoid	-	Organum vasculosum laminae terminalis	-

Färbungsintensität: [-] kein Signal; [+] schwach; [+++] gering; [++++] mittel; [+++++] stark; [+++++] maximal; [\*] verteilt (< 50 %); [\*\*] vereinzelt (< 10 %)

**Tabelle 1:** TRH-DE Promotor kontrollierte lacZ-Expression im adulten Gehirn.

### Adulte Verteilung der lacZ-Aktivität in der Hypophyse

Die Lokalisierung der Reporteraktivität in Ganzpräparaten und Kryo-Dünnschnitten der adulten Hypophyse sollte helfen, die Identität der TRH-DE exprimierenden Zellen aufzuklären. Während in Ganzpräparaten der drei-dimensionale Zusammenhang bewahrt wurde und zudem eine gute Abbildung der hypophysären Blutgefäße möglich war, konnte in Kryo-Dünnschnitten eine übersichtlichere Darstellung des Expressionsmusters gezeigt werden (Abb. 3.14). Der Nachweis von lacZ in der Hypophyse wies aufgrund der niedrigen TRH-DE Promotoraktivität ein weniger robustes Signal auf als im Gehirn. Obwohl die Verteilung des Signals in unabhängigen Experimenten ähnliche Ergebnisse zeigte, waren große Schwankungen bei der Intensität der Färbung zu beobachten. Die Expression von lacZ in TRH-DE<sup>-/-</sup> Hypophysen ähnelte dem Nachweis von thyrotropen Zellen. Die gleichen Beobachtungen wurden auch bei lacZ-gefärbten Hypophysen aus TRH-R1<sup>-/-</sup> Tieren gemacht (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.14: Verteilung der lacZ-Expression in der Hypophyse.**

**A.** Glutaraldehyd fixiertes Ganzpräparat einer adulten männlichen TRH-DE<sup>-/-</sup> Hypophyse. Das Gewebe wurde einer lacZ-Färbung unterzogen und anschließend in Glycerin geklärt. Deutlich ließen sich die portalen Gefäße und das feine Kapillarnetz des Gewebes darstellen. Die Aktivität des lacZ-Reporters blieb auf vereinzelte Zellen beschränkt.

**B.** In 16 µm Kryo-Dünnschnitten einer adulten männlichen TRH-DE<sup>-/-</sup> Hypophyse konnte durch die lacZ-Färbung ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei der Anfärbung thyrotroper Zellen beobachtet werden. Der obere Schnitt entstammt dem Hypophysendach, der untere dem Hypophysenboden. **Abkürzungen:** AL, Vorderlappen (Adenohypophyse, *anterior lobe*); IL, Zwischenlappen, (*intermediate lobe*); NL, Hinterlappen (Neurohypophyse, *neural lobe*).

### 3.3 Vergleichende Darstellung des TRH-Systems im adulten Gehirn

#### ***In situ* Hybridisierung des TRH-Systems im adulten Gehirn**

Mit Hilfe der radioaktiven *in situ* Hybridisierung wurden die vier Komponenten des murinen TRH-Systems in ausgewählten coronalen Hirnschnitten dargestellt und auf Unterschiede zwischen TRH-DE *Knock-out* und Wildtyp untersucht (Abb. 3.15). Die Schnitte wurden mit Sonden spezifisch für TRH-DE, präproTRH, TRH-R1 und TRH-R2 hybridisiert und anschließend für vier Tage auf einem hochauflösendem Film exponiert. In TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen konnten keine Transkripte von TRH-DE nachgewiesen werden. Eine Veränderung in der Expression von präproTRH und TRH-R1 war mit dieser Methode nicht zu beobachten. Allerdings war die Expression von TRH-R2 besonders im Cortex und in den vorderen thalamischen Regionen des TRH-DE<sup>-/-</sup> Gehirns signifikant erhöht.

#### **Abbildung 3.15: ISH-Darstellung des TRH-Systems im adulten Gehirn. ( nächsten Seite)**

Coronale 25 µm Kryo-Dünnschnitte aus dem Gehirn einer adulten männlichen TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus (ko) wurden mit cRNA Sonden gegen TRH-DE, präproTRH, TRH-R1 und TRH-R2 hybridisiert und der jeweiligen wildtyp Kontrolle (wt) gegenübergestellt (Autoradiogramm nach vier Tagen Exposition). In den Gehirnschnitten der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus konnten keine Transkripte des TRH-DE Gens nachgewiesen werden. Während die Expression von präproTRH und TRH-R1 keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp zeigte, konnte eine drastisch erhöhte Expression von TRH-R2 im *Knock-out* Gehirn festgestellt werden.

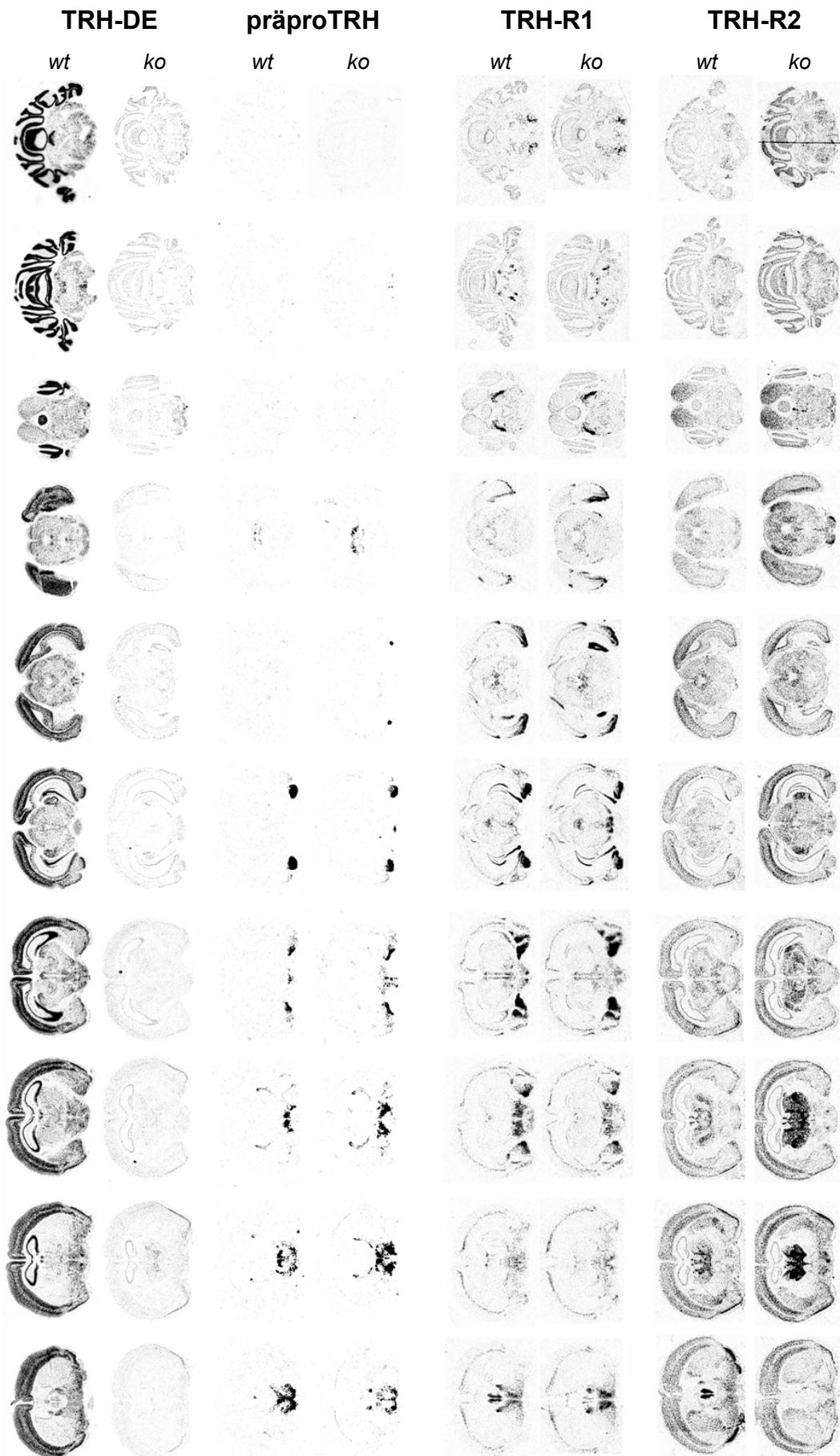
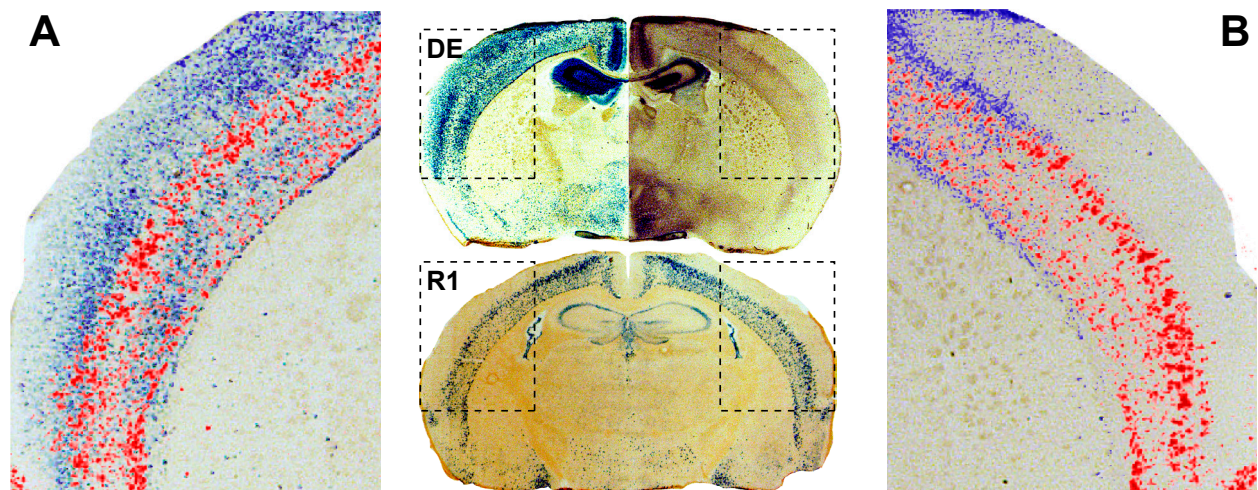


Abbildung 3.15: ISH-Darstellung des TRH-Systems im adulten Gehirn.

### Vergleich von TRH-DE und -R1 Promotoraktivität in Cortex und Cerebellum

In hypothalamischen Bereichen und im limbischen System wird vorwiegend der Rezeptor TRH-R1 zusammen mit TRH-DE exprimiert, wohingegen die Expression in Thalamus, Cortex und Cerebellum eine Domäne des Rezeptors TRH-R2 ist. Im Cortex und im Cerebellum überlagern die Expressionsmuster von TRH-R2 und TRH-DE weitestgehend (vergl. Abb. 3.15). Um die unterschiedlichen Funktionen der beiden nicht überlappend exprimierten Rezeptoren besser zu verstehen, wurde die Verteilung der TRH-R1 Promotoraktivität relativ zur TRH-DE Promotoraktivität in Bereichen des Cortex und des Cerebellums eingehend untersucht.

In den Bereichen des Isocortex konnte in TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen eine intensive lacZ-Färbung stellvertretend für die Aktivität des TRH-R1 Promotors in Lamina V dargestellt werden. Diese bewegte sich exakt zwischen den Schichten, in denen wiederum die stärkste Aktivität des TRH-DE Promotors im Cortex von TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren demonstriert werden konnte (Abb. 3.16[A]). Der Nachweis von Membran-assoziiierter PLAP-Aktivität stellvertretend für die Projektionen von Nervenzellen mit aktiviertem TRH-DE Promotor, ließ sich dahingegen in Lamina V und tieferen Schichten mit der Expression von lacZ unter der Kontrolle des TRH-R1 Promotors überlagern (Abb. 3.16[B]).

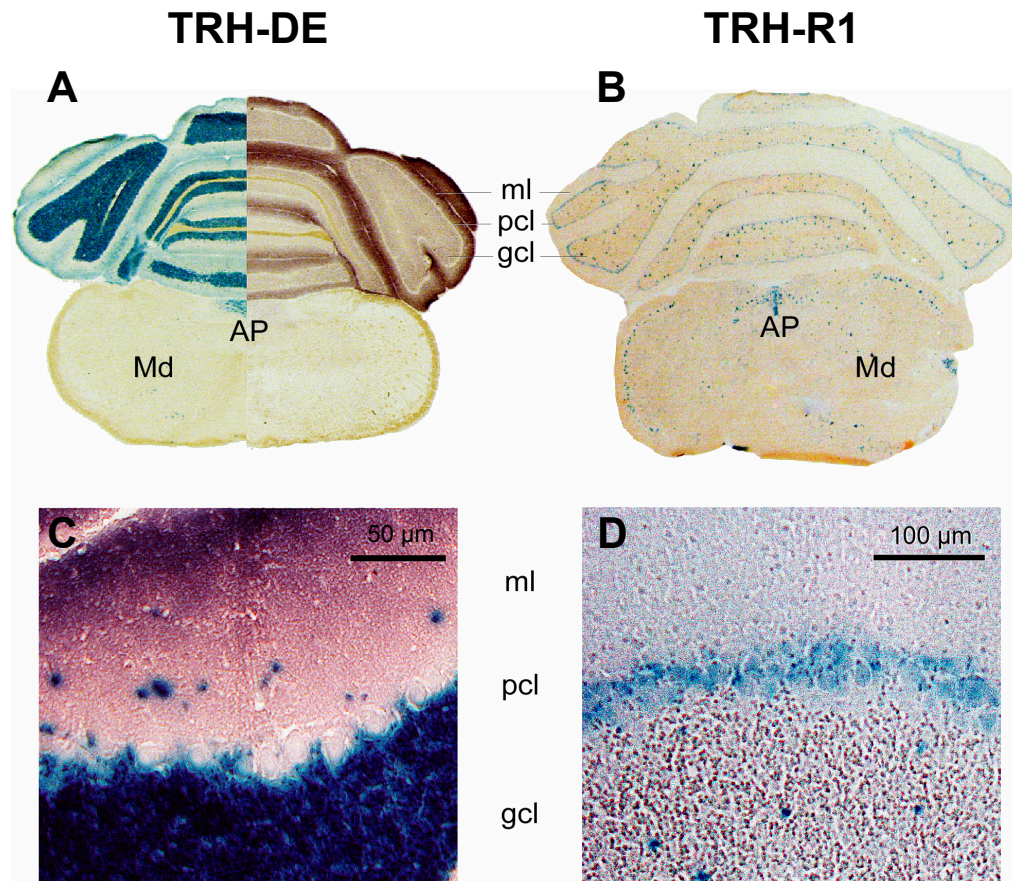


**Abbildung 3.16: Überlagerung von TRH-DE und -R1 Promotoraktivität im Cortex.**

Im Isocortex der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus (DE) säumen stark lacZ-exprimierende Schichten wie zwei Bänder eine mittlere Schicht (Lamina V), in der nur vereinzelte Zellen Reportersignal aufweisen. Die PLAP-Färbung zeigt, daß in dieser Schicht zahlreiche Projektionen von Zellen mit TRH-DE Promotoraktivität zusammenlaufen. Auch das lacZ-Signal in der TRH-R1<sup>-/-</sup> Maus (R1) ist in Lamina V am stärksten ausgeprägt. **A.** Überlagerung des lacZ-Signals im Cortex der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus (blau) mit dem lacZ-Signal aus der TRH-R1<sup>-/-</sup> Maus (rot). **B.** Überlagerung des PLAP-Signals im Cortex der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus (violett) mit dem lacZ-Signal aus der TRH-R1<sup>-/-</sup> Maus (rot).



Bei der Betrachtung der Reporteraktivitäten im dreischichtigen cerebellaren Cortex von TRH-DE<sup>-/-</sup> und -R1<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 3.17) konnte ein aktiver TRH-R1 Promotor in den Purkinje-Zellen gezeigt werden. Diese Zellen, in denen selbst kein TRH-DE nachgewiesen werden konnte, werden von den Parallelfasern der Körnerzellen kontaktiert. Die Körnerzellen ihrerseits ließen sich über die starke Expression von lacZ in der Körnerzellschicht und eine korrespondierende Expression von PLAP in der molekularen Schicht in Gehirnen von TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren identifizieren.



**Abbildung 3.17: TRH-DE und -R1 Promotoraktivität im Cerebellum.**

(A)-(B) Übersicht coronaler 20 µm Kryo-Dünnschnitte aus dem adulten Gehirn einer TRH-DE bzw. -R1 *Knock-out* Maus. (C)-(D) Ausschnittsvergrößerung des cerebellaren Cortex. **A.** Im Cerebellum der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus konnte sowohl die Körnerzellschicht (linke Hemisphäre, lacZ) als auch die molekulare Schicht (rechte Hemisphäre, PLAP) jeweils intensiv angefärbt werden. Die Purkinje-Zellschicht blieb in beiden Fällen ungefärbt. **B.** In der TRH-R1<sup>-/-</sup> Maus konnte neben verstreuten Zellen in der Körnerzellschicht speziell die Purkinje-Zellschicht durch eine lacZ-Färbung dargestellt werden. **C.** Doppelgefärbter Ausschnitt aus dem cerebellaren Cortex der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus. Die Purkinje-Zellen zeigten keine TRH-DE Promotoraktivität. In der PLAP-gefärbten molekularen Schicht konnten einzelne lacZ-gefärbte Zellkörper identifiziert werden. **D.** In der Vergrößerung konnte die lacZ-Färbung im cerebellaren Cortex der TRH-R1<sup>-/-</sup> Maus eindeutig den Purkinje-Zellen zugeordnet werden. **Abkürzungen:** AP, Area postrema; gcl, Körnerzellschicht; Md, Medulla; ml, Stratum moleculare; pcl, Purkinje-Zellschicht.

### 3.4 Endokrinologische Analyse

#### Gegenüberstellung von TRH-DE<sup>-/-</sup> und TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen

Im Hinblick auf die TRH-DE defiziente Maus waren insbesondere die endokrinologischen Konsequenzen von großem Interesse. Der Effekt von TRH auf die thyrotropen und laktotropen Zellen der Hypophyse konnte in einer Maus charakterisiert werden, in der das Peptidsignal TRH nicht mehr effizient durch eine geeignete Peptidase kontrolliert wurde. Der erwartete Zustand der hypophysiotropen Überreizung durch nicht abbaubares TRH wurde mit der endokrinen Situation in der TRH-R1 defizienten Maus (Rabeler *et al.*, 2004) kontrastiert. Diese kann durch die Deletion des TRH-Rezeptor 1 das TRH-Signal auf der Hypophyse nicht mehr wahrnehmen.

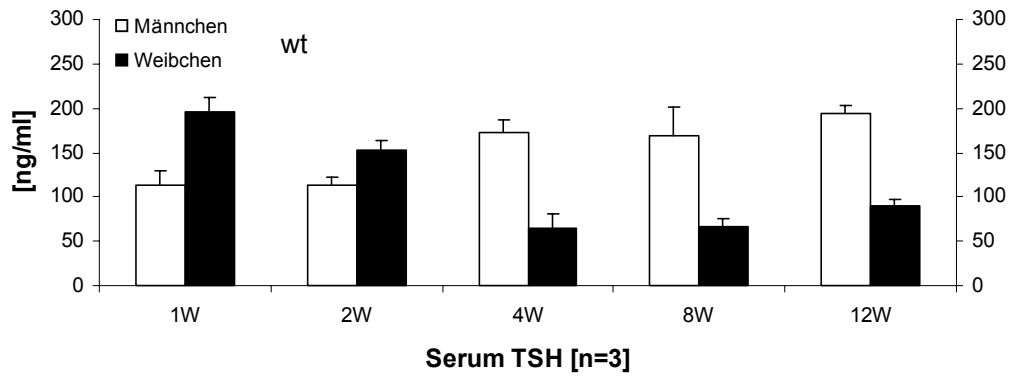
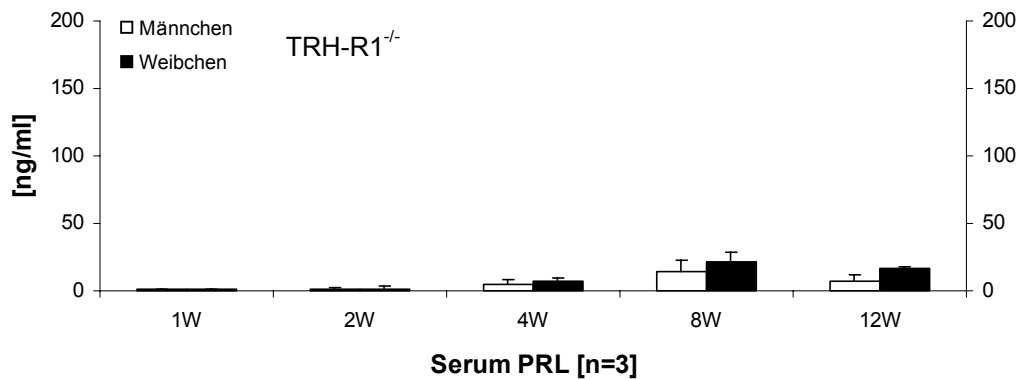
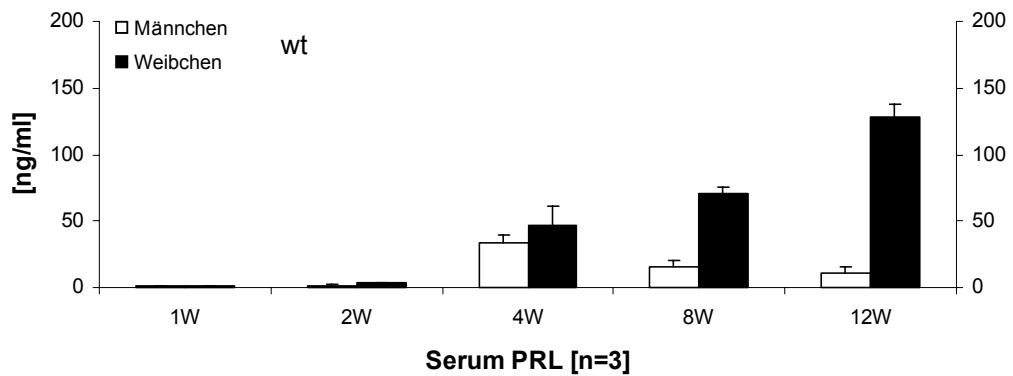
#### Serumkonzentrationen von TSH und Prolaktin

Als Grundlage für die endokrinologische Analyse der Mutanten wurde der geschlechts- und entwicklungsbedingte Verlauf der Sekretion von TSH und Prolaktin in den ersten zwölf Lebenswochen von wildtyp Mäusen verfolgt (Abb. 3.18). Die Messung der jeweiligen Serumkonzentrationen wurde mit Hilfe eines *Radio-Immuno-Assays* (RIA) durchgeführt.

