

**Untersuchungen zur Rolle von neuropoietischen Zytokinen bei  
der Differenzierung cholinergischer sympathischer Nervenzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Dipl. Biol. Chi Vinh Duong  
aus Nghia Binh (Vietnam)

Frankfurt am Main, 04/2003

(DF 1)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. H. Rohrer durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan:  
Gutachter:

Prof. Dr. Streit  
Prof. Dr. Volknandt  
Prof. Dr. Rohrer

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Duong, C. V.; Geissen, M.; Rohrer, H. (2002). The developmental expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) in cholinergic sympathetic neurons depends on cytokines signaling through LIFR $\beta$ -containing receptors. *Development* **129**, 1387-1396.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei Prof. Dr. H. Rohrer und Dr. M. Geissen für ihre Unterstützung in den vergangenen Jahren zu bedanken. Ohne ihre Hilfe und den Beistand einiger „Seelentröster“ wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt auch natürlich der Rohrer-Arbeitsgruppe, insbesondere den ehemaligen Teammitgliedern.

## Abkürzungen

AMG	Konditioniertes Medium von kultivierten Müllergliazellen
AS	Aminosäure
AP	Alkalische Phosphatase
ARTN	Artemin
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
c	Huhn (chicken)
CDF	LIF
cDNA	komplementäre DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
CLC	Cardiotrophin-like cytokine
CLF-1	Cytokine-like factor-1
CMV	Cytomegalie Virus
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CNTR $\alpha$	CNTF Rezeptor alpha
CHS	Chicken serum
CT-1	Cardiotrophin 1
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CyRE	Cytokine response element
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DBH	Dopaminbetahydroxylase
DRG	Hinterwurzelganglion
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
gp130	Glykoprotein 130
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GPA	Growth promoting activity
HCM	konditioniertes Medium von kultivierten Herzzellen

HRP	Horserraddish peroxidase
HS	Pferdeserum
IL	Interleukin
IPTG	Isoprenyl- $\beta$ -Thiogalactosid
JAK	Janus-Kinase
kD	Kilo-Dalton
LIF	Leukemia inhibitory factor
LIFR $\beta$	LIF Rezeptor beta
NGF	Nerve growth factor
NT-3	Neurotrophin-3
OSM	Oncostatin M
OSMR $\beta$	OSM Rezeptor beta
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
rpm	Umdrehungen pro Minute
RCM	Konditioniertes Medium von kultivierten Retinazellen
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkriptase
RM	Rückenmark
RNA	Ribonukleinsäure
SCG10	Superior cervical ganglion clone 10
SG	Sympathisches Ganglion
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TH	Tyrosinhydroxylase
üN	über Nacht
VACht	vesikulärer Acetylcholin-Transporter
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1. EINLEITUNG</u></b> .....	<b>11</b>
<b><u>1.1 Vorwort</u></b> .....	<b>11</b>
<b><u>1.2 Die Entwicklung des peripheren Nervensystems</u></b> .....	<b>11</b>
<b><u>1.3 Die sympathoadrenerge Zelllinie</u></b> .....	<b>12</b>
<b><u>1.4 Zielgebiete cholinergischer sympathischer Nervenzellen</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>1.5 Bedeutung des Zielgewebes für die cholinerge Differenzierung</u></b> .....	<b>16</b>
<b><u>1.6 Identität des in vivo relevanten cholinergen Differenzierungsfaktors</u></b> .....	<b>18</b>
<b><u>1.7 Signaltransduktionsweg neuropoietischer Zytokine</u></b> .....	<b>20</b>
<b><u>1.8 Die Bedeutung bisher bekannter neuropoietischer Zytokine für die cholinerge Differenzierung sympathischer Neuronen</u></b> .....	<b>22</b>
<b><u>1.9 Zielsetzung</u></b> .....	<b>25</b>
<b><u>2. MATERIAL</u></b> .....	<b>26</b>
<b><u>2.1 Bakterienstämme</u></b> .....	<b>26</b>
<b><u>2.2 Enzyme/Marker</u></b> .....	<b>26</b>
<u>2.2.1 Enzyme</u> .....	26
<u>2.2.2 Molekulargewichtsmarker</u> .....	27
<b><u>2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial</u></b> .....	<b>27</b>
<u>2.3.1 Bezugsquellen von Chemikalien und Verbrauchsmaterial</u> .....	27
<u>2.3.2 Spezielles Verbrauchsmaterial und Kits</u> .....	27
<b><u>2.4 Plasmide</u></b> .....	<b>28</b>
<u>2.4.1 Plasmid-Konstrukte</u> .....	28
<u>2.4.2 HCM-Expressionsbank</u> .....	29
<b><u>2.5 Oligonukleotidprimer</u></b> .....	<b>29</b>
<b><u>2.6 Puffer und Lösungen</u></b> .....	<b>30</b>
<u>2.6.1 Allgemeine Puffer</u> .....	30
<u>2.6.2 In situ-Hybridisierung</u> .....	30
<u>2.6.3 Immunfärbungen-/ DAB-Färbung</u> .....	31
<u>2.6.4 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese</u> .....	31
<u>2.6.5 Coomassie blue-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen</u> .....	31
<u>2.6.6 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen</u> .....	32
<u>2.6.7 Transfer von Proteinen auf Membranen</u> .....	32
<u>2.6.8 Immundetektion von Proteinen auf Membranen</u> .....	32
<b><u>2.7 Bakterienkulturen</u></b> .....	<b>32</b>
<u>2.7.1 Medien und Substrate</u> .....	32
<u>2.7.2 Zusätze für Bakterienkultur</u> .....	33
<b><u>2.8 Zellkultur</u></b> .....	<b>33</b>
<u>2.8.1 Zelllinien</u> .....	33

2.8.2 Medien für die Zellkultur.....	33
2.8.3 Zusätze für die Zellkultur.....	33
2.8.4 Antikörper.....	34
<b>2.9 Bruteier.....</b>	<b>34</b>
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Präparation von Plasmid-DNA.....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Klassische alkalische Lyse (Sambrook et al., 1989).....	35
3.1.2 Plasmid-DNA Isolierung mittels Ionenaustauschchromatographie.....	35
<b>3.2 Phenol/Chloroform-Extraktion (Brawermann et al., 1972).....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Fällung von Nucleinsäuren (Shapiro, 1981).....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5 Restriktionsverdau von Nucleinsäuren.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6 „Fill in“-Reaktion zur Herstellung glatter Enden.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Kinasieren von DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden.....</b>	<b>37</b>
<b>3.8 Entfernung der 5'-Phosphatgruppe von DNA-Fragmenten.....</b>	<b>37</b>
<b>3.9 Agarose-Gelelektrophorese.....</b>	<b>38</b>
<b>3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....</b>	<b>38</b>
3.10.1 Stickstoff-Methode.....	38
3.10.2 Geleluatation von DNA-Fragmenten nach Qiagen.....	39
<b>3.11 Ligation von DNA-Fragmenten.....</b>	<b>39</b>
<b>3.12 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen.....</b>	<b>39</b>
<b>3.13 Elektrottransformation (Fiedler und Wirth, 1988).....</b>	<b>39</b>
<b>3.14 Vermehrung und Lagerung von Bakterienstämmen.....</b>	<b>40</b>
<b>3.15 „Bakterien-Lifting“ und „Dot-Blot“.....</b>	<b>40</b>
3.15.1 Markierung von DNA-Sonden.....	40
3.15.2 Hybridisierung der Membranen.....	41
<b>3.16 Polymerase Kettenreaktion.....</b>	<b>41</b>
3.16.1 Standard PCR-Bedingungen.....	42
3.16.2 Direkte PCR auf Bakterien oder Zellen.....	42
3.16.3 Subklonierung von PCR-Fragmenten.....	42
<b>3.17 DNA-Sequenzanalyse.....</b>	<b>42</b>
<b>3.18 Bebrütung von befruchteten Hühnereier.....</b>	<b>43</b>
<b>3.19 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>43</b>
3.19.1 Vorbereitung der Kulturschalen für neuronale Primärkulturen.....	43
3.19.2 Präparation der sympathischen Ganglien.....	43
3.19.3 Inkulturnahme sympathischer Neuronen.....	43
3.19.4 Kulturbedingungen für verschiedene eukaryontische Zellen.....	44
3.19.5 Lagerung und Rekultivierung eukaryontischer Zellen.....	44
3.19.6 Passagieren von eukaryontischen Zellen.....	44