Während die Serumkonzentration von TSH in den Weibchen im Verlauf der ersten beiden Wochen deutlich über der in den Männchen lag, kam es in der *weaning* Phase zwischen der zweiten und vierten Woche zu einer Umkehrung der Situation. Mit der vierten Woche lagen die Serumkonzentrationen der Weibchen nur noch bei einem Drittel ihrer ursprünglichen Werte und deutlich unter den Werten der Männchen. Die Männchen zeigten dahingegen sogar einen deutlichen Anstieg der Serumkonzentration von TSH. Ab der vierten Woche konnten dann für beide Geschlechter im weiteren Zeitverlauf keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Abb. 3.18[A]). Trotz der starken geschlechtsspezifischen Unterschiede reflektierte dies nicht auf die Serumkonzentration der Schilddrüsenhormone (Daten nicht gezeigt).

Schon in der zweiten Woche konnte für die Weibchen ein höherer Prolaktinspiegel als bei den Männchen im Serum nachgewiesen werden. In den Weibchen stieg die Serumkonzentration von Prolaktin kontinuierlich mit dem Alter an. Im Vergleich dazu erreichte Prolaktin in den Männchen nur sehr niedrige Konzentrationen, die nicht linear mit dem Alter korrelierten. Nach zwölf Wochen konnte der größte Unterschied zwischen den Geschlechtern ermittelt werden (Abb. 3.18[B]). In TRH-R1 *Knock-out* Mäusen konnte deutlich gezeigt werden, daß ohne einen funktionellen TRH-Rezeptor auf der Hypophyse zu jedem Zeitpunkt nur ein Bruchteil der Serumkonzentration des Wildtyps erreicht wurde.



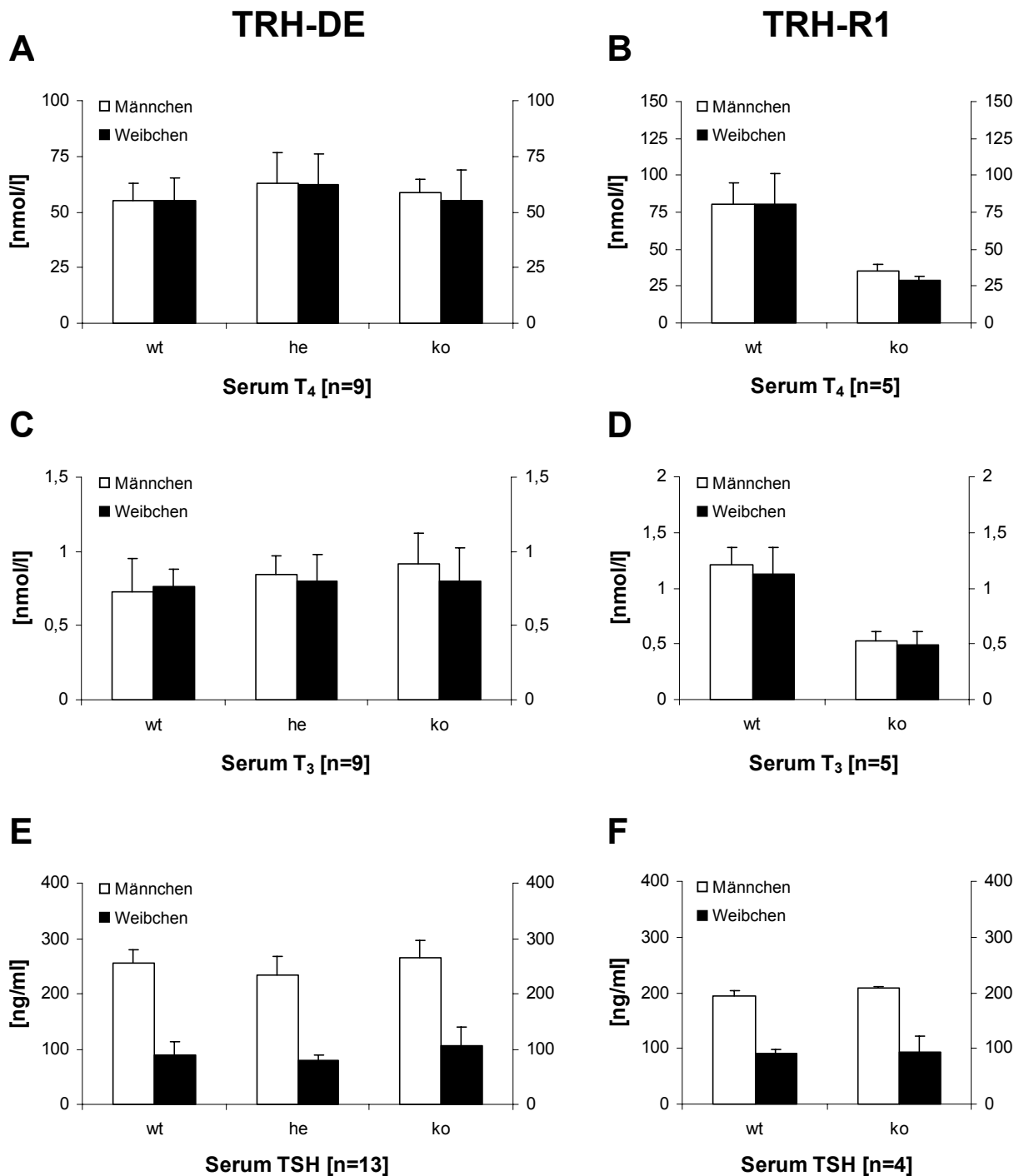
**A****B**

**Abbildung 18: Zeitverlauf von Serum TSH und Prolaktin.**

RIA-Bestimmung der Serumkonzentrationen von TSH und Prolaktin (PRL) in C57Bl/6 Mäusen über einen Zeitverlauf von zwölf Wochen ab der Geburt. Es wurden jeweils die Seren von drei bis fünf Tieren für eine Messung vereinigt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von  $n$  Messungen  $\pm$ SD. **A.** Im Wildtyp (wt) ließen sich in den ersten beiden Lebenswochen für die Weibchen ein höherer TSH Gehalt im Serum bestimmen als für die Männchen. Bereits ab der vierten Woche war dieses Verhältnis stark ins Gegenteil verändert. Die TSH Werte blieben danach bis zur zwölften Woche stabil. **B.** Die Prolaktinkonzentration nahm im Serum weiblicher Wildtypen mit dem Alter kontinuierlich zu und erreichte nach zwölf Wochen einen Höhepunkt, der dem zehnfachen des männlichen Wertes entsprach. In TRH-R1 defizienten Mäusen konnten bei beiden Geschlechtern auch nach zwölf Wochen nur sehr geringe Prolaktinkonzentrationen ermittelt werden.

**Hypophysen-Schilddrüsen Achse**

Abbildung 3.19 faßt die RIA-Experimente zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von Schilddrüsenhormonen und TSH in TRH-DE und TRH-R1 *Knock-out* Mäusen zusammen. Für die Experimente wurden adulte Mäuse im Alter zwischen acht und zwölf Wochen verwendet. In TRH-DE defizienten Tieren konnte keine signifikante Veränderung der Schilddrüsenhormone konstatiert werden (Abb. 3.19[A und C]). Dahingegen wirkte sich der Verlust von TRH-R1 auf der Hypophyse in einer ausgeprägten Unterfunktion der Schilddrüse (tertiärer Hypothyroidismus) aus und zeigte sich in einer Abnahme der Serumkonzentration von  $T_4$  und  $T_3$  auf unter die Hälfte des Wildtypwertes (Abb. 3.19[B und D]). In keiner der beiden Mutanten konnte jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine Veränderung der TSH-Konzentration im Serum detektiert werden.

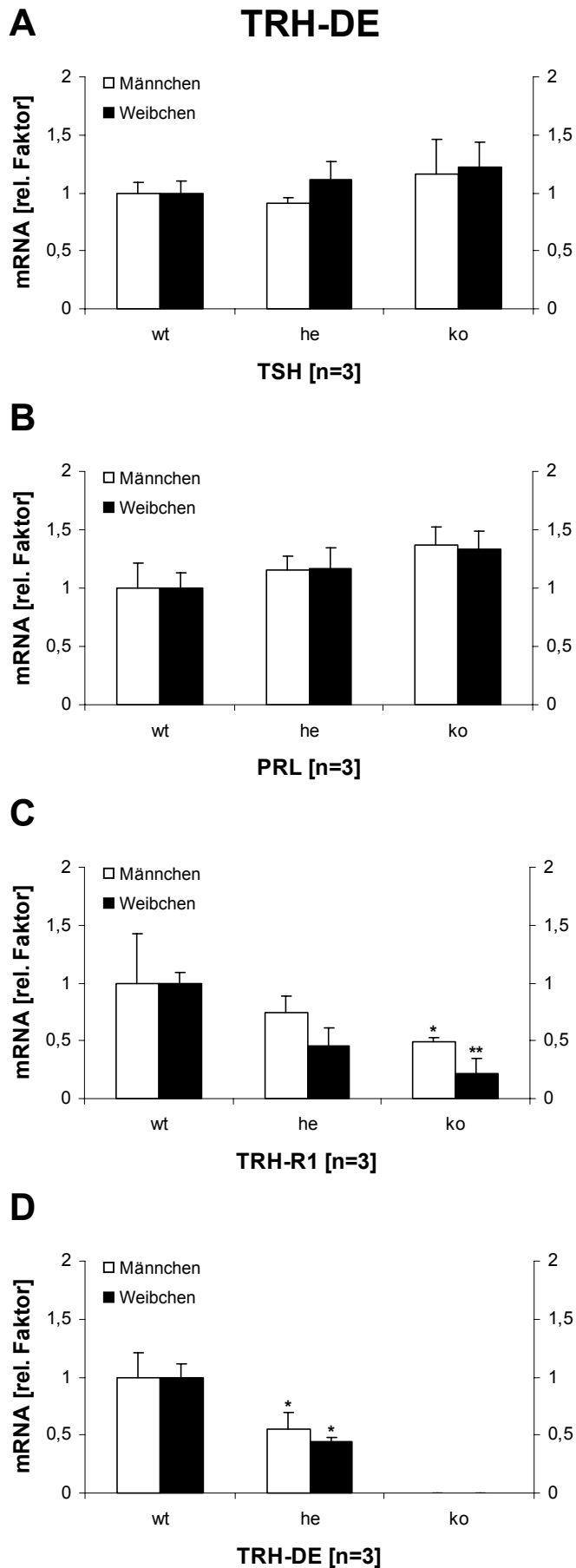


**Abbildung 3.19: Hypophysen-Schilddrüsen-Achse.**

RIA-Bestimmung der Serumkonzentrationen von T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> und TSH in TRH-DE<sup>+/+</sup>, -DE<sup>+/-</sup> und -DE<sup>-/-</sup> Mäusen (NMRI) und TRH-R1<sup>+/+</sup> und -R1<sup>-/-</sup> Mäusen (C57BL/6J) im Alter von acht bis zwölf Wochen. Für die Messungen an C57BL/6J Mäusen wurden jeweils die Seren von drei Tieren zu einer Probe vereinigt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von n Messungen ±SD. **A.**, **C.** und **E.** Weder bei der Serumkonzentration der Schilddrüsenhormone noch bei der Serumkonzentration von TSH konnte ein wesentlicher Unterschied zwischen den TRH-DE Genotypen festgestellt werden. **B.** und **D.** Der Verlust von TRH-R1 führte zu einem ausgeprägtem Hypothyroidismus. **F.** In TRH-R1 defizienten Mäusen unterscheidet sich die Serumkonzentration von TSH nicht vom Wildtyp. **Abkürzungen:** he, heterozygot; ko, homozygot mutant; wt, wildtyp.

### **Expression von TSH, Prolaktin, TRH-R1 und -DE in der Hypophyse**

In der Hypophyse der verschiedenen TRH-DE Genotypen wurde die Expression von TSH, Prolaktin, TRH-R1 und -DE quantitativ mit Hilfe der *Real Time PCR*-Methode analysiert (Abb. 3.20). Für jeden Genotyp wurden jeweils drei cDNA-Bibliotheken aus je drei Hypophysen von acht Wochen alten Mäusen erstellt. All drei Genotypen wurden gleichzeitig innerhalb eines Experimentes auf die entsprechenden Zielgene hin untersucht und mit Cyclophilin (*house-keeping gene*) normalisiert. Um eine Vergleichbarkeit unabhängiger Experimente zu erzielen, wurden die Ergebnisse in relativem Verhältnis zum Wildtypwert ausgedrückt. Sowohl für TSH als auch für Prolaktin konnte tendenziell ein leichter Anstieg der Expression in den TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren beider Geschlechter registriert werden. Ein signifikanter Effekt auf die Regulation dieser Gene unter standardisierten Umweltbedingungen blieb jedoch trotz der Abwesenheit von TRH-DE als Kontrollelement aus (Abb. 3.20[A und B]). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Reduktion der Expression von TRH-R1 in Hypophysen von heterozygoten und TRH-DE defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 20[C]). Dieses korrelierte mit der bereits in heterozygoten Tieren verminderten Expression von TRH-DE (Abb. 20[D]).

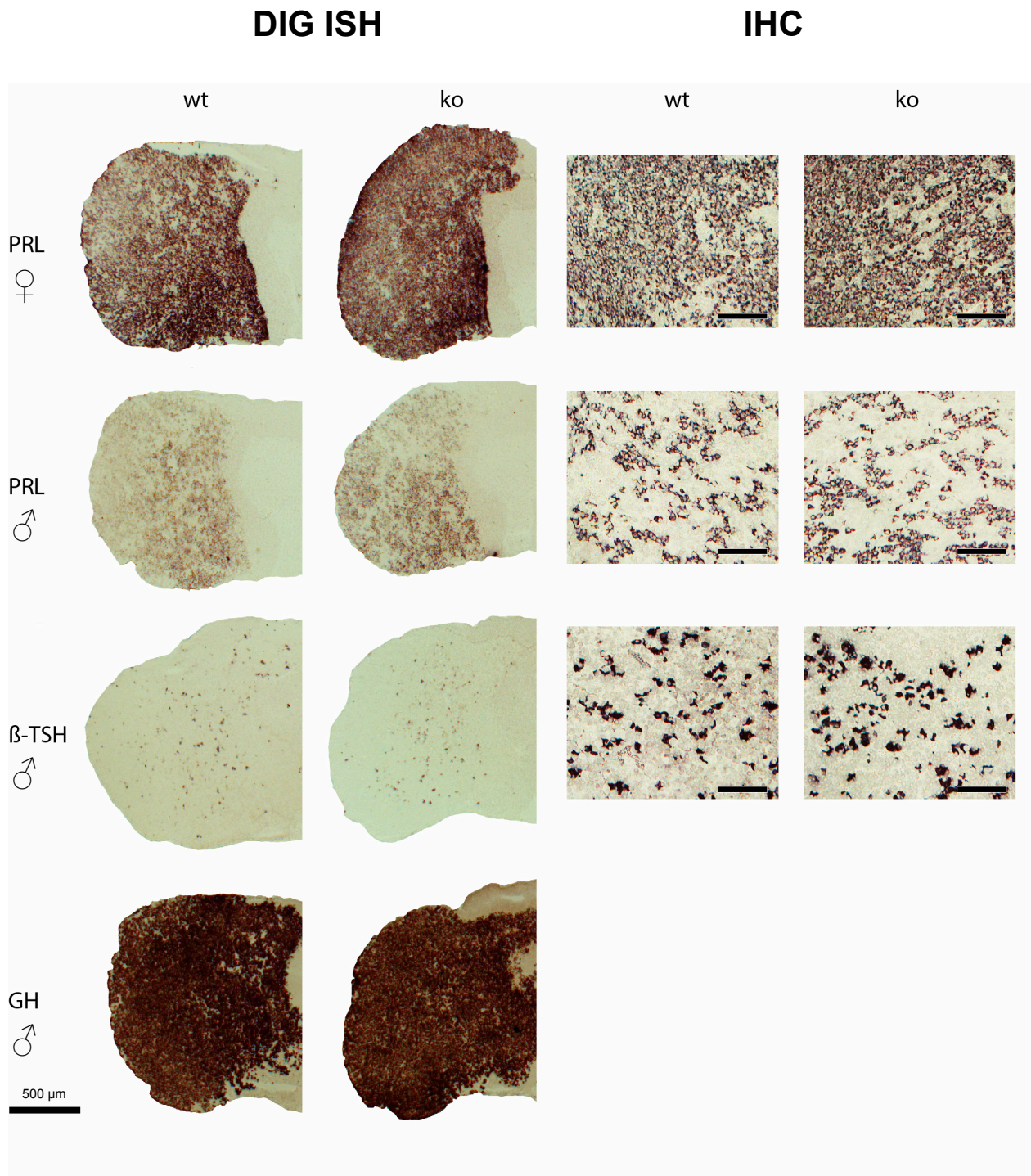


**Abbildung 3.20: Real-Time PCR Analyse von TSH, PRL, TRH-R1 und TRH-DE in adulten Hypophysen.**

Die Säulen repräsentieren den Mittelwert aus  $n$  Messungen  $\pm$ SD. T-Test relativ zum Wildtyp: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . Für jede Messung wurden drei Hypophysen von Mäusen im Alter von acht Wochen verwendet. Der Mittelwert des Wildtyps (wt) wurde willkürlich auf eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Ein ausgeprägter Unterschied zwischen den Geschlechtern konnte für die relativen Bezüge der Genotypen nicht festgestellt werden. **A.** und **B.** Für TSH und Prolaktin konnte tendenziell eine leichte Erhöhung der Expression in TRH-DE defizienten Mäusen (ko) gezeigt werden. **C.** Die Expression von TRH-R1 in der Hypophyse wurde in TRH-DE *Knock-out* Tieren signifikant herunterreguliert. **D.** Bereits in heterozygoten Mutanten (he) ist die Expression von TRH-DE bedeutsam vermindert. In TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen kann keine Expression nachgewiesen werden.

**Darstellung hormonproduzierender Zellen in der Hypophyse**

Die Untersuchung der hormonproduzierenden Zellen der Hypophyse mit Methoden der *in situ* Hybridisierung bzw. der Immunohistochemie ergaben keine drastischen Unterschiede zwischen TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren und ihren Kontrollen. Ein Genotyp-abhängiger, geringer Unterschied in der Expression von Prolaktin konnte dennoch speziell in den Hypophysenschnitten weiblicher Mäuse gezeigt werden und stand im Einklang mit den Ergebnissen der *Real-Time* PCR. Eine Übersicht ist in Abbildung 3.21 gegeben.



**Abbildung 3.21: Darstellung hormonproduzierender Zellen der Hypophyse.**

Repräsentative Hypophysenpräparate von adulten wildtyp (wt) und TRH-DE<sup>-/-</sup> (ko) Mäusen. Mittels DIG *in situ* Hybridisierung (DIG ISH) wurde die mRNA Verteilung von Prolaktin (PRL), TSH (β-TSH) und Wachstumshormon (GH) auf 16 μm Kryo-Dünnschnitten dargestellt. Mit Methoden der Immunohistochemie (IHC) wurde Prolaktin und TSH direkt als Protein auf 9 μm Paraffinschnitten detektiert. Bei keinem der untersuchten hypophysären Hormone konnte in Expressionsmuster und -stärke ein drastischer Unterschied beobachtet werden. Die TRH-unabhängige Expression von GH diente als Kontrolle. Der Größenbalken in den IHC Bildern entspricht 100 μm.

### 3.5 Phänotyp

#### Habitus

Im täglichen Umgang waren homozygote TRH-DE *Knock-out* Mäuse in keiner der eingezüchteten Mauslinien (C57BL/6J, 129/sv und NMRI) von ihren wildtyp Geschwistern aufgrund ihres Verhaltens oder ihrer Entwicklung zu unterscheiden. Die TRH-DE<sup>-/-</sup> Tiere erreichten in normaler Zeit die Geschlechtsreife und pflanzten sich in der Zucht mit vergleichbarer Effizienz wie entsprechende Kontrolltiere fort.