<a href="#"><u>3.19.7 Transfektion eukaryontischer Zellen</u></a> .....	45
<a href="#"><u>3.19.8 Herstellung klonaler und stabiler exprimierender HEK 293-Zelllinien zur Expression von Rezeptorfusionsproteinen</u></a> .....	45
<a href="#"><u>3.19.9 Herstellung von hängenden DF-1-Fibroblastenaggregaten</u></a> .....	46
<a href="#"><u>3.19.10 Implantationen von Zellaggregaten in Hühnerembryonen</u></a> .....	46
<b><a href="#"><u>3.20 Immunfärbungen</u></a></b> .....	<b>47</b>
<a href="#"><u>3.20.1 Immunfärbung kultivierter Zellen</u></a> .....	47
<a href="#"><u>3.20.2 Immunfärbung auf Kryoschnitten</u></a> .....	47
<b><a href="#"><u>3.21 In situ-Hybridisierung</u></a></b> .....	<b>47</b>
<a href="#"><u>3.21.1 Präparation und Fixierung von Embryonen</u></a> .....	47
<a href="#"><u>3.21.2 Anfertigen von Gefrierschnitten</u></a> .....	48
<a href="#"><u>3.21.3 Sondensynthese für die In situ-Hybridisierung</u></a> .....	48
<a href="#"><u>3.21.4 Kontrolle der markierten RNA-Proben über einen „Spot-Assay“</u></a> .....	48
<a href="#"><u>3.21.5 Durchführung der In situ-Hybridisierung</u></a> .....	48
<a href="#"><u>3.21.6 Doppel-In situ-Hybridisierung</u></a> .....	49
<a href="#"><u>3.21.7 Morphometrische Analyse</u></a> .....	49
<b><a href="#"><u>3.22 Biochemische Methoden</u></a></b> .....	<b>50</b>
<a href="#"><u>3.22.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Lowry 1951, Bradford, 1976)</u></a> .....	50
<a href="#"><u>3.22.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)</u></a> .....	50
<a href="#"><u>3.22.3 „Coomassie-Blue-Färbung“ von Proteinen in Polyacrylamidgelen</u></a> .....	50
<a href="#"><u>3.22.4 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Meril et al., 1981)</u></a> .....	51
<a href="#"><u>3.22.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Kyhse-Andersen, 1984)</u></a> .....	51
<a href="#"><u>3.22.6 „Ponceau S-Färbung“ (Harlow and Lane, 1988)</u></a> .....	51
<a href="#"><u>3.22.7 Immunodetektion von Proteinen auf Membranen</u></a> .....	51
<a href="#"><u>3.22.8 „Strippen von Western-Blot Membranen“</u></a> .....	52
<a href="#"><u>3.22.9 Aufreinigung von Rezeptorfusionsproteinen durch Affinitätschromatographie</u></a> .....	52
<a href="#"><u>3.22.10 Aufreinigung von HIS-Tag-markierten Rezeptorfusionsproteinen</u></a> .....	52
<a href="#"><u>3.22.11 DAB-Färbungen auf Kulturen mit Rezeptorfusionsproteinen</u></a> .....	53
<b><a href="#"><u>4. ERGEBNISSE</u></a></b> .....	<b>54</b>
<b><a href="#"><u>4.1 Vervollständigung der Huhn-LIFR<math>\beta</math> über 5'-RACE</u></a></b> .....	<b>54</b>
<b><a href="#"><u>4.2 LIFR<math>\beta</math>-mRNA-Expression im Huhn</u></a></b> .....	<b>56</b>
<b><a href="#"><u>4.3 Blockierung der CNTF-induzierten VIP-Expression mit antisense LIFR<math>\beta</math>-RNA</u></a></b> .....	<b>57</b>
<b><a href="#"><u>4.4 In vivo-Expression von LIFR<math>\beta</math>-antisense RNA</u></a></b> .....	<b>60</b>
<a href="#"><u>4.4.1 Effekt von LIFR<math>\beta</math>-antisense RNA auf noradrenerge, cholinerge und panneuronale Markergene</u></a> .....	60
<a href="#"><u>4.4.2 Quantifizierung des Effekts von antisense LIFR<math>\beta</math>-RNA auf die VIP-Expression</u></a> .....	63
<a href="#"><u>4.4.3 VIP- und ChAT-Expression in E13/14 und E18 Wildtyp Embryonen</u></a> .....	65
<a href="#"><u>4.4.4 Effekt von LIFR<math>\beta</math>-antisense RNA auf die endogene Proteinexpression</u></a> .....	66
<a href="#"><u>4.4.5 Zusammenfassung des 1. Teils</u></a> .....	67
<b><a href="#"><u>4.5 Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen</u></a></b> .....	<b>68</b>
<a href="#"><u>4.5.1 LIFR<math>\beta</math>/gp130-Rezeptorfusionsprotein</u></a> .....	68
<a href="#"><u>4.5.2 Klonierung und Produktion von Rezeptorfusionsproteinen in HEK 293 Zellen</u></a> .....	69
<a href="#"><u>4.5.3 Detektion, Isolierung und Aufreinigung von sekretierten Rezeptorfusionsproteinen aus den Zellüberständen</u></a> .....	70
<a href="#"><u>4.5.4 Funktionelle Analyse der synthetisierten Rezeptorfusionsproteine</u></a> .....	72
<a href="#"><u>4.5.5. Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen</u></a> .....	73
<a href="#"><u>4.5.5a. Vorarbeiten</u></a> .....	73
<a href="#"><u>4.5.5b. Screen</u></a> .....	77
<b><a href="#"><u>4.6 Suche nach weiteren Quellen für VIP-induzierende Aktivitäten</u></a></b> .....	<b>79</b>