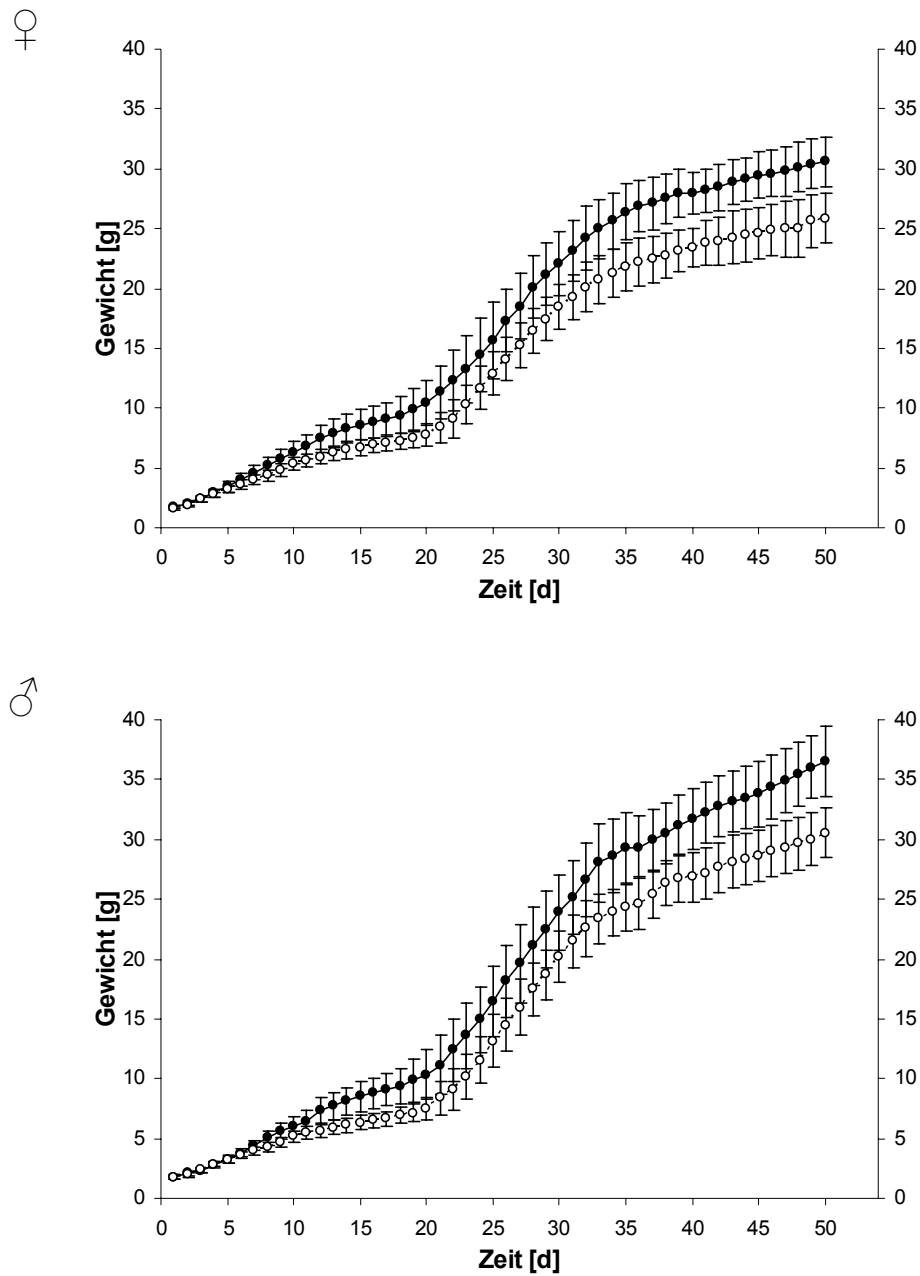
#### Gewichtsentwicklung

Aus den Nachkommen einer Verpaarung heterozygoter Tiere der F3-Generation mit NMRI Hintergrund wurden jeweils drei homozygote und drei wildtyp Zuchtpaare gebildet. Die Würfe dieser Paarungen wurden direkt nach der Geburt auf zehn Tiere reduziert und für sieben Wochen täglich gewogen. Die Böcke verblieben über den gesamten Zeitraum in den Aufzuchtkäfigen. Im Alter von 20 Tagen wurden die Würfe abgesetzt (*weaning*) und nach Geschlecht getrennt. Es wurden jeweils zwei Würfe von jedem Zuchtpaar für die Gewichtsentwicklung aufgezeichnet. Vier wildtyp Männchen aus unterschiedlichen Würfen wurden aufgrund ihrer extrem abweichenden Entwicklung in der Auswertung unberücksichtigt gelassen. Die Daten sind in Abbildung 3.22 zusammengestellt.

Die *Knock-out* Tiere setzten sich während der gesamten Entwicklung durch ein deutlich geringeres Gewicht von den wildtyp Kontrollen ab. Das allgemeine Profil ihrer Wachstumskurve sowie das Verhältnis zwischen den Gewichten von Weibchen und Männchen blieb jedoch unbeeinflusst. Im sigmoidalen Verlauf aller Kurven traten zwei Wendepunkte deutlich hervor: der Eintritt in die Hauptwachstumsphase nach knapp drei Wochen und der Austritt aus dieser Phase nach ca. fünf Wochen. Der Hauptwachstumsphase ging in der dritten Woche die Umstellung von Muttermilch auf feste Nahrung voraus, die sich als leichte Wachstumsdepression abzeichnete. Nach dreieinhalb Wochen konnten bei beiden Genotypen die ersten geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Gewichtsentwicklung festgestellt werden. Mit Abschluß der Hauptwachstumsphase erreichten alle Tiere ihre Geschlechtsreife. Sowohl die Homozygoten als auch deren wildtyp Kontrollen konnten bereits mit fünf bis sechs Wochen erfolgreich verpaart werden.



## TRH-DE



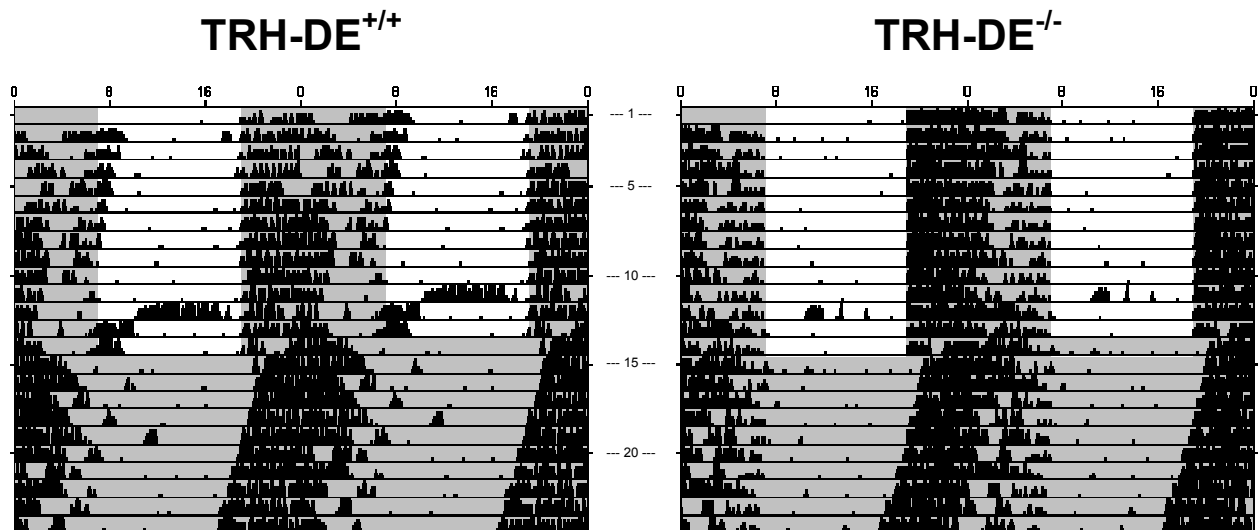
**Abbildung 3.22: Gewichtsentwicklung von TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.**

Bei Tieren die über drei Generationen in den NMRI-Hintergrund eingekreuzt wurden lag das durchschnittliche Gewicht von TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen (ko) während der gesamten Entwicklung deutlich unter dem der Kontrollen (wt).

Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$ SD. Probenzahl: ♀ko, n=30; ♂ko, n=30; ♀wt, n=37; ♂wt, n=19.

### **Aktivitätsprofil**

Fünf TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen und fünf entsprechende Kontrolltiere sowie zehn TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen und ihre entsprechenden Kontrollen wurden auf ihr circadianes Verhalten hin untersucht. Die Tiere wurden dazu einzeln in Käfigen untergebracht und hatten freien Zugang zu einem Laufrad, dessen Umdrehungen automatisch protokolliert werden konnten. Alle Gruppen wurden in separaten Boxen gehalten, deren Lichtbedingungen über eine programmierbare Zeitschaltuhr kontrolliert wurden. Nach einer Eingewöhnungsphase von zwei bis drei Tagen wurden die Aktivitätsdaten über zwei Wochen während eines 12:12 stündigen Licht/Dunkel-Rhythmus für die Auswertung protokolliert. Die Tiere wurden anschließend in konstanter Dunkelheit gehalten, wobei zwei Stunden nach Einsetzen der Dunkelphase ein Lichtreiz gegeben wurde, um eine Verschiebung der Aktivitätsphase zu provozieren. Die Laufraddaten wurden ebenfalls für zwei Wochen protokolliert. Nach ausreichender Konditionierung im ursprünglichen Licht/Dunkel-Rhythmus wurden die Tiere für weitere zwei Wochen unter konstanter Beleuchtung gehalten. Auch hier wurde die Laufradaktivität protokolliert. Für die Auswertung wurden jeweils nur sieben zusammenhängende Tage berücksichtigt, in denen die Mäuse ein stabiles Laufverhalten zeigten. Die dabei erhaltenen Aktogramme sahen typischerweise aus wie in Abbildung 3.23 für das TRH-DE Experiment dargestellt.



**Abbildung 3.23: Aktogramme**

Darstellung der Aktivitätsaufzeichnung einer repräsentativen TRH-DE<sup>+/+</sup> und -DE<sup>-/-</sup> Maus (C57BL/6J). Die X-Achse entspricht der Tageszeit. Die Dunkelphasen sind grau unterlegt dargestellt. Jede Zeile zeigt 48 Stunden von Mitternacht des vorangehenden Tages bis Mitternacht des nachfolgenden Tages. Anfänglich wurden die Tiere in einem täglichen Zyklus von zwölf Stunden Licht und Dunkel gehalten. Die Aktivität der Tiere konzentrierte sich dabei auf die Dunkelphase. Die anhaltende Aktivität während der Lichtphase in Zeile elf bzw. zwölf wurde durch das Wechseln der Käfige provoziert. Bei der Umstellung des Licht/Dunkel Rhythmus auf eine permanente Dunkelphase wurde zwei Stunden nach Einsetzen der Dunkelheit ein 15 minütiger Lichtreiz gegeben, um eine künstliche Phasenverschiebung zu bewirken. Das tägliche Einsetzen der Laufradaktivität verschob sich in kompletter Dunkelheit kontinuierlich nach vorne, da die innere Uhr in andauernder Dunkelheit die Periodenlänge verkürzt. In diesem Fall war die Periodenlänge unabhängig von der Mutation ca. 23,5 h. Die TRH-DE *Knock-out* Maus zeigte keine offensichtlichen Defekte der inneren Uhr. Dennoch konnte im Vergleich mit dem Wildtyp eine wesentlich höhere Gesamtaktivität während des Licht-Dunkel-Rhythmus beobachtet werden.

Weder die TRH-DE noch die TRH-R1 defizienten Mäuse zeigten einen unmittelbaren circadianen Defekt. Die Aktivitätsphasenlänge und -verschiebung waren unter Freilaufbedingungen (d.h. ohne die äußeren Reize einer Licht/Dunkel-Rhythmik) normal. Dennoch konnte unter zyklischen Licht/Dunkel-Bedingungen eine deutlich erhöhte Gesamtaktivität der TRH-DE defizienten Tiere gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden. Die zusätzliche Laufradaktivität fand dabei nur in der Dunkelphase statt. TRH-R1 defiziente Tiere zeigten dahingegen unter den selben Verhältnissen eine geringere Aktivität als der Wildtyp. TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse setzten erst punktgenau nach Abschalten des Lichts mit ihrer Aktivität ein und nicht wie ihre Kontrollen schon gegen Ende der Lichtphase. Die Vermutung, daß die Aktivität in TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen stärker als im Wildtyp durch phototrope Reize moduliert wird, fand im Freilaufexperiment bei konstantem Licht weitere Bestätigung, da unter diesen Bedingungen die Laufradaktivität der TRH-DE<sup>-/-</sup> Mutanten stark eingeschränkt wurde. Eine Zusammenstellung dieser Beobachtungen findet sich in Abbildung 3.24.

**Abbildung 3.24: Gegenüberstellung der Aktivitätsprofile von TRH-DE<sup>-/-</sup> und -R1<sup>-/-</sup> Mäusen. (nächste Seite)**

Datenpunkte und Säulen repräsentieren den Mittelwert aus n Proben  $\pm$ SEM. T-Test relativ zum Wildtyp: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01. **A.** Aktivitätsprofil der TRH-DE defizienten Mäuse (C57BL/6J) im Vergleich zum Wildtyp. Daten von jeweils fünf adulten Individuen wurden über einen Zeitraum von einer Woche erhoben und gemittelt. An der X-Achse ist die Licht- und Dunkelphase durch einen weißen bzw. schwarzen Balken kenntlich gemacht. Der Graph zeigt, daß die TRH-DE *Knock-out* Mäuse während der Dunkelphase weitaus aktiver waren als ihre Kontrollen. Die Tiere setzten zudem erst merklich später mit ihrer Aktivität ein, exakt dann, wenn das Licht ausgestellt wurde. **B.** Tagesdurchschnitt der Gesamtaktivität unter Licht/Dunkel (LD), Dunkel/Dunkel (DD) und Licht/Licht (LL) Bedingungen über einen Zeitraum von einer Woche. Während unter Licht/Dunkel Bedingungen die Gesamtaktivität der TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant höher lag als im Wildtyp, wurde unter konstantem Licht die Aktivität der Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp stark eingeschränkt. In konstanter Dunkelheit zeigte sich kein Unterschied in der Gesamtaktivität der beiden Gruppen. **C.** Einsetzen der Laufradaktivität beim Wechsel von Licht- in die Dunkelphase. Der Phasenwinkel gibt ein Maß für den Zeitpunkt der Aktivitätsaufnahme relativ zum Lichtphasenwechsel. Die Variation bestimmt die Schwankungsbreite der Zeitpunkte, zu denen die Aktivität einsetzt. Mit einem kaum meßbaren Phasenwinkel zeigten die *Knock-out* Mäuse eine starke Abhängigkeit vom äußeren Lichtreiz. Dieser Befund wurde durch die im Vergleich zum Wildtyp geringe Variation unterstützt. **D.** Aktivitätsprofil der TRH-R1 defizienten Mäuse (C57BL/6J) im Vergleich zum Wildtyp. Daten von jeweils zehn adulten Individuen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen erhoben und gemittelt. Die TRH-R1 *Knock-out* Mäuse zeigten als einzige Auffälligkeit eine geringere Aktivität als ihre Kontrollen. **E.** Die Auswertung der Gesamtaktivität unter Licht/Dunkel Bedingungen spiegelt die Beobachtung aus (**D**) wider. **F.** Phasenwinkel und Variation waren in beiden Gruppen gleich. **Abkürzungen:** UPM, Umdrehungen pro Minute; UPD, Umdrehungen pro Tag.

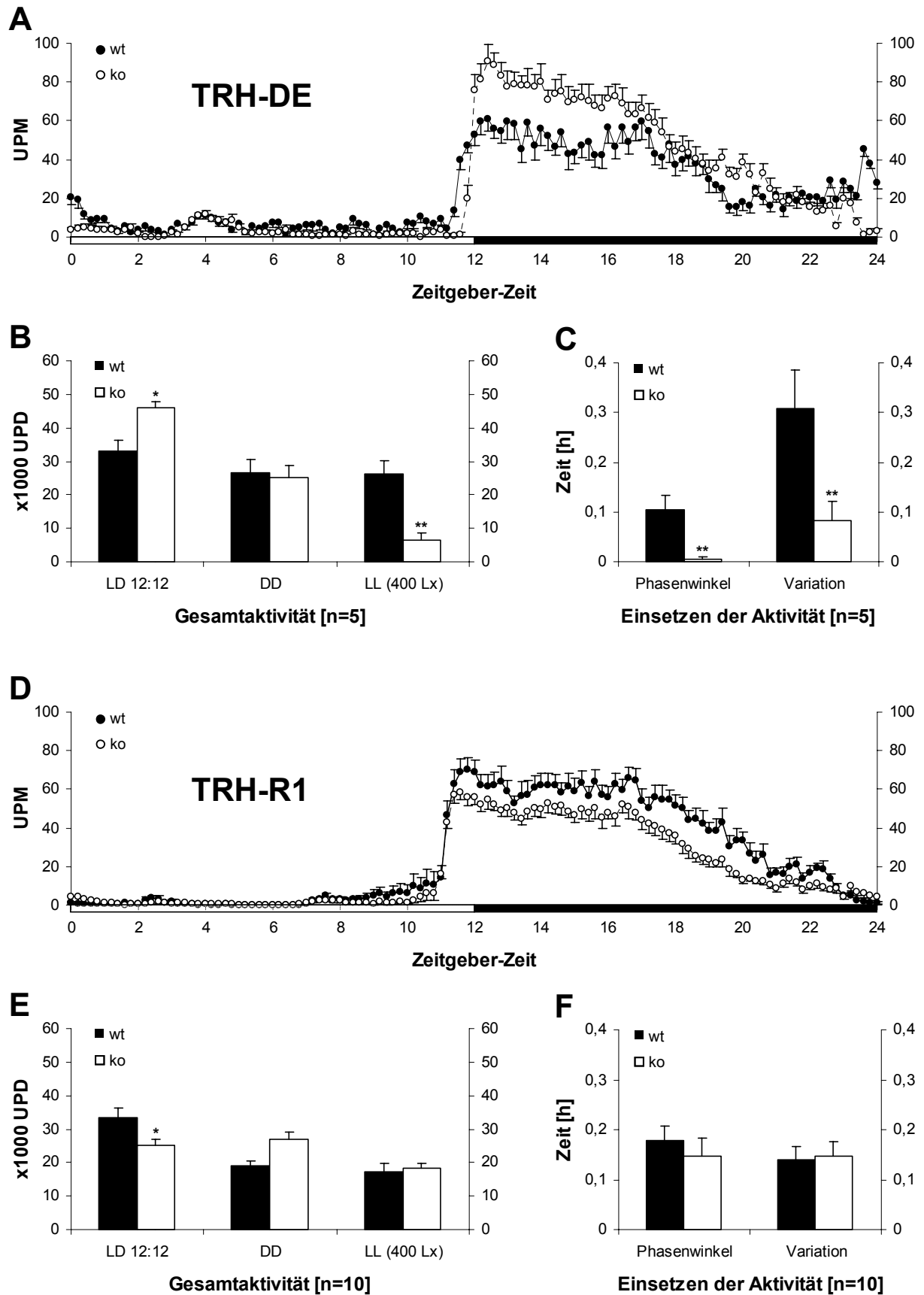


Abbildung 3.24: Gegenüberstellung der Aktivitätsprofile von TRH-DE<sup>-/-</sup> und -R1<sup>-/-</sup> Mäusen.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Genomische Manipulation an der Maus

#### Vorteile und Risiken

Die gezielte Veränderung der genomischen Information durch homologe Rekombination in pluripotenten murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) erlaubt die Herstellung von Mausstämmen mit definierten Mutationen in ihrem Genom. Durch diese Technologie können einzelne Komponenten komplexer biologischer Systeme eliminiert, manipuliert oder kontrolliert werden, um anschließend die entsprechenden Konsequenzen *in vivo* zu untersuchen. Der Vorteil dieser Methode ist dabei ihre hohe Spezifität. Obwohl die molekularbiologische Umsetzung mit der Präzision eines chirurgischen Eingriffs erfolgt, besteht die Gefahr, daß die genomische Integrität in den manipulierten ES-Zellen auf eine Weise beeinträchtigt wird, die später in der Maus zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. Allein das Einfügen der obligatorischen Gen-Kassette, welche die Neomycinrestenz für die Kultur und Selektion der ES-Zellen kodiert, birgt mehrere Risiken. Zum einen kann der konstitutiv aktive Promotor dieser Kassette reprimierend auf die Aktivität umliegender endogener Promotoren wirken (Artelt *et al.*, 1991), zum anderen kann eine kryptische Spleissstelle, die für das Leseraster des Neomycinresistenzgens beschrieben wurde (Roshon *et al.*, 2003), unter Umständen mit 5-Strich gelegenen Genen Fusionsprodukte erzeugen. Wenn möglich sollte daher die Selektionskassette durch ein Cre/loxP Rekombinationssystem schon in den ES-Zellen oder später nachträglich in der Maus entfernt werden.

Ein weiteres Risiko liegt vor, wenn ein unzureichend charakterisiertes Gen durch eine partielle Deletion inaktiviert werden soll. Mitunter kann dabei die Expression von Teilprodukten oder Spleissvarianten im Vorfeld nicht ausgeschlossen werden. Bei der Aufgabe, das TRH-abbauende Ektoenzym, TRH-DE, auf genomischer Ebene zu deaktivieren, bestand schon allein aufgrund der Größe nicht die Möglichkeit die gesamte kodierende Sequenz aus dem Genom zu entfernen. Das TRH-DE Gen erstreckt sich in der Maus mit 19 Exons über mehr als 400 kb Länge und beherbergt in seinen intronischen Sequenzen mindestens ein weiteres Gen und ein Pseudogen. Um neben der eigentlichen Inaktivierung des TRH-DE Gens gleichzeitig ein Reportersystem unter die Kontrolle des endogenen TRH-DE Promotors zu bringen, wurde eine gezielte Manipulation am ersten Exon vorgenommen. Schon zu Beginn dieser Arbeit wurden allerdings in der Celera-Datenbank zwei RIKEN-Klone mit der unvollständigen cDNA aus murinem

Testikelgewebe entdeckt, die erstmals die Verwendung eines alternativen ersten und zweiten Exons implizierten. Ein entsprechendes Transkript wäre in der Lage, ausgehend von einem legitimen Startkodon zu Anfang des dritten Exons für ein potentiell funktionales Enzym ohne Transmembrandomäne zu kodieren. Die eingeführte Mutation im TRH-DE Locus hätte in diesem Fall keinen Einfluß auf die Expression des Transkripts. Mittels *reverse transcription-PCR* wurden jedoch in relevanten TRH-DE exprimierenden Geweben von Wildtypen keine weiteren Anhaltspunkte für die Existenz solcher Transkripte gefunden.

### **Phänotyp und genetischer Hintergrund**

Der Phänotyp einer gezielten Mutation kann in Mäusen stark durch den genetischen Hintergrund moduliert werden. Es wird allgemein akzeptiert, daß für die anfänglichen Studien an einer neu generierten transgenen Mauslinie Tiere mit einem gemischten genetischen Hintergrund verwendet werden. Hierbei sind allerdings große Individuenzahlen nötig, um einen mutmaßlichen Phänotyp gegen die genetische Variabilität abzusichern. Die Bereitstellung genetisch passender Kontrollen für exaktere Analysen wird schlicht unmöglich, wenn die Mutation im weiteren Verlauf der Zucht nicht konsequent über mehrere Generationen in einen isogenen Hintergrund zurückgekreuzt wird. Bei der Geschwisterverpaarung von Tieren mit einem gemischten genetischen Hintergrund entstehen immer neue Kombinationen von Allelen, die den Phänotyp verändern oder mit der Expression des Zielgens wechselwirken können. Es bietet sich daher an, die entsprechende Mutation früh in einem kongenen Mausstamm zu etablieren. Erst nach sechs Generationen des Rückkreuzens, ca. zwei Jahre, kann im Grunde davon ausgegangen werden, daß ein kongener Mausstamm abgeleitet von Mäusen mit unverwandtem genetischem Hintergrund statistisch zu mehr als 99 % homogen ist (Sigmund, 2000). Es benötigt allein vier weitere Generationen um die genetische Homogenität anschließend von 99,2 % auf 99,95 % anzuheben. Obwohl die Kontrolle über subtile Variationen innerhalb des Genpools eng verwandter Unterstämme zeitraubend und pedantisch anmutet, können schon geringe Veränderungen im Genom gewaltige Auswirkungen haben. Ein klassisches Beispiel für dieses Konzept ist die Mutation der Diabetiker-Maus (*Lepr<sup>db</sup>*). Während C57BL/KsJ-*Lepr<sup>db</sup>* Mäuse fettleibig und hochgradig diabetisch sind und sich als Modell für die Typ II Diabetes des Menschen eignen, sind ihre engen Verwandten, die C57BL/6J-*Lepr<sup>db</sup>* Mäuse, zwar ebenfalls fettleibig, entwickeln aber keine permanente Diabetes (Roths *et al.*, 1999).

Die im TRH-DE Locus erzeugte Mutation wurde insgesamt auf drei Mausstämme (129/svJ, C57BL/6J und NMRI) zurückgekreuzt. Die phänotypische Charakterisierung verschiedener TRH-DE defizienter Mauslinien sollte helfen, die grundsätzlichen Effekte der Mutation

gegenüber dem modulierenden Einfluß des genetischen Hintergrundes abzugrenzen. Startpunkt für die Zucht waren dabei die chimären Gründertiere, deren Keimzellen das 129/ola Genom der eingesetzten ES-Zellen aufwiesen. Während für den 129/svJ Hintergrund nur die erste Filialgeneration (F1) erzeugt wurde, erfolgte die Einzucht in den genetischen Hintergrund von C57BL/6J und NMRI über die gesamte zur Verfügung stehende Zeit bis in die fünfte Generation. Damit wurde die Mutation sowohl in den genetisch einheitlichen Hintergrund einer klassischen Inzuchtlinie (C57BL/6J) als auch in den geringfügig variierenden Hintergrund einer Auszuchtlinie (NMRI) eingebracht.

Die deutlichen genetischen Unterschiede der verschiedenen Mausstämme machten sich bereits bei der Southern-Analyse der ES-Zellen (129/ola) und der transgenen F1-Tiere (129/ola x NMRI) bemerkbar. In Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Mausstamm ergab sich bei der Genotypisierung für das Wildtypallel ein unterschiedlicher Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus im *Bam*HI-Verdau. Die Unterschiede zwischen den Mauslinien sind aber nicht nur subtile Punktmutationen, die Schnittstellen generieren oder verschwinden lassen, sondern handfeste physiologische Unterschiede, die sogar Einfluß auf die Größenverhältnisse der Mäuse nehmen. Gerade bei der Analyse TRH-DE defizienter Mäuse, deren Defekt so eng mit der Regulation homöostatischer Prozesse verknüpft ist, muß in Betracht gezogen werden, daß in den einzelnen Mausstämmen unterschiedliche physiologische Gegebenheiten auch einen uneinheitlichen Phänotyp hervorbringen können.

Allgemein wurde der genetische Hintergrund bei Versuchen vollständig vernachlässigt, die allein dazu dienten, den funktionellen Verlust von TRH-DE zu beschreiben oder eine Aussage über die prinzipielle Verlässlichkeit der verwendeten Reporter zu treffen. Aus Gründen der Verfügbarkeit wurden für die meisten anderen tierexperimentellen Aspekte dieser Arbeit Mäuse der dritten Generation mit ca. 87,5 % NMRI-Anteil verwendet. Eine detaillierte Wachstumskurve, die von diesen Tieren erstellt wurde, wies dabei unabhängig vom Geschlecht einen Gewichtsunterschied zwischen TRH-DE<sup>-/-</sup> und TRH-DE<sup>+/+</sup> Tieren auf. Abgesehen davon zeigten beide Genotypen einen charakteristischen Wachstumsverlauf ohne besondere Auffälligkeiten. Anders als bei vergleichbaren TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen, die ebenfalls eine verringerte Gewichtszunahme gegenüber Kontrolltieren zeigten, aber zudem hypothyroid waren, lieferten endokrinologische Untersuchungen an TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen keine weiteren Hinweise für die Ursache dieses Wachstumsphänotyps. Die Vermutung, daß der beobachtete Unterschied nicht unmittelbar auf die eigentliche Mutation zurückzuführen ist, wird durch folgende Argumentation gestützt: Während sich NMRI Mäuse generell durch eine schnelle Entwicklung und ein außerordentliches Wachstum auszeichnen, gehören die 129er Linien, von denen die verwendeten ES-Zellen



abgeleitet wurden, deutlich zu den kleineren Vertretern ihrer Art. Nach nur drei Generationen der Rückzucht auf NMRI basieren statistisch noch immer ca. 12,5 % des Genoms auf dem genetischen Hintergrund der ES-Zellen. Kosegregieren wachstumsbeeinflussende Faktoren aus dem 129er Genom zufällig mit der gezielten Mutation, wird bei der Generierung von *Knock-out* Tieren nicht nur auf die Mutation, sondern auch auf einen davon unabhängigen Wachstumsphänotyp selektioniert, der in den wildtyp-Geschwistern zwangsläufig nicht auftauchen kann. Der Sachverhalt sollte sich jedoch eindeutig klären lassen, sobald Wachstumskurven für TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse im 129/svJ oder C57BL/6J Hintergrund verfügbar sind oder das Experiment allgemein mit Tieren wiederholt wird, die einen deutlich geringeren Anteil des ES-Zell Genoms aufweisen.

Um letztendlich durch das Studium der TRH-DE defizienten Mäuse in komplexen Verhaltensparadigmen ein besseres Verständnis für die Beteiligung des TRH-Signalsystems an höheren Hirnfunktionen zu erlangen, ist es für eine korrekte Interpretation der Resultate unerlässlich, Mutanten und Kontrollen aus kongenen Mauslinien mit geringer genetischer Variation bereitzustellen.

## 4.2 Expressions-Analyse

### Reporter

Aus offensichtlichen Gründen fehlte in TRH-DE defizienten Mäusen die Möglichkeit, anhand von *in situ* Hybridisierung (ISH) oder Immunohistochemie (IHC) Zellen zu identifizieren, in denen der TRH-DE Promotor aktiv ist. Gerade dies war aber wichtig, um Anzahl, Verteilung und Morphologie dieser Zellen zwischen *Knock-out* und wildtyp Geweben vergleichen zu können. Die Feststellungen, daß TRH-DE im zentralen Nervensystem ausschließlich auf Neuronen exprimiert wird (Bauer *et al.*, 1990) und TRH über neurotrophe Eigenschaften verfügt (Casabona *et al.*, 1992), ließen Veränderungen im Hinblick auf Neuronenwachstum und -verknüpfung nicht unwahrscheinlich sein.

In den transgenen Mäusen wurden daher unter der direkten Kontrolle des endogenen TRH-DE Promotors zwei Reporter zur Expression gebracht, die sowohl Zellkörper als auch deren Fortsätze markieren konnten. Das Reportergespann, bestehend aus der bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ) und der humanen plazentaren alkalischen Phosphatase (PLAP), wurde in entsprechenden Zellen in einer mRNA transkribiert und durch ein IRES-Element getrennt translatiert. Die cytosolische lacZ-Aktivität ließ sich zumeist perinukleär detektieren und lieferte in TRH-DE defizienten Tieren ein Expressionsmuster, das die Ergebnisse der radioaktiven ISH

in wildtyp Kontrollen reflektierte. Die Detektion von lacZ hatte dabei den Vorteil, daß schwach exprimierende Zellen eindeutig gegenüber Zellen ohne spezifische Reporteraktivität abgegrenzt werden konnten. Das lacZ-Signal blieb zudem auch bei hohen Intensitäten der Expression differenzierbar und zeigte erst wesentlich später als eine radioaktive ISH Übersättigungseffekte. Ergänzend eignete sich die Membran-assoziierte PLAP-Aktivität für die Darstellung der Axone und Dendriten, speziell dann, wenn diese zu Nervenfasern gebündelt oder in molekularen Schichten angereichert vorlagen. Obwohl sich die PLAP-Aktivität gleichmäßig und ungerichtet über die gesamte Membran der Zellen verteilte und daher keine Information über die zelluläre Lokalisation von TRH-DE bot, wurde von dem PLAP-Reporter eine Übereinstimmung mit den Signalen aus der immunohistochemischen Darstellung von TRH-DE erreicht. Da bezüglich der Reporter, abgesehen von der absoluten Intensität, keine offensichtlichen Unterschiede zwischen hetero- und homozygot rekombinanten Mäusen herrschten und die generelle Übereinstimmung mit dem ISH-Signal im Wildtyp gegeben war, wurde die Reporteraktivität stellvertretend für die Expression von TRH-DE interpretiert.

Neben einem detaillierten Expressionsmuster gaben die Reporter auch Hinweise auf die Stärke der jeweiligen Promotoraktivität. Dabei waren allerdings regulatorische Aspekte auf posttranskriptioneller oder posttranslationaler Ebene, die letztendlich die Aktivität von TRH-DE in normalen Geweben bestimmen, auf die Reporter nicht anwendbar.

### **TRH-DE Promotoraktivität in der Embryonalentwicklung**

Die Ontogenese von TRH-DE wurde über die ersten beiden Drittel der Embryonalentwicklung mit dem lacZ-Reporter in Ganzpräparaten von hetero- und homozygoten Mutanten verfolgt. Unterschiede in den beiden Genotypen wurden nicht festgestellt. 10,5 Tage nach der Befruchtung (dpc) konnte in den Embryonen erste lacZ-Aktivität detektiert werden. Der Nachweis von TRH-DE Promotoraktivität erfolgte in der Anlage des Trigeminalnerves, in der Proliferationszone der Epiphyse und in einem Bereich nahe des Leberprimordiums. Zum Zeitpunkt 11,5 dpc wurde der Reporter darüberhinaus in hypothalamischen Regionen, in den dorsalen Wurzelganglien, im dorsalen Trakt und in einem scharf definierten Bereich der Extremitäten aktiv. Das Signal an den Extremitäten ging aus einer epithelialen Verdickung hervor, die auch als „apical ectodermal ridge“ (AER) bezeichnet wird und der als Signalzentrum eine entscheidende Rolle beim weiteren Auswachsen der Gliedmaßenanlage zufällt (Cohn und Tickle, 1996; Johnson und Tabin, 1997). Ab 12,5 dpc konnte zusätzlich ein starkes Reportersignal an den Rippenbögen und in den Extremitäten, speziell im Bereich der Gelenke, beobachtet werden.

Die schlechte zeitliche und räumliche Auflösung der verfügbaren Expressionsdaten behinderte eine konsistente Darstellung des TRH-Signalsystem in der frühen embryonalen Entwicklung. In der Literatur wurde eine TRH-Immunoaktivität erstmalig ab dem zwölften Embryonaltag für den murinen Hypothalamus beschrieben (Faivre-Bauman *et al.*, 1978). Die mRNA von präproTRH konnte an Tag 12,5 dpc im gesamten Gehirnbereich ausschließlich in einer Subpopulation hypothalamischer Neurone und in hoher Expressionsstärke im Trigeminalganglion nachgewiesen werden (Rabeler, Dissertation). Die Aktivität des TRH-R1 Promotors konnte in entsprechenden *Knock-out* Mäusen (Rabeler *et al.*, 2004) ebenfalls durch lacZ dargestellt werden. In den untersuchten Embryonen (11,5 - 13,5 dpc) war die insgesamt schwache Färbung ausschließlich im Kopfbereich, hauptsächlich im vierten Ventrikel und im choroidalen Plexus lokalisiert. Es ließ sich keine direkte Überlappung mit der Aktivität des TRH-DE Promotors feststellen. TRH-R2 mRNA wurde ab Tag 14,5 dpc in der Medulla und im *Caudatus putamen* detektiert (Rabeler, Dissertation). Es darf dennoch angenommen werden, daß zeitnah mit der Expression von TRH-DE aufgrund der hohen Substratspezifität auch die anderen Komponenten des Signalsystems im Embryo bereits vorhanden sind.

Auf eine gesonderte Markierung der neuronalen Fortsätze durch den PLAP-Reporter konnte in Ganzpräparaten verzichtet werden, da lacZ zu den gegebenen Zeitpunkten ausreichend stark exprimiert wurde, um sich cytosolisch über die gesamten Ausmaße der jeweiligen Zellen zu verteilen. Deutlich konnten bei 11,5 dpc Embryonen die drei Nervenäste, die aus dem Trigeminalganglion hervorgehen, anhand der lacZ-Färbung verfolgt werden. Für die dorsalen Wurzelganglien - eine Gruppe somatosensorischer Zellkörper, die sensorische und nozizeptive Information an Neuronen im Rückenmark weiterleiten - konnte gezeigt werden, daß TRH-DE exprimierende Neurone sowohl in die Peripherie als auch in den dorsalen Trakt des Rückenmarks projizieren.

Repräsentativ für das letzte Drittel der Embryonalentwicklung, wurden die zwei Zeitpunkte 15,5 dpc und P0 (neonatal) gewählt und in Kryotomschnitten für die Färbung durch lacZ und PLAP verarbeitet. Eine unspezifische endogene Aktivität wurde zu diesen Zeitpunkten für beide Färbemethoden ausschließlich im Darm beobachtet. Eine Expression von TRH-DE konnte im wildtyp Darm jedoch spezifisch durch eine radioaktive ISH nachgewiesen werden. Gänzlich ohne Aktivität waren hingegen die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere sowie die Skelettmuskulatur. Diese Beobachtung ließ sich für die jeweiligen Gewebe mit Ausnahme der Leber durch eine radioaktive ISH in neugeborenen Wildtypen bestätigen. In der wildtyp Leber konnten jedoch TRH-DE Transkripte bei Neugeborenen durch ISH sowie in adulten Tieren durch *reverse transcription* PCR dargestellt werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde zudem der

umfangreiche Beweis geführt, daß die TRH-abbauende Serumaktivität in der Leber synthetisiert und sekretiert wird (Schmitmeier *et al.*, 2002). Da diese spezifische Serumaktivität in TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen durch radiochemische Experimente nicht mehr nachzuweisen war, wurde das Ergebnis von Schmitmeier bestätigt, daß auch das Serumenzym aus dem TRH-DE Gen hervorgeht. Folglich kann das erste Exon, das für die Transmembrandomäne kodiert und in den Mutanten für die Deletion der Genfunktion essentiell ist, bei der Transkription des Serumenzym nicht umgangen werden. Die Transmembrandomäne muß daher, wie von Schmitmeier postuliert, posttranskriptionell entfernt werden. Warum dennoch auch in adulten Mutanten keine Reporteraktivität in der Leber demonstriert werden konnte, bleibt Gegenstand von Spekulationen, zumal lacZ als gängiger Reporter auch in Lebergewebe erfolgreich eingesetzt wird. Möglich ist beispielsweise, daß durch die Mutation leberspezifische cis-Elemente des TRH-DE Promotors beeinträchtigt wurden oder Transkripte mit dem Reporterkonstrukt in der Leber besonders instabil sind.

Ganz offensichtlich liegt eine der Stärken der verwendeten Reporter in der Darstellung morphologischer Strukturen des zentralen Nervensystems. So ließen sich im Gehirn Projektionen ausgehend von einzelnen Kerngebieten, die über den lacZ-Reporter identifiziert wurden, durch den Membran-assoziierten PLAP-Reporter verfolgen. Insbesondere im Rückenmark und in den dorsalen Wurzelganglien konnten so weitreichende Nervenstränge dargestellt werden. Die pharmakologischen Effekte von TRH auf verschiedenste Parameter der Rückenmarksfunktionen wurden bereits umfassend in der Literatur diskutiert (Winokur und Utiger, 1974) und in der Einleitung dieser Arbeit im Einzelnen vorgestellt. Die Anwesenheit von TRH-DE als regulatorischer Faktor und Terminator für das TRH-Signalsystem im gesamten bulbo-spinalen Bereich (Hirnstamm-Rückenmark) ist daher nicht weiter verwunderlich.

Aus der komplexen Verteilung der TRH-DE Promotoraktivität im embryonalen Gehirn sollen an dieser Stelle nur drei, auch für die adulte Situation relevante, extrahypothalamische Regionen herausgegriffen und besprochen werden: der Cortex, der Hippocampus und das Cerebellum.

Im Cortex entstehen die ersten TRH-DE Signale vermutlich in zeitlich-räumlicher Übereinstimmung mit der Expression von präproTRH in der tiefen *subplate*-Schicht. Am Tag der Geburt ließ sich eine lacZ-Aktivität stellvertretend für TRH-DE zudem auch vereinzelt in höheren Schichten detektieren. Die Färbung durch den PLAP-Reporter zeigte zu diesem Zeitpunkt eine fast vollständige, frontal ausgerichtete Durchdringung der marginalen Zone mit Projektionen aus den tiefen Schichten. Die Ausbildung der adulten Expressionsmuster im sechsschichtigen cerebralen Isocortex dauerte für alle Komponenten des TRH-Systems auch noch über die ersten postnatalen Wochen hin an. Untersuchungen an TRH-R1 mRNA zeigten,

daß eine adulte Verteilung erst zwei Wochen nach der Geburt vorlag (Rabeler, 2001). TRH-R2 konnte im Cortex ausschließlich postnatal detektiert werden und erreichte erst nach drei Wochen das adulte Verteilungsmuster (Rabeler, 2001). In diesem Zusammenhang kann über eine mögliche autokrine bzw. parakrine und schon zu Beginn des Kapitels angesprochene neurotrophe Wirkung von TRH spekuliert werden. Da aber weder in den TRH, noch den TRH-R1 noch den TRH-DE defizienten Mäusen offensichtliche morphologische Veränderungen auftraten, sollte diesem Aspekt keine übermäßige Bedeutung zugedacht werden.

Die Entwicklung des Hippocampus konnte schon in frühen Embryonalstadien (15,5 dpc) anhand der starken Expression des lacZ-Reporters in den Pyramidalzellen verfolgt werden. Bei der Geburt waren bereits alle drei Komponenten des Hippocampus - das *Subiculum* (lacZ), das *Cornu ammonis* (lacZ) und der *Gyrus dentatus* (PLAP) - durch die Aktivität des TRH-DE Promotors zu identifizieren.