<b><u>5. DISKUSSION</u></b> .....	<b>82</b>
<b><u>5.1 Die Rolle von neuropoietischen Zytokinen bei der VIP-Induktion in cholinergen sympathischen Neuronen</u></b> .....	<b>82</b>
<b><u>5.2 Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen</u></b> .....	<b>88</b>
<b><u>5.2 Schlußfolgerung</u></b> .....	<b>92</b>
<b><u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	<b>93</b>
<b><u>7. LITERATUR</u></b> .....	<b>94</b>

# 1. Einleitung

## *1.1 Vorwort*

Das Nervensystem der Vertebraten entwickelt sich aus dem Neuroektoderm, dem Neuralrohr und den ektodermalen Plakoden. Die Zellen innerhalb des Neuroektoderms, die neuroepithelialen Zellen, sind multipotente Stammzellen und können sich zu unterschiedlichen Zelltypen innerhalb des Nervensystems differenzieren. Eine wesentliche Fragestellung der Entwicklungsneurobiologie ist, wie und wann sich aus diesen multipotenten Zellen die unterschiedlichen Zelltypen des Nervensystems entwickeln und welche molekularen Mechanismen diese Prozesse steuern. Weitere unbeantwortete Fragen sind, wie sich entwickelnde Neuronen ihre Zellkontakte zu Nachbarzellen und zum Zielgebiet ausbilden und diese so festigen, daß ein funktionsfähiges Nervensystem entsteht.

Obwohl die neurobiologische Forschung der letzten Jahrzehnte bereits ein großes Spektrum von Wachstumsfaktoren aufdeckte, die an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sind, sind in vielen Fällen noch nicht alle Mitspieler gefunden, die in diese spezifischen Regel- und Steuerungsprozesse eingreifen.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Eingrenzung und Identifizierung von Faktoren, die an Differenzierungsprozessen sympathischer Neuronen beteiligt sind.