Das Cerebellum, dessen Entwicklung und Verschaltung sich weit in die postnatale Zeit erstreckt, zeigte als eine der ersten zentralnervösen Strukturen eine sehr intensive Aktivität des TRH-DE Promotors. Durch den übersichtlichen Aufbau des cerebellaren Cortex und den Vergleich embryonaler und adulter Expressionmuster, konnte TRH-DE eindeutig den Körnerzellen zugeordnet werden. Zu Anfang der cerebellaren Entwicklung wurden die entsprechenden Reporter ausschließlich in der äußeren Körnerzellschicht, dem äußeren Rand des cerebellaren Cortex, nachgewiesen, aus der die Zellen im weiteren Verlauf in eine tiefere Region auswandern, um später die innere Körnerzellschicht zu formieren. Während dieser Migration lassen sie ihre axonalen Projektionen, die als Parallelfasern die Dendritenbäume der Purkinje-Zellen kontaktieren, in der späteren molekularen Schicht zurück. Schon bei der Geburt konnte dieser Prozess durch die Anfärbung der Axone durch den PLAP-Reporter und die Markierung der Zellkörper durch lacZ dargestellt werden.

### **TRH-DE Promotoraktivität in verschiedenen Sinnesorganen**

Neben den dominanten Expressionsmustern der Reporter im ZNS, konnte eine bemerkenswerte Beteiligung des TRH-Systems an optischer, akustischer und haptischer Wahrnehmung durch die Detektion von TRH-DE Promotoraktivität in den entsprechenden sensorischen Systemen angenommen werden. In Embryonen und Neugeborenen konnten Projektionen des Trigeminalganglions über die Reporteraktivität bis zu den Vibrissenfollikeln verfolgt werden. Im Innenohr dieser Tiere wurden die Haarzellen und Spiralganglien sowie die Fasern des Hörnervs ebenfalls deutlich von den Reportern markiert. Genauso konnten in der Retina des Auges die Photorezeptoren, die ganglionäre Schicht und der Sehnerv gekennzeichnet werden. Im

Gegensatz zu Tastsinn und Hörorgan wurde das Vorkommen von TRH in der Retina schon seit Mitte der siebziger Jahre entdeckt und vielfältig untersucht (Burt, 1979; Martino *et al.*, 1980; Schaeffer *et al.*, 1977). Die Implikationen, die sich daraus ergeben, sollen aber erst an späterer Stelle in dieser Arbeit im Zusammenhang mit dem Phänotyp TRH-DE defizienter Mäuse diskutiert werden.

### **TRH-DE Promotoraktivität im adulten Gehirn**

Die weite Verbreitung des TRH-Signalsystems in den extrahypothalamischen Bereichen des ZNS wurde durch Bindungsstudien sowie immunhistochemische und immunocytochemische Untersuchungen demonstriert (Manaker *et al.*, 1985; Pazos *et al.*, 1985; Hokfelt *et al.*, 1975). Pharmakologische Experimente stützten weiterhin die Annahme, daß TRH innerhalb des ZNS die Funktion eines Neurotransmitters bzw. -modulators einnimmt. Erst mit der Identifizierung und Beschreibung von TRH-R2 in der Ratte (O'Dowd *et al.*, 2000; Heuer *et al.*, 2000) gelang es, alle durch Bindungsstudien identifizierten Wirkorte von TRH auch eindeutig einem Rezeptor zuzuordnen. Die umfassende Überlappung in der Expression der beiden nahezu komplementär lokalisierten Rezeptoren und TRH-DE unterstrich zudem die Auffassung, daß TRH-DE das TRH-Signal im ZNS terminiert. Durch diese zentrale Bedeutung eignet sich TRH-DE in besonderer Weise als Marker für die TRHergen Signalwege im Gehirn.

Die Reporteraktivitäten von lacZ und PLAP wurden im adulten Gehirn in sagittalen und coronalen Kryotomschnitten von TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen analysiert. Die Verteilung der lacZ-Expression wurde anatomischen Strukturen zugeordnet und subjektiv gemäß ihrer Intensität in einer Tabelle (Tab. 1, Seite 66) erfaßt.

Im ZNS der adulten Maus ging das weitaus stärkste Reportersignal von der Epiphyse und dem Subkommissuralorgan (SCO) aus. Des Weiteren bildeten Cortex, Hippocampus und Cerebellum neben dem Septum die prominentesten Strukturen mit TRH-DE Promotoraktivität.

Der adulte Cortex wies insbesondere im retrosplenialen granulären Cortex eine auffällig starke Reporterfärbung auf. Die Reporteraktivität war dabei im sechsschichtigen Isocortex auf fast alle Schichten verteilt, vor allem aber auf Lamina III, IV und VI sowie die tiefe *subplate*-Schicht. In ISH Experimenten konnten ebenfalls Transkripte von präproTRH in Lamina VI und der *subplate*-Schicht detektiert werden. Die mRNA von TRH-R1 wurde in den Schichten V und VI sowie der *subplate*-Schicht nachgewiesen, die von TRH-R2 in den Schichten II, III, V und VI. Durch die Überlagerung von dem lacZ-Signal im Isocortex der TRH-R1<sup>-/-</sup> Maus mit dem lacZ-Signal im Isocortex der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus konnte gezeigt werden, daß die Promotoraktivität von TRH-R1 in Lamina V am stärksten war, die nur in sehr wenigen, stark vereinzelt Zellen

Promotoraktivität von TRH-DE aufwies. Wurde stattdessen das PLAP-Signal aus der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus für die Überlagerung verwendet, konnte veranschaulicht werden, daß höhere und tiefere Schichten mit einer intensiven Aktivität des TRH-DE Promotors in die Lamina V projizierten. Damit wurde eine Schicht gekennzeichnet, die das TRH-Signal zwar über einen spezifischen Rezeptor erkennen, aber nicht über einen spezifischen Terminator regulieren konnte. Die terminierende oder modulierende Aktivität des Ektoenzym wurde in diesem Fall durch umliegende Schichten vermittelt. Eine solche Situation würde vermutlich eher eine integrativ parakrinen Signalwirkung charakterisieren als die Kommunikation am synaptischen Spalt.

Der Hippocampus gilt als zentraler Bestandteil des limbischen Systems. Seine Funktion als räumliches Gedächtnis, das der zielgerichteten Navigation in der Umwelt dient, ist in Versuchstieren gut untersucht (Übersichtsartikel: Jarrard, 1995). In TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen wurden die Somata der pyramidalen Zellen des *Cornu ammonis* (CA) insbesondere in den Bereichen CA2-CA3 durch lacZ intensiv gefärbt. Entsprechend wurden sowohl die apikalen Dendriten im *Stratum moleculare* als auch die basalen Dendriten im *Stratum oriens* durch PLAP angefärbt. Ein Vergleich der PLAP-Reporteraktivität mit der Immunoreaktivität von TRH-DE in wildtyp Gewebe zeigte eine identische Verteilung des Signals auf den Dendriten der Pyramidalzellen. Im *Gyrus dentatus* wurden die Reporteraktivitäten in der *Lamina polymorpha* und in der *Lamina moleculare* nachgewiesen. In TRH-R1<sup>-/-</sup> Tieren konnte für die Pyramidalzellen TRH-R1 als Rezeptor durch Reporterfärbung identifiziert werden.

Im Cerebellum gingen die Reportersignale, wie schon für die Embryonalentwicklung besprochen, fast ausschließlich von den Körnerzellen aus. Zusätzlich konnte in der molekularen Schicht für weitere (vermutlich Korb-) Zellen TRH-DE Promotoraktivität gezeigt werden. Auch in den Zellkörpern der unteren Olivenkerne (*Oliva inferior*) mit ihren olivo-cerebellaren Projektionen wurde eine starke lacZ-Färbung beobachtet. In den Purkinje-Zellen, die in TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen keine Färbung aufwiesen, wurde durch den lacZ-Reporter in TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen erstmalig eine klar erkennbare Aktivität des TRH-R1 Promotors in diesen Zellen demonstriert. Die Promotoraktivität des Rezeptors konnte zudem auch auf vereinzelt Zellen der Körnerzellschicht, vermutlich Golgi Typ II Neurone, dargestellt werden. Eine Expression der mRNA von TRH-R2 wurde durch ISH in der Körnerzellschicht detektiert. Ähnlich wie im Cortex präsentierte sich mit den Purkinje-Zellen eine Schicht, die zwar sensibel für TRH ist, aber nicht selbst über das Signal-terminierende Element des TRH-Systems verfügt. Auch hier kann diese regulatorische Komponente ausschließlich über die zahlreichen Kontakte mit Zellen, in denen der TRH-DE Promotor aktiv ist, zugeführt werden.

### **TRH-DE Promotoraktivität in der Hypophyse**

In Primärkulturexperimenten mit Zellen aus Rattenhypophysen korrelierte die Anreicherung von laktotrophen Zellen mit der Zunahme an spezifischer TRH-DE Aktivität stärker als es mit jedem anderen hypophysären Zelltyp (Bauer *et al.*, 1990). Trotz dieses Zusammenhangs und der Tatsache, daß TRH in Ratte und Mensch ein potentes Sekretagog von Prolaktin ist (Jacobs *et al.*, 1971; Hu und Lawson, 1994), konnte weder in Ganzpräparaten noch in Kryotomschnitten von Hypophysen aus TRH-DE<sup>+/-</sup> und -DE<sup>-/-</sup> Mäusen ein Reportersignal in laktotrophen Zellen nachgewiesen werden. Die Verteilung des lacZ-Reporters deutete, ähnlich wie schon in der TRH-R1 *Knock-out* Maus, viel mehr auf das Expressionsmuster thyrotroper Zellen hin. Für TRH-R1 wurde mit Hilfe einer ISH-Doppelmarkierung gezeigt, daß in Zellen, die TRH-R1 exprimieren, zwar Transkripte für  $\beta$ -TSH, aber nicht für Prolaktin detektiert werden konnten (Rabeler, 2001). In Ratten konnte dahingegen TRH-R1 mRNA auch in laktotrophen Zellen nachgewiesen werden (Konaka *et al.*, 1997). Daß auch in Mäusen die Synthese und Sekretion von Prolaktin durch TRH über TRH-R1 stimuliert wird, konnte in TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden, deren Prolaktin Expression stark beeinträchtigt ist (Rabeler *et al.*, 2004).

### **Veränderungen am TRH-Signalsystem im Gehirn der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus**

Mit Hilfe der radioaktiven *in situ* Hybridisierung wurden im Gehirn adulter TRH-DE defizienter Mäuse alle vier Komponenten des murinen TRH-Signalsystems dargestellt und auf Veränderungen hin untersucht. In TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren konnten erwartungsgemäß keine Transkripte aus dem TRH-DE Gen detektiert werden. Ein Unterschied in der Expressionsstärke von präproTRH mRNA konnte mit dieser Methode auch in hypothalamischen Bereichen nicht nachgewiesen werden. Der Rezeptor TRH-R1, der auf der Hypophyse durch Schilddrüsenhormone spiegelbildlich zu TRH-DE reguliert und auch im Cortex der athyroiden Pax8<sup>-/-</sup> Maus gegenüber dem Wildtyp stärker exprimiert wird (Christ, 2003), zeigte in der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus keine erkennbare Abweichung von der normalen Situation. Dahingegen war für TRH-R2 ein deutlicher Unterschied im gesamten Gehirn und speziell in den thalamischen Bereichen zu beobachten. Die Expression von TRH-R2 wurde in TRH-DE defizienten Tieren stark hochreguliert.

An dieser Stelle ist es wichtig, auf die bekannten Unterschiede und Gemeinsamkeiten von TRH-R1 und -R2 genauer einzugehen. Beide Rezeptoren sind äußerst spezifisch für TRH. So sind sie zum Beispiel nicht in der Lage die verhaltensbiologischen Effekte einer großen Familie TRH-verwandter Peptide zu vermitteln, die in limbischen Regionen des Rattenhirns gefunden wurden (Hinkle *et al.*, 2002). Zwischen TRH-R1 und -R2 besteht kein Unterschied in der



Affinität gegenüber TRH. Dennoch induziert TRH-R1 in Anwesenheit von TRH (1  $\mu$ M, 24 h) eine höhere Transkriptionsrate von Reportergenen als TRH-R2. In Abwesenheit von TRH ist die Induktion einer basalen Transkription durch TRH-R1 schwächer als durch TRH-R2 (O'Dowd *et al.*, 2000). TRH-R1 erlaubt demnach eine stringenterer Regulation TRH-vermittelter Ereignisse. In Zelllysaten wurde gezeigt, daß TRH auch in der Lage ist, zellspezifisch den Abbau der TRH-R1 mRNA zu induzieren (Fujimoto *et al.*, 1992). Diese Wirkung wird durch eine regulatorische Sequenz im 3-Strich untranslatierten Bereich der Rezeptor-1 mRNA vermittelt (Narayanan *et al.*, 1992). Für TRH-R2 ist ein vergleichbarer Mechanismus nicht bekannt. Für TRH-R1 wurde gezeigt, daß in Gegenwart von TRH die Signalantwort von Inositolphosphaten und/oder Ca<sup>2+</sup> desensitiviert wird (Drmotá und Milligan, 2000). Die Desensitivierung der Signalkaskade durch Agonist-induzierte Internalisierung ist eine schnelle Regulation der Rezeptordichte. Dieser Mechanismus ist weitaus dynamischer als Veränderungen auf Ebene der Transkription oder Translation. Die TRH-induzierte Internalisierung von TRH-R2 erfolgt wesentlich schneller als die von TRH-R1 (O'Dowd *et al.*, 2000; Sun und Gershengorn, 2002). TRH-R1 mRNA wird im Gehirn in neuroendokrinen Bereichen sowie im autonomen Nervensystem und in den viszeralen Hirnstammregionen stark exprimiert. Im Gegensatz dazu wird TRH-R2 vornehmlich in Hirnbereichen exprimiert, die eine wichtige Rolle in der Transmission somatosensorischer Signale und höherer Hirnfunktionen spielen (Übersichtsartikel: Sun *et al.*, 2003). Eventuell wird in diesen Geweben die hohe basale Aktivität von TRH-R2 benötigt, um eine persistente, TRH-unabhängige Stimulation zu gewähren, die von TRH aufgrund der vorgenannten Beobachtungen nur sehr begrenzt angehoben werden kann.

In der TRH-DE *Knock-out* Maus ist vorstellbar, daß TRH-R2 durch eine hohe Expression und sofortige Internalisierung mit anschließender Inaktivierung in Lysosomen die fehlende Signalterminierung kompensieren und die Erregbarkeit des Systems erhalten kann. Wodurch allerdings die Expression dieses Rezeptors induziert wird und ob TRH direkt an dieser Regulation beteiligt ist, muß erst noch geklärt werden.

### 4.3 Endokrinologische Analyse

#### Schilddrüsenfunktion

Im Gegensatz zu TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen, die durch den Verlust des einzigen TRH-Rezeptors auf der Hypophyse einen zentralen Hypothyroidismus aufwiesen, zeigten TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse keine Veränderung im Bereich der Schilddrüsenhormone. Trotz der Annahme, daß sich aufgrund initialer Experimente mit Nachkommen der F1-Generation ein milder Hyperthyroidismus in TRH-DE defizienten Tieren feststellen ließe, konnten bei umfassenderen Experimenten im genetischen Hintergrund von NMRI Mäusen keine signifikante Veränderungen der Serumkonzentrationen von T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> und TSH registriert werden. Der Tierbestand erlaubte es leider nicht, im Rahmen dieser Arbeit die Ergebnisse in einem anderen genetischen Hintergrund, vorzugsweise C57BL/6, zu wiederholen.

#### Hypothalamisch-Hypophysäre Achse

Um direkte Veränderungen in hormonproduzierenden hypophysären Zellen von TRH-DE *Knock-out* Tieren darzustellen, wurden diese auf Ebene der mRNA mittels *real-time* PCR (RT-PCR) und *in situ* Hybridisierung (ISH) und auf Ebene der Proteine mittels immunhistochemischer (IHC) Methoden in acht Wochen alten Mäusen untersucht. Weder in somato-, noch in gonado- oder corticotropen Zellen wurde ein Unterschied in Zellzahl und Hormonexpression anhand von ISH oder IHC bemerkt. Bei den lakto- und thyrotropen Zellen waren die Ergebnisse der RT-PCR in initialen Experimenten zunächst uneinheitlich und zeigten in den mutanten Geweben auf Transkriptebene zum Teil eine drastische Stimulation der jeweiligen Hormone Prolaktin und TSH. Dieser erste Eindruck konnte in weiteren Experimenten mit einer höheren Anzahl eingesetzter Gewebe nicht aufrechterhalten werden. Sowohl mit RT-PCR als auch durch ISH und IHC konnte bei TRH-DE defizienten Tieren und ihren Kontrollen in Übereinstimmung mit den Serumwerten kein signifikanter Unterschied in der Synthese- und Sekretionsleistung thyrotroper Zellen festgestellt werden. Das Gleiche galt auch für die laktotrophen Zellen, wobei eine Serumkonzentration hier nicht bestimmt wurde.

Unter der Voraussetzung, daß in Abwesenheit von TRH-DE die Halbwertszeit für das Signalpeptid TRH im Serum drastisch erhöht ist, muß davon ausgegangen werden, daß die hypothalamische Regulation der Synthese und Ausschüttung von TRH wenig Einfluß auf das neue endokrine Gleichgewicht in TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen hat, weil sich das Neurohormon auch bei basaler Expressions- und Sekretionsleistung vermutlich kontinuierlich zu unphysiologischen Konzentrationen anreichern würde. Auf der Hypophyse dieser Mutanten kann daher einzig über

TRH-R1 das TRH-vermittelte Gleichgewicht der HPT-Achse eingestellt werden. Durch RT-PCR Experimente konnte in *Knock-out* Hypophysen eine deutliche Verminderung der Transkriptkonzentration für TRH-R1 aufgezeigt werden. Der inhibierende Effekt von TRH auf die Expression und Sensitivität von TRH-R1 wurde weiter oben bereits diskutiert und bietet eine Erklärung für die ausgesprochene Stabilität der endokrinen Achse unter den veränderten Bedingungen in der TRH-DE *Knock-out* Maus. Es ist davon auszugehen, daß in TRH-DE defizienten Tieren die Halbwertszeit von TRH deutlich heraufgesetzt wird und durch Akkumulation des nicht abbaubaren Signalpeptids im Serum eine unphysiologische hohe Konzentration von TRH erreicht wird. Diese Konzentration kann mit einiger Wahrscheinlichkeit nicht mehr nachhaltig durch Veränderungen in der hypothalamischen Expression von TRH moduliert werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, die Flexibilität der hormonellen Homöostase in Stresssituationen zu analysieren.

Zum Beispiel sinkt als Teil der neuroendokrinen Antwort bei Krankheit die Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum. Hierbei muß es zu einer Veränderung der Rückkopplungsmechanismen auf Ebene des Hypothalamus und/oder der Hypophyse kommen, da die TSH-Konzentration unter diesen Umständen nicht entsprechend heraufreguliert wird. Es konnte gezeigt werden, daß eine erniedrigte Synthese von hypothalamischem TRH zu der anhaltend niedrigen TSH-Serumkonzentration beiträgt (Fliers *et al.*, 1998). Ein Anteil am Hypothyroidismus, der mit Infektionen einhergeht, wird einer verstärkten Dejodinaseaktivität in Tanycyten zugeschrieben, die das Prohormon  $T_4$  in  $T_3$  überführt. Tanycyten sind spezialisierte Gliazellen, die die infralateralen Wände und den Boden des dritten Ventrikels auskleiden. Diese Zellen könnten den inhibierenden Effekt auf die TRH-Expression hypophysiotroper Neuronen durch einen lokalen Anstieg von  $T_3$  vermitteln (Lechan und Fekete, 2004). Die zentrale Regulation durch TRH wäre in TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen aus den zuvor genannten Gründen vermutlich stark beeinträchtigt. Ähnlich dem krankheitsbedingten hypothyroiden Zustand kann auch in fastenden Tieren eine absinkende Schilddrüsenhormonkonzentration ohne die zu erwartenden Rückkopplungseffekte auf die TSH-Serumkonzentration beobachtet werden. Auch hier liegt eine Veränderung in der zentralen Regulation der HPT-Achse vor. Es wurde gezeigt, daß in fastenden Tieren sowohl AGRP (*Agouti-related protein*), als auch Neuropeptid Y eine große Rolle bei der Inhibition der hypothalamischen Expression von TRH spielen (Fekete *et al.*, 2002). Die Untersuchung fastender TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse könnte daher einen interessanten Ansatz für die regulatorische Bedeutung von TRH-DE in der endokrinen Achse darstellen.

## 4.4 Phänotyp TRH-DE defizienter Mäuse

### Allgemeiner Phänotyp

TRH-DE defiziente Mäuse zeigten im täglichen Umgang keinen offensichtlichen Phänotyp und verfügten über das gesamte beobachtbare Repertoire angeborener Verhaltensmuster. Die Mäuse wiesen keine motorischen Einschränkungen auf. Nest- und Aufzuchtverhalten waren normal. Es gab keine auffälligen Unterschiede bei Paarungsverhalten, Fertilität, Wurfgröße oder Überlebensrate der homozygoten Nachzuchten. Erwachsene Männchen etablierten in gleichgeschlechtlichen Gemeinschaften eine hierarchische Ordnung und zeigten entsprechend der eingekreuzten Linien ein normales Verhalten in Bezug auf Aggression und Unterordnung.

TRH-DE<sup>-/-</sup> Tiere aus der F3-Generation im genetischen NMRI-Hintergrund wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren eine deutlich niedrigere Körpergewicht, aber einen vergleichbaren Wachstumsverlauf auf. Mögliche Effekte für den Gewichtsunterschied, die nicht im Zusammenhang mit der eigentlichen Mutation stehen, wurden bereits weiter vorne diskutiert.

Trotz der Vielzahl extrahypothalamischer Wirkorte, und einer Fülle von Funktionen, an denen das Signalpeptid TRH in verschiedener Form beteiligt ist, lassen sich durch den Verlust des TRH-abbauenden Ektoenzym unter Standardbedingungen keine gravierenden Veränderungen im Organismus der Maus erzielen. Dies entspricht der Auffassung, daß die Effekte von TRH in besonderer Weise vom Status des Organismus abhängig sind und dem ZNS in einer weitgefaßten Funktion als homöostatischer Modulator dienen (Gary *et al.*, 2003).

### Lichtabhängige lokomotorische Aktivität in der TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus

Eine enge Verflechtung von TRH mit biologischen Systemen, die eine rhythmische Aktivität aufweisen, wurde schon vielfach dokumentiert. TRH und TRH-Rezeptoren sind im hypothalamischen suprachiasmatischen Nucleus (SCN), dem primären circadianen Schrittmacher, lokalisiert (Manaker *et al.*, 1985). Obwohl die Quelle von TRH im SCN unbekannt ist, wurde TRH in zwei von drei afferenten Projektionen zum SCN detektiert, nämlich den dorsalen Raphekernen (Merchenthaler *et al.*, 1988) und den Ganglionzellen der Retina (Lexow, 1996).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden unter der freundlichen Leitung von Dr. H. Oster die circadianen Aktivitätsmuster von TRH-R1 und TRH-DE *Knock-out* Mäusen unter verschiedenen, definierten Lichtbedingungen bestimmt. Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Tiere mit einem C57BL/6J Hintergrund verwendet. Drei wesentliche Beobachtungen konnten bei der Analyse der Daten aus den Experimenten mit TRH-DE defizienten Mäusen erhalten werden:

1. TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine erhöhte Gesamtaktivität unter normalen Licht/Dunkel-Bedingungen; 2. TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine erniedrigte Gesamtaktivität unter konstantem Lichtstreß; und 3. TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine normale Gesamtaktivität in konstanter Dunkelheit. Die Erhöhung der Gesamtaktivität unter zyklischen Lichtbedingungen, ergab sich ausschließlich aus der Aktivität während der Dunkelphase. Im Gegensatz zu den Kontrollen nahmen die TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse erst pünktlich mit Einsetzen der Dunkelheit ihre Aktivitäten auf. Die TRH-R1 *Knock-out* Mäuse zeigten dahingegen einen weitaus weniger ausgeprägten Phänotyp, der sich in einer leicht verminderten Aktivität bei normaler Licht/Dunkel-Rhythmik äußerte und allein durch den hypothyroiden Zustand der Tiere bedingt sein konnte. In beiden Mutanten wurde kein offensichtlicher Defekt der inneren Uhr festgestellt.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Umgebungslicht und dem TRH-Gehalt in der Retina, konnte bereits Ende der siebziger Jahre demonstriert werden (Schaeffer *et al.*, 1977). In der Retina von Ratten konnte am Tage eine gegenüber der Nacht zwei- bis vierfach erhöhte Menge von TRH detektiert werden. Der diurnale Wechsel der TRH-Konzentration unterlag dabei keiner circadianen Rhythmik, sondern konnte allein durch Veränderungen des Umgebungslichts beeinflußt werden. Der Anstieg der Konzentration erfolgte nach einsetzendem Licht mit einer Verzögerung von vier Stunden. Zwei Stunden nach Beginn der Dunkelheit nahm die Konzentration wieder ab. Eine spätere Studie zeigte darüber hinaus, daß bei Ratten, die 30 Tage in Dunkelheit aufgezogen wurden, in der Retina kein TRH nachweisbar war (Martino *et al.*, 1980). In der Retina von Kaninchen wurde schließlich auch die Aktivität von TRH-DE beschrieben (Wilk *et al.*, 1988).

Die deutliche photische Abhängigkeit der TRH-Konzentration in der Retina bringt die Signalsubstanz in enge Verbindung mit der Interpretation von Tag- und Nachtzuständen, der saisonalen Veränderung der Tageslänge und allgemein dem Lichtabgleich (*photic entrainment*) des circadianen Systems. In dieser Arbeit wurden durch die Kartierung der Promotoraktivität von TRH-DE, stellvertretend für das TRH-Signalsystems, weitere Indizien für einen solchen Zusammenhang hinzugefügt. Die zuvor gezeigte Reporterfärbung in der Retina neugeborener Mäuse wies eine intensive Aktivität des TRH-DE Promotors besonders in retinalen Ganglienzellen aus. Wie erst in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, ist ein Teil dieser Zellen, der direkt in den SCN projiziert, photosensitiv (Berson *et al.*, 2002) und am circadianen Lichtabgleich beteiligt. Mit der am Auge gelegenen Harderschen Drüse und dem Pinealorgan (Epiphyse) wurde eine auffällig starke TRH-DE Promotoraktivität auch in zwei weiteren Organen lokalisiert, die über die Synthese und Ausschüttung von Melatonin eine hormonelle Signalisierung der integrierten Lichtinformation vermitteln (Djeridane und Touitou, 2001; Oster

*et al.*, 2002). Die Hardersche Drüse, die besser als Hardersche Tränendrüse für die Sekretion von auffällig roten Porphyrinen bekannt ist und sich in allen Tieren mit einer Nickhaut finden läßt, beinhaltet sogar Photorezeptoren (Vaughan *et al.*, 1988; Lythgoe, 1984) und steht in einem Zusammenhang mit der Regulation des Pinealorgans (Blackshaw und Snyder, 1997). In Ratten konnte eine endokrine Sekretion von Melatonin zusätzlich zu der exokrinen Sekretion von Porphyrinen und Gleitfetten gezeigt werden (Djeridane und Touitou, 2001). Eine mögliche Verbindung zwischen der Retina, der Harderschen Drüse, dem Pinealkomplex und dem ebenfalls stark TRH-DE exprimierenden Subkommissuralorgan (SCO) wurde in Froschexperimenten angedeutet (Diederer, 1975). In diesen Tieren wurde die sekretorische Leistung des SCO nachweislich durch die photorezeptiven Organe unter Lichteinfluß inhibiert. Das SCO ist auch in Ratten über den lateralen *Nucleus geniculatus* sowohl mit dem Pinealkomplex als auch mit dem suprachiasmatischen Nukleus verbunden (Mikkelsen, 1994). Die Funktion des SCO ist jedoch weitestgehend unklar.

Vor diesem Hintergrund müssen nun die Ergebnisse aus den Laufradstudien diskutiert werden. Ein Melatonin-vermittelter Effekt ist schon zu Anfang auszuschließen, da der verwendete Mäusestamm (C57BL/6J) schwere Defekte in zwei Genen (N-Acetyltransferase und Hydroxyindol-O-methyltransferase) aufweist, die für die Synthese von Melatonin aus Serotonin unabdingbar sind (Ebihara *et al.*, 1986). Intuitiv kann die Situation in der TRH-DE *Knock-out* Maus anhand des Aktivitätsprofils so verstanden werden, daß sich am Ende der Lichtperiode ein intrinsischer, circadian kontrollierter Stimulus einstellt, lokomotorisch aktiv zu werden. Dieser wird photisch durch gegenläufige Regulation unterdrückt. Bleibt das photische Signal aus, entfällt spontan die gegenläufige Regulation und der Stimulus übersteuert kurzfristig. In konstanter Dunkelheit wird die Aktivität ohne Gegenspieler allein durch den circadianen Stimulus ausgelöst und befindet sich in einem stabilen lichtunabhängigen Gleichgewicht. In konstantem Lichtstreß hingegen wird der circadian regulierte Stimulus permanent durch eine gegenläufige Regulation unterdrückt und eine lokomotorische Aktivität nur möglich, wenn andere Stimuli additiv hinzukommen. Diese reine Spekulation bleibt allerdings eine Textaufgabe, deren Unbekannten ohne weitere Angaben bzw. Experimente so nicht zu lösen sind. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß das TRH-System modulierend daran beteiligt ist, eine Balance zwischen circadianer Oszillation und den Veränderungen des Umgebungslichts zu etablieren, um innerhalb einer saisonalen Rhythmik das Verhalten an die jeweiligen Bedingungen zu adaptieren. TRH-DE<sup>-/-</sup> Tiere zeigen, daß Veränderungen im Umgebungslicht mit der Geschwindigkeit eines neuronalen Netzes umgesetzt wird. Die lichtinduzierte Veränderung im TRH-Gehalt der Retina reagiert zu träge, um hierbei eine direkte

Rolle zu spielen. Vorstellbar ist viel mehr, daß im TRHergen System Licht-induzierte (TRH) und circadian kontrollierte (TRH-DE, Rezeptor) Komponenten vereint werden, die eine integrierte Modulation der Aktivität gestatten.

#### **4.5 Perspektiven**

Die TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus bietet eine interessante Ausgangsposition für viele Fragestellungen, die mit dem TRHergen System zusammenhängen. Ohne den Einfluß des TRH-DE Serumenzyms, das unter normalen Umständen die Halbwertszeit von TRH maßgeblich begrenzt und einen Nachweis des endogenen Peptids im Serum verhindert, kann in der TRH-DE defizienten Mutante versucht werden, TRH sogar noch im Urin quantitativ (RIA) zu bestimmen. Das Ergebnis ließe sich auf die effektive hypothalamische Ausschüttung von TRH beziehen. Der TRH-Gehalt im Urin könnte dann in einem Zeitverlauf am lebenden Tier unter verschiedenen Bedingungen verfolgt werden, um die zentrale Regulation der TRH Sekretion zu analysieren.

Da die Mutation inzwischen in der fünften Generation einer kongenen Mauslinie mit C57BL/6J-Hintergrund vorliegt, stehen geeignete Tiere für weitere Verhaltensexperimente zur Verfügung. Die starke Expression von TRH-DE im Cerebellum und im Hippocampus kann mit Lernvorgängen in Verbindung gebracht werden, die zunächst in einfachen Testaufbauten wie dem *RotaRod* und dem *Morris Water Maze* für die TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus charakterisiert werden sollten. Während beim *RotaRod* motorisches Lernen (Cerebellum: Glickstein, 1992) auf einem beschleunigenden Balancierstab abgefragt wird, testet das *Morris Water Maze* Experiment das räumliche Lernen (Hippocampus: Sprick, 1995) bei der Suche der Maus nach einer versteckten Rettungsplattform in einem Schwimmbassin.

Die Bedeutung von TRH im chronobiologischen System hat durch die Verhaltensstudien an TRH-DE defizienten Mäusen neue Ansätze erhalten, die in weiteren Laufradexperimenten bestätigt und auch auf molekularbiologischer Ebene überprüft werden sollten. Mit Hilfe quantitativer Verfahren wie der *Real-Time* PCR ist eine Möglichkeit gegeben, den circadianen Expressionsverlauf des TRH-Systems in ausgewählten Geweben darzustellen und die Frage nach einer rhythmisch kontrollierten Komponente zu klären. Über die Reporterfunktionalität der TRH-R1<sup>-/-</sup> Maus kann außerdem gezeigt werden, ob TRH-R1 ein Bestandteil des TRH-Signalsystems in der Retina ist. Dieses Gewebe läßt sich über *in situ* Hybridisierung sonst nur unzureichend erschließen.

Ein Aspekt, der in dieser Arbeit wenig Beachtung gefunden hat, ist die Expression von TRH-DE in circumventrikulären Organen wie der Epiphyse, dem Subkommissuralorgan (SCO) und der

*Area postrema.* Insbesondere das SCO zeigt eine extrem starke TRH-DE Promotoraktivität und könnte im Gehirn die Sekretion von TRH-DE in die Cerebrospinalflüssigkeit bewirken. Der Beweis einer solchen Aktivität, die der Sekretion des Serumenzym aus der Leber vergleichbar wäre, müsste allerdings erst erbracht werden, indem die spezifische TRH-abbauende Aktivität im Liquor von Wildtypen und TRH-DE defizienten Mäusen miteinander verglichen wird. Ein erster Hinweis auf die Sekretion von TRH-DE im SCO wurde durch die verhältnismäßig schwache TRH-DE Immunoreaktivität in diesem Organ angedeutet, die in keinem Verhältnis zu dem starken mRNA-Signal der entsprechenden *in situ* Hybridisierung steht (A. Weiß, persönliche Kommunikation). Innerhalb der Ventrikel konnte im jeweiligen choroidalen Plexus zudem eine starke Expression von TRH-R1 demonstriert werden, die auch die Komponenten TRH und TRH-DE im ventrikulären Raum erwarten ließ.

Neben der hier beschriebenen TRH-DE defizienten Maus wurden Studien über TRH<sup>-/-</sup> und TRH-R1<sup>-/-</sup> Mausmutanten bereits veröffentlicht (Yamada *et al.*, 1997; Rabeler *et al.*, 2004). Damit sind drei Komponenten des TRH-Signalsystems als *Knock-out* Tiere vorhanden. Während die Phänotypen in TRH<sup>-/-</sup> und TRH-R1<sup>-/-</sup> Mäusen im Wesentlichen, wenn auch nicht ausschließlich, durch den auftretenden tertiären Hypothyroidismus bestimmt waren und viele Effekte zeigten, die sich auf den Mangel an Schilddrüsenhormonen zurückführen ließen, lieferte die Deletion des TRH-DE Gens Einblick in die modulatorische Funktionsvielfalt von extrahypothalamischem TRH. Zusammen mit kürzlich entwickelten spezifischen Inhibitoren für TRH-DE ( $K_i = 1 \text{ nM}$ ; Kelly *et al.*, 2005) sollte die TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus, besonders aufgrund der guten Darstellbarkeit der Genaktivität durch die beiden Reporter, Anwendung bei der funktionellen Erforschung von TRH finden. Hierdurch könnten weitere Grundlagen geschaffen werden, die helfen würden, das große therapeutische Potential von TRH besser zu charakterisieren.



## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das nach seiner TSH-freisetzenden Wirkung benannte hypothalamisch-hypophysiotrope Tripeptidhormon TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) verfügt neben seiner neuroendokrinen Funktion in der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse auch in extrahypothalamischen Bereichen des zentralen Nervensystem (ZNS) über zahlreiche Wirkorte und vermittelt eine Vielzahl verhaltensbiologischer und pharmakologischer Effekte.

TRH kann aufgrund seiner außergewöhnlichen Struktur (pyroGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) extrazellulär nur durch das TRH-abbauende Ektoenzym, TRH-DE (EC 3.4.19.6), inaktiviert werden. Eine lösliche TRH-abbauende Serumaktivität geht in der Leber proteolytisch aus TRH-DE hervor. TRH-DE zeigt eine ungewöhnlich hohe Substratspezifität, da außer TRH keine weiteren physiologisch relevanten Substrate bekannt sind. An Ratten wurde gezeigt, daß TRH-DE in der Adenohypophyse unter der stringenten Kontrolle peripherer Hormone (Schilddrüsenhormone und Estradiol) steht und spiegelbildlich zu dem dort exprimierten Rezeptor, TRH-R1, reguliert wird (Schomburg und Bauer, 1995; Schomburg und Bauer, 1997). Es kann daher eine integrativ-modulatorische Funktion von TRH-DE innerhalb des TRH-Signalsystems der Hypophyse vermutet werden. In Gehirn und Rückenmark überlappt die Verteilung von TRH-DE im Wesentlichen mit den größtenteils komplementären Verteilungsmustern von TRH-R1 und -R2. Dies stützt die Hypothese, daß TRH-DE auch bei der TRH-vermittelten Modulation sensorischer, lokomotorischer und kognitiver Funktionen im ZNS eine wichtige Rolle spielt. Das TRH-Signal wird im ZNS von TRH-DE terminiert, da es als einziges TRH-abbauendes Enzym für die Hydrolyse des synaptisch ausgeschütteten Tripeptids in Frage kommt. TRH-DE kann demnach als Marker für TRHerge Signalwege gesehen werden (Heuer *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde TRH-DE durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen gezielt inaktiviert (*Knock-out*). Die entsprechende Mutation wurde durch Blastozysteninjektion in chimäre Tiere eingebracht und nach erfolgreicher Keimbahntransmission in den Mausstämmen 129svJ, C57BL/6J und NMRI etabliert. Aufgrund der Größe des murinen TRH-DE Gens (19 Exons auf mehr als 400 kb) wurde nur die kodierende Sequenz im ersten Exon und ein Teil des ersten Introns deletiert und durch Elemente des *Targeting*-Vektors ersetzt. Dabei wurde im direkten Anschluß an das TRH-DE Startkodon ein IRES-gekoppeltes Doppelreporterkonstrukt aus bakterieller  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) und humaner plazentarer alkalischer Phosphatase (PLAP) in das Genom eingefügt. Eine ebenfalls eingefügte

Neomycinresistenz, die ausschließlich für die Selektion der embryonalen Stammzellen nötig war, wurde über ein Cre/loxP-System nachträglich im C57BL/6J-Hintergrund entfernt.

Homozygot mutante Mäuse (TRH-DE<sup>-/-</sup>) wurden mit der erwarteten Mendel'schen Frequenz aus heterozygoten Verpaarungen geboren und ließen sich nicht von ihren wildtyp Geschwistern unterscheiden. Der Verlust der TRH-DE Genaktivität wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bestätigt. Es wurde dabei der Beweis erbracht, daß die membranständige TRH-abbauende Aktivität und die lösliche Serumaktivität aus dem selben Gen hervorgehen, da sich beide Aktivitäten in TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren spezifisch nicht mehr nachweisen lassen.

Mit Hilfe der beiden Reporter wurde während der Embryonalentwicklung und im adulten Gehirn die Aktivität des TRH-DE Promotors als Marker für das TRH-Signalsystem verfolgt. Durch das cytosolisch exprimierte lacZ konnten vor allem entsprechende Zellkörper und durch das Membran-assoziierte PLAP deren Zellfortsätze und Projektionen dargestellt werden.

Besonders eindrucksvoll wurden auf diese Weise einzelne neuronale Komponenten des akustischen und optischen Apparates hervorgehoben, die Hinweise auf die Beteiligung des TRH-Systems bei der Reizentwicklung in diesen Organen gaben. Im zentralen Nervensystem der adulten Maus wurde die stärkste Reporteraktivität in der Epiphyse und dem Subkommissuralen Organ nachgewiesen. Beide Strukturen zeigen ein lichtabhängiges Sekretionsverhalten und gehen während der Embryonalentwicklung aus einer gemeinsamen Wachstumszone am Dach des Diencephalon hervor, die bei mutanten Tieren schon in frühen Stadien (10,5 dpc) durch die Reporter identifiziert werden konnte. Zusammen mit der am Auge angelegten Harderschen Drüse, die wie die Epiphyse eine lichtabhängige Melatoninausschüttung zeigt, konnte eine starke Beteiligung des TRH-Signalsystems in drei sekretorische Geweben demonstriert werden, deren Aktivität maßgeblich durch Licht bestimmt wird. Des Weiteren konnte mit den Reportern im adulten Gehirn eine ähnliche Verteilung der TRH-DE Promotoraktivität beobachtet werden, wie sie zuvor auch für die Ratte anhand von in situ Hybridisierungen beschrieben wurde. Die höchsten Intensitäten entfielen dabei auf Cortex, Hippocampus und Cerebellum. Weder in embryonalen Entwicklungsstadien noch in der adulten Maus konnte in der Leber, der ausgewiesenen Quelle der Serumvariante von TRH-DE, die Aktivität des TRH-DE Promotors durch die Reporter dargestellt werden. In der adulten Hypophyse entsprach die Verteilung von Zellen mit Reporteraktivität, dem Verteilungsmuster thyrotroper Zellen.

TRH-DE defiziente Mäuse zeigten im Serum weder eine Veränderung der Schilddrüsenhormonwerte noch der TSH-Werte. Auch die mRNA-Expression von  $\beta$ -TSH und Prolaktin in den Adenohypophysen von TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren unterschied sich nicht signifikant von der Expression in entsprechenden wildtyp Kontrollen. Eine Übersteuerung der Hypophyse durch

nicht abgebautes TRH, schien dabei hauptsächlich auf Ebene des Rezeptors durch eine deutliche Absenkung der TRH-R1 Transkriptspiegel vermieden zu werden. Es ist bekannt, daß TRH die mRNA von TRH-R1 in Hypophysenzellen destabilisiert. Mit Methoden der *in situ* Hybridisierung konnten im Gehirn dahingegen keine Unterschiede bei der Expression von TRH-R1 in der Mausmutante und im Wildtyp festgestellt werden. Auch die Transkriptspiegel von präproTRH blieben in der Mutante unverändert. Für die Transkripte von TRH-R2 konnte allerdings in TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren im gesamten ZNS und besonders in thalamischen Regionen ein deutlicher Anstieg gezeigt werden.

Im Gegensatz zu den TRH-R1 defizienten Mäusen, die aufgrund ihres Defekts einen zentralen Hypothyroidismus und in Folge davon ein verzögertes Wachstum zeigten, wurden in TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäusen keine hormonellen Ursachen für ein verändertes Wachstum gefunden. Dennoch wurde für Mäuse, die bereits über drei Generationen in den NMRI-Hintergrund eingezüchtet worden waren, ein offensichtlicher Unterschied zwischen TRH-DE<sup>-/-</sup> Tieren und wildtyp Kontrollen beobachtet. Dieser Wachstumseffekt reflektierte aber mit hoher Wahrscheinlichkeit eher eine zufällig kritische Beteiligung von Resten des 129sv-Genoms der embryonalen Stammzellen als die eigentliche Mutation im TRH-DE Gen. Abgesehen von den absoluten Gewichten konnten bei diesen Tieren keine Unterschiede im Wachstumsverlauf aufgezeigt werden.