## *1.2 Die Entwicklung des peripheren Nervensystems*

Das gesamte Nervensystem der Vertebraten ist ektodermalen Ursprungs. Während der embryonalen Entwicklung wird im zunächst homogenen Ektoderm durch die Wirkung des mesodermalen Urdarmdaches die Neuralplatte induziert. Unabhängig davon werden die ektodermalen Plakoden im Ektoderm induziert (z.B. Ohr- und Riechplakode), auf deren Entwicklung aber nicht weiter eingegangen wird. Die Neuralplatte faltet sich anschließend ein und schließt sich zum Neuralrohr. Im Verlauf dieses als Neurulation bezeichneten Vorgangs wird die Neuralleiste mediodorsal zwischen Neuralrohr und der Epidermis abgeschnürt. Die totipotenten Zellen der Neuralleiste zeichnen sich durch eine hohe Migrationsfähigkeit aus und können sich zu unterschiedlichen Zelltypen entwickeln. Das Schicksal der

Neuralleistenzellen ist zum großen Teil abhängig vom Zielort der Wanderung, d. h. der Region, in der sie sich letztendlich ansiedeln (Übersicht in Gilbert, 2000).

Aus den cranialen Neuralleistenzellen entwickeln sich zum großen Teil die mesenchymalen Gewebe von Gesicht und Schädel, während die vagalen und sacralen Neuralleistenzellen sich zu den parasympathischen und enterischen Ganglien entwickeln. Neuralleistenzellen aus dem Rumpf bewegen sich entlang zweier Hauptwanderungswege. Diejenigen, die im Rumpfbereich den dorsolateral gelegenen Weg in das Ektoderm einschlagen, entwickeln sich zu Pigmentzellen (Melanozyten; Dorsky et al., 1998). Dagegen differenzieren sich die den ventrolateral Weg einschlagenden Neuralleistenzellen zu Hinterwurzelganglien (DRG), sympathischen Ganglien, Nebennierenmark und Schwanzzellen (Gilbert, 2000; Le Douarin und Kalcheim, 1999).

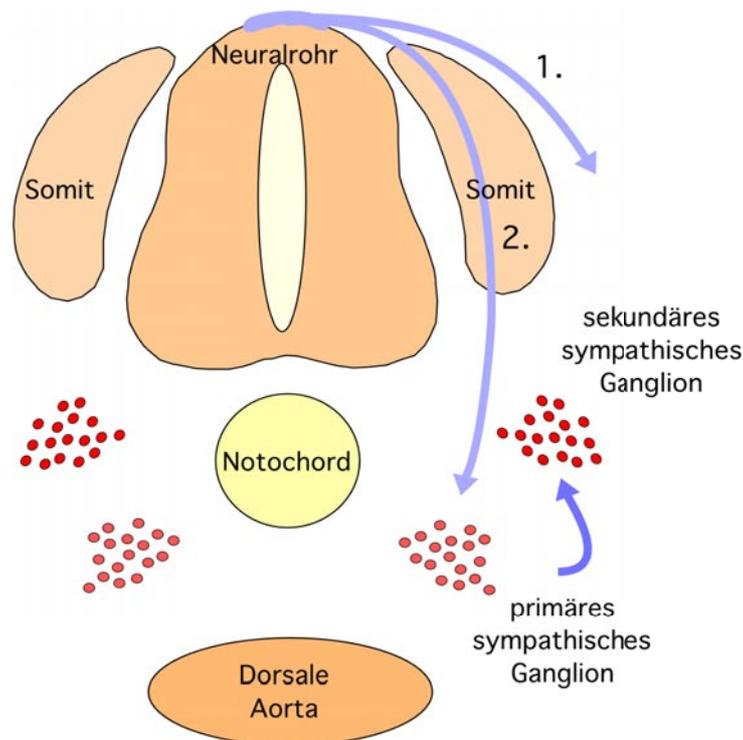
### ***1.3 Die sympathoadrenerge Zelllinie***

Neuralleistenzellen, die sich zu sympathoadrenergen Zellen entwickeln, also sympathische Neuronen und chromaffine Zellen des Nebennierenmarks, nehmen den ventrolateralen Weg durch die Somiten zur dorsalen Aorta und bilden dort die primären sympathischen Ganglien (Abb.1). Die grundlegenden Mechanismen der Entwicklung sympathoadrenerger Zellen sind im Stamm der Vertebraten stark konserviert und für das Haushuhn (*Gallus gallus*) sehr detailliert untersucht und beschrieben worden (Le Douarin und Kalcheim, 1999). Da *Gallus gallus* auch das Forschungsobjekt der vorliegenden Arbeit ist, ist im folgenden die Entwicklung der sympathoadrenergen Linie an dieser Art beschrieben.