In Laufradexperimenten wurde für TRH-DE defiziente Mäuse unter zyklischen Licht/Dunkel Bedingungen (12:12 h) eine weitaus höhere Aktivität während der Dunkelphase gemessen als für entsprechende Kontrolltiere. Dem gegenüber stand eine starke Repression der Aktivität unter konstantem Lichtstress. Auch nahmen TRH-DE<sup>-/-</sup> Mäuse unter zyklischen Licht/Dunkel Bedingungen ihre Laufradaktivität erst exakt mit Beginn der Dunkelheit auf, während ihre Kontrollen schon weit vor Ende der Lichtphase Aktivität zeigten. Insgesamt gab es dabei aber keine Hinweise auf eine Störung der circadianen Rhythmik.

Zusammengenommen bietet die TRH-DE<sup>-/-</sup> Maus die Möglichkeit, die Entwicklung und Verknüpfung des TRH-Signalsystems über Reporter darzustellen und den regulatorischen Einfluß des TRH-abbauenden Ektoenzym innerhalb dieses Systems zu charakterisieren. Während unter konstanten Bedingungen keine gravierende Beeinträchtigung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse vorlag, konnte eine Veränderung aus dem extrahypophysiotropen Funktionskreis von TRH in Laufradexperimenten aufgedeckt werden. Die konsequent phototrope Modulation der lokomotorischen Gesamtaktivität steht im Einklang mit der Beteiligung des TRH-Systems in Bereichen der optischen Reizverarbeitung.

## 6. LITERATUR

- Agarwal, R. A.; Rastogi, R. B. und Singhal, R. L. (1976): "Changes in brain catecholamines and spontaneous locomotor activity in response to thyrotropin releasing hormone", Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. **15**(4): 743-752.
- Amaral, D. G. und Witter, M. P. (1989): "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data", Neuroscience **31**(3): 571-591.
- Aragay, A. M.; Katz, A. und Simon, M. I. (1992): "The G alpha q and G alpha 11 proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH3 rat pituitary cells", J.Biol.Chem. **267**(35): 24983-24988.
- Arancibia, S.; Rage, F.; Astier, H. et al. (1996): "Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment", Neuroendocrinology **64**(4): 257-267.
- Arimura, A. (1976): "Recent development in the study of hypothalamic hormones with special reference to LH-RH and somatostatin", Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi **52**(11): 1159-1183.
- Arnold, R.; Klingberg, F. und Schaker, W. (1991): "Systemically applied thyrotropin-releasing hormone (TRH) modifies spontaneous behaviour of rats", Biomed.Biochim.Acta **50**(12): 1217-1224.
- Artelt, P.; Grannemann, R.; Stocking, C. et al. (1991): "The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells", Gene **99**(2): 249-254.
- Bandler, R. und Shipley, M. T. (1994): "Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?", Trends Neurosci. **17**(9): 379-389.
- Bauer, K. (1987): "Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones", Nature **330**(6146): 375-377.
- Bauer, K. (1988): "Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones", Biochimie **70**(1): 69-74.
- Bauer, K.; Carmeliet, P.; Schulz, M. et al. (1990): "Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells", Endocrinology **127**(3): 1224-1233.
- Bayliss, D. A.; Viana, F.; Talley, E. M. et al. (1997): "Neuromodulation of hypoglossal motoneurons: cellular and developmental mechanisms", Respir.Physiol **110**(2-3): 139-150.
- Bennett, G. W.; Ballard, T. M.; Watson, C. D. et al. (1997): "Effect of neuropeptides on cognitive function", Exp.Gerontol. **32**(4-5): 451-469.
- Berson, D. M.; Dunn, F. A. und Takao, M. (2002): "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock", Science **295**(5557): 1070-1073.
- Bhargava, H. N. (1980): "The effects of thyrotropin releasing hormone and histidyl-proline diketopiperazine on delta-9-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia", Life Sci. **26**(11): 845-850.
- Blackshaw, S. und Snyder, S. H. (1997): "Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function", J.Neurosci. **17**(21): 8074-8082.
- Boler, J.; Enzmann, F.; Folkers, K. et al. (1969): "The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide", Biochem.Biophys.Res.Commun. **37**(4): 705-710.
- Boschi, G.; Desiles, M.; Reny, V. et al. (1983): "Antinociceptive properties of thyrotropin releasing hormone in mice: comparison with morphine", Br.J.Pharmacol. **79**(1): 85-92.
- Boschi, G. und Rips, R. (1981): "Effects of thyrotropin releasing hormone injections into different loci of rat brain on core temperature", Neurosci.Lett. **23**(1): 93-98.
- Bowers, C. Y.; Friesen, H. G.; Hwang, P. et al. (1971): "Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolinamide", Biochem.Biophys.Res.Commun. **45**(4): 1033-1041.
- Bradbury, A. F.; Finnie, M. D. und Smyth, D. G. (1982): "Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes", Nature **298**(5875): 686-688.
- Breese, G. R.; Cott, J. M.; Cooper, B. R. et al. (1974): "Antagonism of ethanol narcosis by thyrotropin releasing hormone", Life Sci. **14**(6): 1053-1063.
- Brewster, D. (1983): "Species variations in TRH inactivation: advantages of stable analogues", In: Griffiths,E.C.Bennett,G.W.(eds) Thyrotropin Releasing Hormone.Raven Press. New York: 109-118.
- Browne, P. und O'Cuinn, G. (1983): "An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl amino peptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro", Eur.J.Biochem. **137**(1-2): 75-87.
- Brownstein, M. J.; Palkovits, M.; Saavedra, J. M. et al. (1974): "Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain", Science **185**(4272): 267-269.

- Burgus, R.; Dunn, T. F.; Desiderio, D. et al. (1969): "[Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the PCA-His-Pro-NH<sub>2</sub> sequence]", C.R.Acad.Sci.Hebd.Seances Acad.Sci.D. **269**(19): 1870-1873.
- Burt, D. R. (1979): "Thyrotropin releasing hormone: apparent receptor binding in retina", Exp.Eye Res. **29**(4): 353-365.
- Burt, D. R. und Snyder, S. H. (1975): "Thyrotropin releasing hormone (TRH): apparent receptor binding in rat brain membranes", Brain Res. **93**(2): 309-328.
- Cao, J.; O'Donnell, D.; Vu, H. et al. (1998): "Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor", J.Biol.Chem. **273**(48): 32281-32287.
- Casabona, G.; Bruno, V.; Catania, M. V. et al. (1992): "Thyrotropin releasing hormone (TRH) and its analog, RGH-2202, accelerate maturation of cerebellar neurons in vitro", Brain Res.Dev.Brain Res. **69**(2): 179-183.
- Chi, M. L. und Lin, M. T. (1983): "Involvement of adrenergic receptor mechanisms within hypothalamus in the fever induced by amphetamine and thyrotropin-releasing hormone in the rat", J.Neural Transm. **58**(3-4): 213-222.
- Christ, S. (2003): "Untersuchungen zur Entwicklung des cerebralen TRH-Systems und des auditorischen Organs in der athyroiden Pax8 -/- Maus", Dissertation Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie.
- Cohn, M. J. und Tickle, C. (1996): "Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan", Trends Genet. **12**(7): 253-257.
- Court JA; McDermott, J. R.; Gibson, A. M. et al. (1987): "Raised thyrotrophin-releasing hormone, pyroglutamylamino peptidase, and proline endopeptidase are present in the spinal cord of wobbler mice but not in human motor neurone disease", J.Neurochem. **49**(4): 1084-1090.
- Cuenca, E.; Serrano, M. I.; Gibert-Rahola, J. et al. (1978): "[The analgesic activity of TRH and MSH]", Arch.Farmacol.Toxicol. **4**(1): 71-76.
- de la Pena, P.; Delgado, L. M.; del, Camino D. et al. (1992a): "Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH3 rat anterior pituitary cells", Biochem.J. **284** ( Pt 3): 891-899.
- de la Pena, P.; Delgado, L. M.; del, Camino D. et al. (1992b): "Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties", J.Biol.Chem. **267**(36): 25703-25708.
- Diederer, J. H. (1975): "A possible functional relationship between the subcommissural organ and the pineal complex and lateral eyes in *Rana esculenta* and *Rana temporaria*", Cell Tissue Res. **158**(1): 37-60.
- Djeridane, Y. und Touitou, Y. (2001): "Melatonin synthesis in the rat harderian gland: age- and time-related effects", Exp.Eye Res. **72**(4): 487-492.
- Drago, F.; Pulvirenti, L.; Spadaro, F. et al. (1990): "Effects of TRH and prolactin in the behavioral despair (swim) model of depression in rats", Psychoneuroendocrinology **15**(5-6): 349-356.
- Drnotta, T. und Milligan, G. (2000): "Kinetic analysis of the internalization and recycling of [3H]TRH and C-terminal truncations of the long isoform of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor-1", Biochem.J. **346** Pt 3: 711-718.
- Duthie, S. M.; Taylor, P. L.; Anderson, L. et al. (1993a): "Cloning and functional characterisation of the human TRH receptor", Mol.Cell Endocrinol. **95**(1-2): R11-R15.
- Duthie, S. M.; Taylor, P. L. und Eidne, K. A. (1993b): "Characterization of the mouse thyrotrophin-releasing hormone receptor gene: an exon corresponds to a deletion in the rat cDNA", J.Mol.Endocrinol. **11**(2): 141-149.
- Dutour, A.; Bulant, M.; Giraud, P. et al. (1989): "Pro-TRH-connecting peptides in the rat pancreas during ontogenesis", Peptides **10**(3): 523-527.
- Ebihara, S.; Marks, T.; Hudson, D. J. et al. (1986): "Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse", Science **231**(4737): 491-493.
- Faivre-Bauman, A.; Grouselle, D.; Nemeskeri, A. et al. (1978): "Ontogenesis of thyroliberin in the mouse hypothalamus", Brain Res. **154**(2): 382-387.
- Fekete, C.; Sarkar, S.; Rand, W. M. et al. (2002): "Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis", Endocrinology **143**(10): 3846-3853.
- Fink, G. (1976): "The development of the releasing factor concept", Clin.Endocrinol.(Oxf) **5** Suppl: 245S-260S.
- Fischer, W. H. und Spiess, J. (1987): "Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides", Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **84**(11): 3628-3632.
- Flier, J. S und Foster, D. W. (1997): "Eating disorders: obesity, anorexia nervosa, and bulimia nervosa.", In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds) Williams Textbook of Endocrinology, ed 9.W.B.Saunders Co., Philadelphia: 1061-1098.
- Fliers, E.; Wiersinga, W. M. und Swaab, D. F. (1998): "Physiological and pathophysiological aspects of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the human hypothalamus", Thyroid **8**(10): 921-928.
- Fomina, A. F. und Levitan, E. S. (1995): "Three phases of TRH-induced facilitation of exocytosis by single lactotrophs", J.Neurosci. **15**(7 Pt 1): 4982-4991.

- Franklyn, J. A.; Wood, D. F.; Balfour, N. J. et al. (1987): "Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement in vivo on pituitary cytoplasmic concentrations of thyrotropin-beta and alpha-subunit messenger ribonucleic acids", Endocrinology **120**(6): 2279-2288.
- French, T. A.; Masserano, J. M. und Weiner, N. (1993): "Influence of thyrotropin-releasing hormone and catecholaminergic interactions on CNS ethanol sensitivity", Alcohol Clin.Exp.Res. **17**(1): 99-106.
- Fujimoto, J.; Narayanan, C. S.; Benjamin, J. E. et al. (1992): "Posttranscriptional up-regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor messenger ribonucleic acid by TRH in COS-1 cells transfected with mouse pituitary TRH receptor complementary deoxyribonucleic acid", Endocrinology **131**(4): 1716-1720.
- Garat, B.; Miranda, J.; Charli, J. L. et al. (1985): "Presence of a membrane bound pyroglutamyl amino peptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain", Neuropeptides **6**(1): 27-40.
- Garrick, T.; Buack, S.; Veisoh, A. et al. (1987): "Thyrotropin-releasing hormone (TRH) acts centrally to stimulate gastric contractility in rats", Life Sci. **40**(7): 649-657.
- Gary, K. A.; Sevarino, K. A.; Yarbrough, G. G. et al. (2003): "The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics", J.Pharmacol.Exp.Ther. **305**(2): 410-416.
- Gary, K. A.; Sollars, P. J.; Lexow, N. et al. (1996): "Thyrotropin-releasing hormone phase shifts circadian rhythms in hamsters", Neuroreport **7**(10): 1631-1634.
- Glickstein, M. (1992): "The cerebellum and motor learning", Curr.Opin.Neurobiol. **2**(6): 802-806.
- Glue, P.; Bailey, J.; Wilson, S. et al. (1992): "Thyrotropin-releasing hormone selectively reverses lorazepam-induced sedation but not slowing of saccadic eye movements", Life Sci. **50**(6): L25-L30.
- Grant, G.; Vale, W. und Guillemin, R. (1973): "Characteristics of the pituitary binding sites for thyrotropin releasing factor", Endocrinology **92**(6): 1629-1633.
- Greer, J. J.; al-Zubaidy, Z. und Carter, J. E. (1996): "Thyrotropin-releasing hormone stimulates perinatal rat respiration in vitro", Am.J.Physiol **271**(5 Pt 2): R1160-R1164.
- Griffiths, E. C. (1985): "Thyrotrophin releasing hormone: endocrine and central effects", Psychoneuroendocrinology **10**(3): 225-235.
- Harris, A. R.; Christianson, D.; Smith, M. S. et al. (1978): "The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat", J.Clin.Invest **61**(2): 441-448.
- Harris, G. W. (1948): "Neural Control of the pituitary gland", Physiol Rev **28**: 139.
- Hashimoto, T.; Wada, T.; Fukuda, N. et al. (1993): "Effect of thyrotropin-releasing hormone on pentobarbitone-induced sleep in rats: continuous treatment with a sustained release injectable formulation", J.Pharm.Pharmacol. **45**(2): 94-97.
- Hedner, J.; Hedner, T.; Jonason, J. et al. (1981): "Central respiratory stimulant effect by thyrotropin in releasing hormone in the rat", Neurosci.Lett. **25**(3): 317-320.
- Helke, C. J.; Sayson, S. C.; Keeler, J. R. et al. (1986): "Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons project from the ventral medulla to the intermediolateral cell column: partial coexistence with serotonin", Brain Res. **381**(1): 1-7.
- Hennet, T.; Hagen, F. K.; Tabak, L. A. et al. (1995): "T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination", Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **92**(26): 12070-12074.
- Hersh, L. B. und McKelvy, J. F. (1979): "Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in bovine brain", Brain Res. **168**(3): 553-564.
- Heuer, H.; Ehrchen, J.; Bauer, K. et al. (1998): "Region-specific expression of thyrotrophin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland", Eur.J.Neurosci. **10**(4): 1465-1478.
- Heuer, H.; Schafer, M. K.; O'Donnell, D. et al. (2000): "Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats", J.Comp Neurol. **428**(2): 319-336.
- Hinkle, P. M.; Pekary, A. E.; Senanayaki, S. et al. (2002): "Role of TRH receptors as possible mediators of analeptic actions of TRH-like peptides", Brain Res. **935**(1-2): 59-64.
- Hokfelt, T.; Fuxe, K.; Johansson, O. et al. (1975): "Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed with immunohistochemistry", Eur.J.Pharmacol. **34**(2): 389-392.
- Hori, T.; Shibata, M.; Kiyohara, T. et al. (1988): "Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to locally applied capsaicin", Neuropharmacology **27**(2): 135-142.
- Horita, A. (1998): "An update on the CNS actions of TRH and its analogs", Life Sci. **62**(17-18): 1443-1448.
- Horita, A.; Carino, M. A. und Lai, H. (1986): "Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone", Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. **26**: 311-332.
- Horsthemke, B.; Leblanc, P.; Kordon, C. et al. (1984): "Subcellular distribution of particle-bound neutral peptidases capable of hydrolyzing gonadoliberin, thyroliberin, enkephalin and substance P", Eur.J.Biochem. **139**(2): 315-320.
- Hsieh, K. P. und Martin, T. F. (1992): "Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11", Mol.Endocrinol. **6**(10): 1673-1681.

- Hu, L. und Lawson, D. (1994): "Distribution of lactotroph subpopulations in different regions of the rat pituitary", Life Sci. **55**(20): 1553-1559.
- Hultborn, H. und Kiehn, O. (1992): "Neuromodulation of vertebrate motor neuron membrane properties", Curr.Opin.Neurobiol. **2**(6): 770-775.
- Itadani, H.; Nakamura, T.; Itoh, J. et al. (1998): "Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors", Biochem.Biophys.Res.Commun. **250**(1): 68-71.
- Itoh, Y.; Ogasawara, T.; Mushiroy, T. et al. (1994): "Effect of NS-3, a thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo acetylcholine release in rat brain: regional differences and its sites of action", J.Pharmacol.Exp.Ther. **271**(2): 884-890.
- Jackson, I. M. (1982): "Thyrotropin-releasing hormone", N.Engl.J.Med. **306**(3): 145-155.
- Jacobs, L. S.; Snyder, P. J.; Wilber, J. F. et al. (1971): "Increased serum prolactin after administration of synthetic thyrotropin releasing hormone (TRH) in man", J.Clin.Endocrinol.Metab **33**(6): 996-998.
- Jarrard, L. E. (1995): "What does the hippocampus really do?", Behav.Brain Res. **71**(1-2): 1-10.
- Johnson, R. L. und Tabin, C. J. (1997): "Molecular models for vertebrate limb development", Cell **90**(6): 979-990.
- Johnson, W. A.; Nathanson, N. M. und Horita, A. (1989): "Receptor binding and characterization of TRH receptors", Ann.N.Y.Acad.Sci. **553**: 137-146.
- Kalivas, P. W.; Simasko, S. M. und Horita, A. (1981): "Effect of septohippocampal lesions on thyrotropin-releasing hormone antagonism of pentobarbital narcosis", Brain Res. **222**(2): 253-265.
- Kardon, F. C.; Winokur, A. und Utiger, R. D. (1977): "Thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rat spinal cord", Brain Res. **122**(3): 578-581.
- Kasparov, S. A. und Chizh, B. A. (1992): "The NMDA-receptor antagonist dizocilpine (MK-801) suppresses the memory facilitatory action of thyrotropin-releasing hormone", Neuropeptides **23**(2): 87-92.
- Kelly, J. A. (1995): "Thyrotropin-releasing hormone: basis and potential for its therapeutic use", Essays Biochem. **30**: 133-149.
- Kelly, J. A.; Scalabrino, G. A.; Slator, G. R. et al. (2005): "Structure-activity studies with high affinity inhibitors of pyroglutamyl-peptidase II", Biochem.J.
- Kim, U. J.; Birren, B. W.; Slepak, T. et al. (1996): "Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library", Genomics **34**(2): 213-218.
- Kohrle, J. (1999): "Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family", Mol.Cell Endocrinol. **151**(1-2): 103-119.
- Koivusalo, F. und Leppaluoto, J. (1979): "Brain TRF immunoreactivity during various physiological and stress conditions in the rat", Neuroendocrinology **29**(4): 231-236.
- Konaka, S.; Yamada, M.; Satoh, T. et al. (1997): "Expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor mRNA in somatotrophs in the rat anterior pituitary", Endocrinology **138**(2): 827-830.
- Koskinen, L. O. (1989): "Effects of TRH on blood flow and the microcirculation", Ann.N.Y.Acad.Sci. **553**: 353-369.
- Krulich, L.; Giachetti, A.; Marchlewska-Koj, A. et al. (1977): "On the role of the central noradrenergic and dopaminergic systems in the regulation of TSH secretion in the rat", Endocrinology **100**(2): 496-505.
- Kubek, M. J.; Low, W. C.; Sattin, A. et al. (1989): "Role of TRH in seizure modulation", Ann.N.Y.Acad.Sci. **553**: 286-303.
- Kubek, M. J.; Rea, M. A.; Hodes, Z. I. et al. (1983): "Quantitation and characterization of thyrotropin-releasing hormone in vagal nuclei and other regions of the medulla oblongata of the rat", J.Neurochem. **40**(5): 1307-1313.
- LaHann, T. R. und Horita, A. (1982): "Thyrotropin releasing hormone: centrally mediated effects on gastrointestinal motor activity", J.Pharmacol.Exp.Ther. **222**(1): 66-70.
- Lamberton, P.; Wu, P. und Jackson, I. M. (1985): "Thyrotropin-releasing hormone release from rat pancreas is stimulated by serotonin but inhibited by carbachol", Endocrinology **117**(5): 1834-1838.
- Le, Mouellic H.; Lallemand, Y. und Brulet, P. (1990): "Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos", Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **87**(12): 4712-4716.
- Lechan, R. M. und Fekete, C. (2004): "Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome", J.Endocrinol.Invest **27**(6 Suppl): 105-119.
- Lechan, R. M. und Kakucska, I. (1992): "Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus", Ciba Found.Symp. **168**: 144-158.
- Lechan, R. M.; Qi, Y.; Berrodin, T. J. et al. (1993): "Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor beta 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system", Endocrinology **132**(6): 2461-2469.
- Ledduque, P.; Bulant, M.; Dubois, P. M. et al. (1989): "Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) in the adult rat pancreas: identification and localization of pro-TRH-related peptides in beta-cells of pancreatic islets", Endocrinology **125**(3): 1492-1497.
- Leighton, P. A.; Mitchell, K. J.; Goodrich, L. V. et al. (2001): "Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice", Nature **410**(6825): 174-179.