Die Zellen der primären sympathischen Ganglien exprimieren relativ früh, etwa am Embryonaltag 2,5-3 (E2,5-3; HH-Stadium 21; Hamburger und Hamilton, 1951) noradrenerge Markergene (Ernsberger et al., 1995), wie die für die Noradrenalinbiosynthese wichtigen Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH, Schrittmacherenzym der Catecholamin-Biosynthese) und Dopaminbetahydroxylase (DBH) (Ernsberger et al., 2000). Die Induktion des noradrenergen Phänotyps wird hierbei durch Faktoren aus den angrenzenden axialen Strukturen (Notochord, Neuralrohr und der dorsalen Aorta) induziert (Groves et al., 1995). Hierbei spielen BMPs (bone morphogenetic proteins), Peptidwachstumsfaktoren der TGF $\beta$ -Familie, eine entscheidende Rolle. Zum Zeitpunkt der noradrenergen Differenzierung werden BMPs an der dorsalen Aorta exprimiert (Reissmann et al., 1996; Shah et al., 1996). Die Applikation von BMPs induziert noradrenerge Eigenschaften sowohl in Neuralleistenkulturen als auch *in vivo* (Varley and Maxwell, 1996; Reissmann et al., 1996; Lo et al., 1999). Der Befund, daß die

noradrenerge Differenzierung in primären sympathischen Neuronen durch den BMP-Antagonisten Noggin blockiert werden kann, zeigt die essentielle Rolle der BMPs bei diesem Vorgang (Schneider et al., 1999).

Etwa am Embryonaltag 3,5 entfernen sich die Zellen der primären Ganglien von der dorsalen Aorta. Eine Teilpopulation wandert in ventraler Richtung und differenziert sich zu den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks bzw. zu den Zellen der prävertebralen Ganglien. Eine weitere Population wandert in dorsolateraler Richtung zurück und bildet ventrolateral vom Rückenmark die sekundären paravertebralen sympathischen Ganglien.



**Abb.1: Migrationswege der sympathoadrenergen Zellpopulation.** Neuralleistenzellen aus dem Rumpfbereich wandern entlang zweier Hauptmigrationswege. Diejenigen Neuralleistenzellen, die den dorsolateralen Weg unterhalb des Ektoderms einschlagen (1.), entwickeln sich zu Pigmentzellen (Melanozyten). Neuralleistenzellen, die sich zu sympathoadrenergen Zellen entwickeln, nehmen den ventrolateralen Weg durch die Somiten (2.) und bilden in der Nähe der dorsalen Aorta die primären sympathischen Ganglien. Später wandert eine Subpopulation in dorsolateraler Richtung zurück und bildet ventrolateral vom Rückenmark die endgültigen sekundären paravertebralen sympathischen Ganglien.

An die Migrations-Phase schließt sich eine Proliferationsphase der bereits differenzierten sympathischen Neuronen an. Diese Proliferationsphase der bereits differenzierten TH-positiven sympathischen Neuronen stellt eine Besonderheit während der Entwicklung des Nervensystems dar (Rohrer und Thoenen, 1987), da in der Regel die Fähigkeit zur Zellteilung auf undifferenzierte, neuronale Vorläuferzellen beschränkt ist. Im Hühnerembryo ist die

Teilungsrate der Neuronen im sympathischen Ganglion zwischen Embryonaltag 3 und 9 am höchsten. Schon ab Embryonaltag 8 beginnen sympathische Neuronen mit der Innervierung der Zielgebiete (Kirby et al., 1978, Kirby et al., 1980, Rush et al., 1986). Dies erfordert zunächst die Navigation der Axone zu ihren Zielgeweben. In peripheren sympathischen Neuronen wird dieser Prozess zum Teil von externen Leitmolekülen vermittelt, die das axonale Wachstum steuern. Solche Signale sind Bestandteile der extrazellulären Matrix, die sowohl aus löslichen Faktoren, als auch aus in den Interstitialraum hineinragenden Membrankomponenten benachbarter Zellen besteht (Ledda et al., 2002). Zur Zeit sind einige Familien von attraktiven und repulsiven Leitmolekülen bekannt, die im gerichteten axonalen Wachstum involviert sind. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß Artemin (ARTN), ein Mitglied der TGF $\beta$ -Familie, von Blutgefäßen und den angrenzenden Zellen sympathischer axonaler Projektionen exprimiert wird (Honma et al., 2002). Es ist dafür verantwortlich, daß sympathische Fasern entlang von Blutgefäßen zu ihren Zielgeweben projizieren. Artemin (ARTN)- und GFR $\alpha$ 3 (Artemin spezifischer Rezeptor)-defizienter Mäuse zeigen Veränderungen in der Migration und im axonalen Projektionsmuster sympathischer Nervenzellen (Honma et al., 2002). Auch „glial derived neurotrophic factor“ (GDNF), ein weiterer Faktor aus der TGF- $\beta$ -Familie, kann zusammen mit vom Zielgewebe sekretiertem GFR $\alpha$ 1 (GDNF spezifischer Rezeptor) als chemoattraktives Signal dienen (Ledda et al., 2002), welches das Auswachsen von sensorischen und sympathischen Axonen zu den Zielgebieten fördert. Dort sekretierte oder präsentierte Faktoren spielen nicht nur eine wesentliche Rolle bei der Etablierung und Erhaltung spezifischer neuronaler Verknüpfungen, sondern haben auch einen Einfluß auf die weitere Entwicklung. So werden nach Erreichen des Zielgewebes die sympathischen Neuronen abhängig von dort synthetisierten Überlebensfaktoren, wobei NGF (nerve growth factor) ein entscheidender Überlebensfaktor ist (Stemple et al., 1988). *In vivo*-Blockierung von NGF mit Antikörper (Levi-Mantalcini und Booker, 1960), sowie Untersuchungen an NGF- (Crowley et al., 1994) oder TrkA (NGF-Rezeptor) defizienten Tieren (Smeyne et al., 1994) bestätigen dessen Wirkung. Auch für NT-3 wurde eine entscheidende Rolle als Überlebensfaktor für sympathische Neuronen nachgewiesen. So zeigen z.B. neugeborene NT-3-defiziente Mäuse einen 50%igen Verlust an sympathischen Neuronen (Francis et al., 1999; Wyatt et al., 1997). Neben der Bedeutung des Zielgebietes für das axonale Wachstum und das Überleben von Neuronen kann es auch einen Einfluß auf den Phänotyp der innervierenden Nervenzellen ausüben. So z.B. treten die ersten VIP-positiven, cholinergen sympathischen Neuronen erst nach Innervation der Zielgebiete auf (Schotzinger and Landis, 1988; Landis and Keefe, 1983; Abb.2, 3).

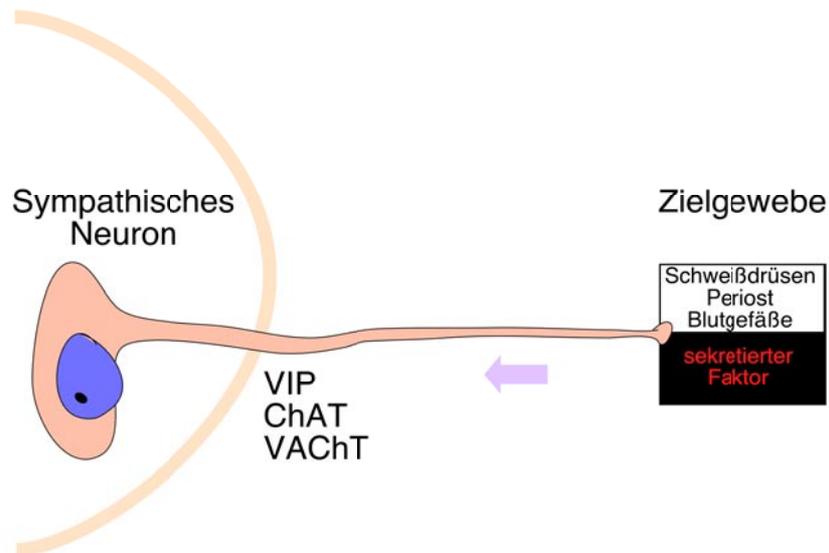
### ***1.4 Zielgebiete cholinergischer sympathischer Nervenzellen***