- Lexow, N. (1996): "Localization and Expression of Thyrotropin Releasing Hormone in Rat and Cat Retina", Dissertation University of Pennsylvania.
- Lythgoe, J. N. (1984): "Visual pigments and environmental light", Vision Res. **24**(11): 1539-1550.
- Manaker, S.; Shulman, L. H.; Winokur, A. et al. (1985): "Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord", Neurology **35**(11): 1650-1653.
- Mano, Y.; Matsui, K.; Toyoshima, E. et al. (1986): "The pharmacological effect of thyrotropin-releasing hormone on ataxic mutant mice", Acta Neurol.Scand. **73**(4): 352-358.
- Martino, E.; Nardi, M.; Vaudagna, G. et al. (1980): "Thyrotropin-releasing hormone-like material in human retina", J.Endocrinol.Invest **3**(3): 267-271.
- Matre, V.; Karlsen, H. E.; Wright, M. S. et al. (1993): "Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor", Biochem.Biophys.Res.Comm. **195**(1): 179-185.
- Matsui, K.; Wada, K. und Kwak, S. (1994): "Ataxia-ameliorating effects of YM-14673, a potent analog of thyrotropin releasing hormone, in ataxic mutant mice", Eur.J.Pharmacol. **254**(3): 295-297.
- Mattila, J. und Bunag, R. D. (1990): "Pressor and sympathetic responses to dorsal raphe nucleus infusions of TRH in rats", Am.J.Physiol **258**(6 Pt 2): R1464-R1471.
- McCann, M. J.; Hermann, G. E. und Rogers, R. C. (1989): "Thyrotropin-releasing hormone: effects on identified neurons of the dorsal vagal complex", J.Auton.Nerv.Syst. **26**(2): 107-112.
- McCown, T. J. und Breese, G. R. (1989): "Mechanistic and functional divergence between thyrotropin-releasing hormone and RO 15-4513 interactions with ethanol", Alcohol Clin.Exp.Res. **13**(5): 660-663.
- Merenthaler, I.; Csernus, V.; Csontos, C. et al. (1988): "New data on the immunocytochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system", Am.J.Anat. **181**(4): 359-376.
- Messmer, B.; Zimmerman, F. G. und Lenz, H. J. (1993): "Regulation of exocrine pancreatic secretion by cerebral TRH and CGRP: role of VIP, muscarinic, and adrenergic pathways", Am.J.Physiol **264**(2 Pt 1): G237-G242.
- Metcalf, G. (1974): "TRH: a possible mediator of thermoregulation", Nature **252**(5481): 310-311.
- Metcalf, G. und Dettmar, P. W. (1981): "Is thyrotropin releasing hormone an endogenous ergotropic substance in the brain?", Lancet **1**(8220 Pt 1): 586-589.
- Mikkelsen, J. D. (1994): "Analysis of the efferent projections of the lateral geniculate nucleus with special reference to the innervation of the subcommissural organ and related areas", Cell Tissue Res. **277**(3): 437-445.
- Montagne, J. J.; Ladram, A.; Grouselle, D. et al. (1996): "Identification and cellular localization of thyrotropin-releasing hormone-related peptides in rat testis", Endocrinology **137**(1): 185-191.
- Morley, J. E. (1981): "Neuroendocrine control of thyrotropin secretion", Endocr.Rev. **2**(4): 396-436.
- Morley, J. E. (1979): "Extrahypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) -- its distribution and its functions", Life Sci. **25**(18): 1539-1550.
- Morzorati, S. und Kubek, M. J. (1993): "The effect of TRH on ethanol-induced sedation in alcohol-preferring and -nonpreferring rats", Neuropeptides **25**(5): 283-287.
- Narayanan, C. S.; Fujimoto, J.; Geras-Raaka, E. et al. (1992): "Regulation by thyrotropin-releasing hormone (TRH) of TRH receptor mRNA degradation in rat pituitary GH3 cells", J.Biol.Chem. **267**(24): 17296-17303.
- Nelson, E. J. und Hinkle, P. M. (1994): "Characteristics of the Ca<sup>2+</sup> spike and oscillations induced by different doses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in individual pituitary cells and nonexcitable cells transfected with TRH receptor complementary deoxyribonucleic acid", Endocrinology **135**(3): 1084-1092.
- Nemeroff, C. B.; Kalivas, P. W.; Golden, R. N. et al. (1984): "Behavioral effects of hypothalamic hypophysiotropic hormones, neurotensin, substance P and other neuropeptides", Pharmacol.Ther. **24**(1): 1-56.
- Nillni, E. A.; Luo, L. G.; Jackson, I. M. et al. (1996): "Identification of the thyrotropin-releasing hormone precursor, its processing products, and its coexpression with convertase 1 in primary cultures of hypothalamic neurons: anatomic distribution of PC1 and PC2", Endocrinology **137**(12): 5651-5661.
- Nishino, S.; Arrigoni, J.; Shelton, J. et al. (1997): "Effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogs on daytime sleepiness and cataplexy in canine narcolepsy", J.Neurosci. **17**(16): 6401-6408.
- O'Connor, B. und O'Cuinn, G. (1984): "Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain", Eur.J.Biochem. **144**(2): 271-278.
- O'Dowd, B. F.; Lee, D. K.; Huang, W. et al. (2000): "TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1", Mol.Endocrinol. **14**(1): 183-193.
- Ogasawara, T.; Itoh, Y.; Tamura, M. et al. (1996): "NS-3, a TRH-analog, reverses memory disruption by stimulating cholinergic and noradrenergic systems", Pharmacol.Biochem.Behav. **53**(2): 391-399.
- Okuda, C.; Mizobe, T. und Miyazaki, M. (1987): "The involvement of central cholinergic mechanisms in cardiovascular responses to intracerebroventricular and intravenous administration of thyrotropin-releasing hormone", Life Sci. **40**(13): 1293-1299.
- Okumura, T.; Taylor, I. L. und Pappas, T. N. (1995): "Microinjection of TRH analogue into the dorsal vagal complex stimulates pancreatic secretion in rats", Am.J.Physiol **269**(3 Pt 1): G328-G334.
- Oster, H.; Maronde, E. und Albrecht, U. (2002): "The circadian clock as a molecular calendar", Chronobiol.Int. **19**(3): 507-516.



- Pazos, A.; Cortes, R. und Palacios, J. M. (1985): "Thyrotropin-releasing hormone receptor binding sites: autoradiographic distribution in the rat and guinea pig brain", *J.Neurochem.* **45**(5): 1448-1463.
- Pekary, A. E.; Bhasin, S.; Smith, V. et al. (1987): "Thyroid hormone modulation of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and TRH-Gly levels in the male rat reproductive system", *J.Endocrinol.* **114**(2): 271-277.
- Prasad, C. und Edwards, R. M. (1984): "Thyrotropin-releasing hormone (TRH): apparent receptor binding in rat spinal cord", *Brain Res.* **311**(1): 1-6.
- Rabeler, R. (2001): "Herstellung und Analyse einer Maus mit einer gezielten Inaktivierung des TRH-Rezeptor-1-Gens", *Dissertation* Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie.
- Rabeler, R.; Mittag, J.; Geffers, L. et al. (2004): "Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism", *Mol.Endocrinol.* **18**(6): 1450-1460.
- Reichlin, S. (1986): "Neural functions of TRH", *Acta Endocrinol.Suppl (Copenh)* **276**: 21-33.
- Reny-Palasse, V.; Monier, C. und Rips, R. (1989): "Opioid involvement in TRH-induced antinociception in the rat following intracerebral administration", *Pain* **38**(2): 193-201.
- Roshon, M.; DeGregori, J. V. und Ruley, H. E. (2003): "Gene trap mutagenesis of hnRNP A2/B1: a cryptic 3' splice site in the neomycin resistance gene allows continued expression of the disrupted cellular gene", *BMC.Genomics* **4**(1): 2.
- Roths, J. B.; Foxworth, W. B.; McArthur, M. J. et al. (1999): "Spontaneous and engineered mutant mice as models for experimental and comparative pathology: history, comparison, and developmental technology", *Lab Anim Sci.* **49**(1): 12-34.
- Santori, E. M.; Schmidt, D. E.; Kalivas, P. W. et al. (1981): "Failure of muscarinic blockade to antagonize analepsis induced by thyrotropin-releasing hormone and MK-771 in the rat", *Psychopharmacology (Berl)* **74**(1): 13-16.
- Satoh, T.; Feng, P. und Wilber, J. F. (1993): "A truncated isoform of the thyrotropin-releasing hormone receptor is expressed in the rat central nervous system as well as in the pituitary gland", *Brain Res.Mol.Brain Res.* **20**(4): 353-356.
- Sattin, A. (1998): "A heuristic model of mental depression derived from basic and applied research on thyrotropin-releasing hormone", *Thyroid* **8**(10): 957-962.
- Scanlon, M. F.; Issa, B. G. und Dieguez, C. (1996): "Regulation of growth hormone secretion", *Horm.Res.* **46**(4-5): 149-154.
- Schaeffer, J. M.; Brownstein, M. J. und Axelrod, J. (1977): "Thyrotropin-releasing hormone-like material in the rat retina: changes due to environmental lighting", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**(8): 3579-3581.
- Schafer, M. K. und Day, R. (1995): "In situ hybridization techniques to study processing enzyme expression at the cellular level", *Methods Neurosci.* **23**: 16-44.
- Scharrer, E. und Scharrer, B. (1940): "Secretory cells within the hypothalamus", In: *The Hypothalamus.Association for Research in Nervous and Mental Disease.Hafner Publishing, New York*: 170-194.
- Schmitmeier, S.; Thole, H.; Bader, A. et al. (2002): "Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin", *Eur.J.Biochem.* **269**(4): 1278-1286.
- Schomburg, L. und Bauer, K. (1995): "Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme", *Endocrinology* **136**(8): 3480-3485.
- Schomburg, L. und Bauer, K. (1997): "Regulation of the adenohipophyseal thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by estradiol", *Endocrinology* **138**(9): 3587-3593.
- Schwenk, F.; Baron, U. und Rajewsky, K. (1995): "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells", *Nucleic Acids Res.* **23**(24): 5080-5081.
- Segerson, T. P.; Hoefler, H.; Childers, H. et al. (1987a): "Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization", *Endocrinology* **121**(1): 98-107.
- Segerson, T. P.; Kauer, J.; Wolfe, H. C. et al. (1987b): "Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus", *Science* **238**(4823): 78-80.
- Shambaugh, G., III; Kubek, M. und Wilber, J. F. (1979): "Thyrotropin-releasing hormone activity in the human placenta", *J.Clin.Endocrinol.Metab* **48**(3): 483-486.
- Sharp, T.; Tulloch, I. F.; Bennett, G. W. et al. (1984): "Analeptic effects of centrally injected TRH and analogues of TRH in the pentobarbitone-anaesthetized rat", *Neuropharmacology* **23**(3): 339-348.
- Shinozuka, K.; Shimoura, K. und Hattori, K. (1997): "Effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogue, NS-3, on blood pressure, heart rate, and serum catecholamine levels in rats", *Gen.Pharmacol.* **28**(2): 209-214.
- Sigmund, C. D. (2000): "Viewpoint: are studies in genetically altered mice out of control?", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **20**(6): 1425-1429.
- Smith, J. R.; La Hann, T. R.; Chesnut, R. M. et al. (1977): "Thyrotropin-releasing hormone: stimulation of colonic activity following intracerebroventricular administration", *Science* **196**(4290): 660-662.
- Soriano, P. (1997): "The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites", *Development* **124**(14): 2691-2700.

- Sprick, U. (1995): "Functional aspects of the involvement of the hippocampus in behavior and memory functions", Behav. Brain Res. **66**(1-2): 61-64.
- Stephens, R. L.; Ishikawa, T.; Weiner, H. et al. (1988): "TRH analogue, RX 77368, injected into dorsal vagal complex stimulates gastric secretion in rats", Am. J. Physiol. **254**(5 Pt 1): G639-G643.
- Straub, R. E.; Frech, G. C.; Joho, R. H. et al. (1990): "Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**(24): 9514-9518.
- Sun, Q. J.; Llewellyn-Smith, I.; Minson, J. et al. (1996): "Thyrotropin-releasing hormone immunoreactive boutons form close appositions with medullary expiratory neurons in the rat", Brain Res. **715**(1-2): 136-144.
- Sun, Q. J.; Pilowsky, P. und Llewellyn-Smith, I. J. (1995): "Thyrotropin-releasing hormone inputs are preferentially directed towards respiratory motoneurons in rat nucleus ambiguus", J. Comp. Neurol. **362**(3): 320-330.
- Sun, Y. und Gershengorn, M. C. (2002): "Correlation between basal signaling and internalization of thyrotropin-releasing hormone receptors: evidence for involvement of similar receptor conformations", Endocrinology **143**(8): 2886-2892.
- Sun, Y.; Lu, X. und Gershengorn, M. C. (2003): "Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences", J. Mol. Endocrinol. **30**(2): 87-97.
- Szirtes, T.; Kisfaludy, L.; Palosi, E. et al. (1984): "Synthesis of thyrotropin-releasing hormone analogues. 1. Complete dissociation of central nervous system effects from thyrotropin-releasing activity", J. Med. Chem. **27**(6): 741-745.
- Tache, Y.; Lesiege, D.; Vale, W. et al. (1985): "Gastric hypersecretion by intracisternal TRH: dissociation from hypophysiotropic activity and role of central catecholamine", Eur. J. Pharmacol. **107**(2): 149-155.
- Tache, Y.; Lis, M. und Collu, R. (1977): "Effects of thyrotropin-releasing hormone on behavioral and hormonal changes induced by beta-endorphin", Life Sci. **21**(6): 841-846.
- Vaughan, M. K.; Nordio, M.; Chenoweth, P. J. et al. (1988): "Underfeeding and exposure to short photoperiod alters rat pineal and Harderian gland lysosomal enzyme activities", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **189**(2): 211-216.
- Visser, T. J.; Klootwijk, W.; Docter, R. et al. (1977): "A new radioimmunoassay of thyrotropin-releasing hormone", FEBS Lett. **83**(1): 37-40.
- Walter, R. (1976): "Partial purification and characterization of post-proline cleaving enzyme: enzymatic inactivation of neurohypophyseal hormones by kidney preparations of various species", Biochim. Biophys. Acta **422**(1): 138-158.
- White, S. R. (1985): "A comparison of the effects of serotonin, substance P and thyrotropin-releasing hormone on excitability of rat spinal motoneurons in vivo", Brain Res. **335**(1): 63-70.
- White, S. R.; Crane, G. K. und Jackson, D. A. (1989): "Thyrotropin-releasing hormone (TRH) effects on spinal cord neuronal excitability", Ann. N.Y. Acad. Sci. **553**: 337-350.
- Wilk, S.; Suen, C. S. und Wilk, E. K. (1988): "Occurrence of pyroglutamyl peptidase II, a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells", Neuropeptides **12**(1): 43-47.
- Winkler, G.; Gero, L.; Halmos, T. et al. (1987): "Arginine induced growth hormone (hGH) response and paradoxical hGH secretion stimulated by TRH in diabetes mellitus", Acta Diabetol. Lat. **24**(2): 109-117.
- Winokur, A. und Utiger, R. D. (1974): "Thyrotropin-releasing hormone: regional distribution in rat brain", Science **185**(147): 265-267.
- Yamada, M.; Monden, T.; Konaka, S. et al. (1993): "Assignment of human thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor gene to chromosome 8", Somat. Cell Mol. Genet. **19**(6): 577-580.
- Yamada, M.; Saga, Y.; Shibusawa, N. et al. (1997): "Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**(20): 10862-10867.
- Yanagisawa, T.; Prasad, C. und Peterkofsky, A. (1980): "The subcellular and organ distribution and natural form of histidyl-proline diketopiperazine in rat brain determined by a specific radioimmunoassay", J. Biol. Chem. **255**(21): 10290-10294.
- Zhao, D.; Yang, J.; Jones, K. E. et al. (1992): "Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells", Endocrinology **130**(6): 3529-3536.

## 7. ABKÜRZUNGEN

5-HT	Serotonin	NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
ACh	Acetylcholin	NTS	<i>Ncl. tractus solitarius</i>
ACTH	adrenocorticotropes Hormon	PAG	periaquäduktales Grau des Mittelhirns
ampR	Ampicillin Resistenz ( $\beta$ -Laktamase)	PAP	Pyroglutamyl-Amino-peptidase
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	PC	Prohormon-Konvertase
CA	<i>Cornu ammonis</i>	PGK	Phosphoglyceratkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	PLAP	humane plazentare alkalische Phosphatas
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>	PMSG	<i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropin</i>
cRNA	<i>copy ribonucleic acid</i>	PPCE	postprolyl-spaltendes Enzym
DIG	Digoxigenin	PVN	paraventrikulärer Nukleus
DMN	dorsaler Motornukleus des Vagus	RFLP	Restriktions-Fragmentlängen Polymorph.
dpc	<i>dies post coitum</i>	RIA	<i>radio immuno assay</i>
dta	Diphtheria Toxin A	RT	Raumtemperatur
DVC	dorsaler Vagus-Komplexes	RT-PCR	<i>Real-time PCR</i>
ES-Zelle	embryonale Stammzelle	SCN	suprachiasmatischer Nukleus
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i>	SCO	Subcommissuralorgan
GH	<i>growth hormone</i>	SV40	Semian Virus 40
GPCR	GTP-Bindungsprotein gekoppelter Rez.	T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>	T <sub>4</sub>	Tetraiodthyronin /Thyroxin
hom	homologe chromosomale Sequenz	TRH	Thyrotropin-releasing hormone
HPT	<i>hypothalamic-pituitary-thyroid</i>	TRH-DE	<i>TRH degrading ectoenzyme</i>
icv	intracerebroventrikulär	TRH-R1	TRH-Rezeptor1
IHC	Immunohistochemie	TRH-R2	TRH-Rezeptor2
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle	TSH	<i>thyroid stimulating hormone</i>
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung	UTR	<i>untranslated region</i>
ko	<i>Knock out</i>	wt	wildtyp
lacZ	$\beta$ -Galaktosidase	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid
LH	Lutenisierendes Hormon	ZNS	Zentrales Nervensystem
LHRH	<i>lutening hormone releasing hormone</i>		
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>		
loxP	<i>locus of crossingover of P1 phage</i>		
mRNA	<i>messenger-RNA</i>		
Ncl.	Nucleus		
NE	Noradrenalin		
neo	Neomycin Phosphotransferase		
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat		

## ***Persönliche Angaben***

---

Name: Geffers  
Vorname: Lars  
Geburtstag: 11.06.1975  
Geburtsort: Peine  
Familienstand: verheiratet seit dem 13.09.2003  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Mutter: Bärbel Geffers (geb. Burgholte), geboren am 02.01.1943  
Vater: Robert Geffers, geboren am 25.10.1939

## ***Studium und Promotion***

---

*Seit Aug. 2001*

### **Promotion**

Arbeitsgruppe Prof. Bauer, Neuroendokrinologie, Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover, Niedersachsen

*Jun. 2001*

### **Hauptdiplom Biologie**

*Mai 2000 bis Mai 2001*

### **Diplomarbeit**

Arbeitsgruppe Prof. Dr. J.E.G. McCarthy, Transcriptional Control Group, UMIST, Manchester, Vereinigtes Königreich  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. N. Käufer, Molekulare Genetik, TU Braunschweig, Braunschweig, Niedersachsen

*WS 1995/96 bis SS 2001*

### **Studium der Biologie (Diplom)**

Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Niedersachsen

## ***Wehrdienst***

---

*Jul. 1994 bis Jun. 1995*

### **Sanitätsgefreiter**

2. Sanitätsbataillon, Hildesheim, Niedersachsen

## ***Schulische Ausbildung***

---

*Jun. 1994*

### **Abitur**

*1985 bis 1994*

Gymnasium Andreanum, Hildesheim, Niedersachsen

*1981 bis 1985*

Grundschule Hohenhameln, Hohenhameln, Niedersachsen

## **Veröffentlichungen**

---

Rabeler R, Mittag J, Geffers L, Ruther U, Leitges M, Parlow AF, Visser TJ, Bauer K.  
**Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism.**

*Mol Endocrinol.* 2004 Jun;18(6):1450-60. Epub 2004 Feb 26.

Salehi Z, Geffers L, Vilela C, Birkenhager R, Ptushkina M, Berthelot K, Ferro M, Gaskell S, Hagan I, Stapley B, McCarthy JE.

**A nuclear protein in *Schizosaccharomyces pombe* with homology to the human tumour suppressor Fhit has decapping activity.**

*Mol Microbiol.* 2002 Oct;46(1):49-62.

Ptushkina M, Berthelot K, von der Haar T, Geffers L, Warwicker J, McCarthy JE.

**A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties.**

*Nucleic Acids Res.* 2001 Nov 15;29(22):4561-9.

## **Tagungsbeiträge**

---

Geffers L, Bauer K.

**Generation of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme (TRH-DE) deficient mice by targeted recombination.**

49<sup>th</sup> Annual DGE Meeting 2005. Münster, Deutschland.

Geffers L, Bauer K.

**Generation of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme (TRH-DE) deficient mice by targeted recombination.**

4<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience 2004. Lissabon, Portugal.

Ptushkina M, Geffers L, Birkenhager R, McCarthy JE.

**Novel partners in the eIF4F complex of *Schizosaccharomyces pombe*.**

Translation UK 2000. Cambridge, Vereinigtes Königreich