Bisher wurden in Säugern drei verschiedene Zielgebiete charakterisiert, die von cholinergischen sympathischen Neuronen innerviert werden. Diese sind die Schweißdrüsen, die Blutgefäße der Skelettmuskulatur und das Periost (Knochenhaut). Das am besten untersuchte Modell der cholinergen Differenzierung sympathischer Neuronen sind die rein cholinerg innervierten Schweißdrüsen in den Pfoten von Nagern (Leblanc and Landis, 1986; Stevens and Landis, 1987; Landis et al., 1988). Die cholinerge Natur der Schweißdrüseninnervierung wird durch die Blockierung der Schweißbildung durch Atropin, einen Muscarin-Antagonisten (Grant et al., 1995), sowie durch die Stimulation der Schweißbildung durch cholinerge Agonisten (Steven and Landis, 1997) nachgewiesen. Zudem weisen Fußsohlen-Homogenate eine hohe Cholinacetyl-Transferase (ChAT)-Aktivität auf (Leblanc und Landis, 1986). Immunhistologisch lassen sich ChAT- und vesiculärer Acetylcholin-Transporter (VAChT), der der Akkumulation von Acetylcholin in synapthischen Vesikeln cholinergischer Neuronen dient, in den synaptischen Endigungen der Schweißdrüse detektieren (Leblanc and Landis, 1986; Weihe et al., 1996).

Eine weiteres Zielgebiet cholinergischer sympathischer Neuronen in Nagern sind die Blutgefäße der Skelettmuskulatur. Physiologische Studien zeigen eine cholinerge sympathische Vasodilatation der Skelettmuskeln (Uvnas, 1996; Anderson et al., 1996) an kleinen intramuskulären Arterien (Matsukawa et al., 2002).

Das dritte bekannte Zielgebiet cholinergischer sympathischer Neuronen bei Nagern ist das Periost (Asmus et al., 2000; Asmus et al., 2001). Es wird in adulten Tieren von zwei Populationen sympathischer Neuronen innerviert: periostale Blutgefäße werden vorwiegend noradrenerg innerviert, während das Parenchym vorwiegend nicht-adrenerge Fasern enthält (Hohmann et al., 1986; Sisask et al., 1996). Diese VAChT-immunoreaktiven Nervenfasern zeigen eine hohe Immunreaktivität für „Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)“ (Francis et al., 1997; Schäfer et al., 1998; Asmus et al., 2000).

Beim Huhn wird eine starke cholinerge synapthische Innervation von Arterien in Muskel und Hautgewebe beobachtet (Zechbauer, 1995; Rohrer, unveröffentlicht). Die Innervation der Blutgefäße ist jedoch im Gegensatz zu den Schweißdrüsen nicht rein cholinerg, sondern erfolgt sowohl durch cholinerge als auch durch noradrenerge Fasern. Auch hier scheint die initiale Innervation durch noradrenerge Fasern zu erfolgen (Zechbauer, 1995).



**Abb.2: Modell der cholinergen Zielgebiets-Innervation.** In Säugern innervieren cholinerge sympathische Fasern die Schweißdrüsen, das Periost und die Blutgefäße. Für die cholinerge Differenzierung sympathischer Neuronen werden sekretierte Faktoren aus dem Zielgewebe verantwortlich gemacht, die cholinerge Markergene wie VIP induzieren.

### ***1.5 Bedeutung des Zielgewebes für die cholinerge Differenzierung***

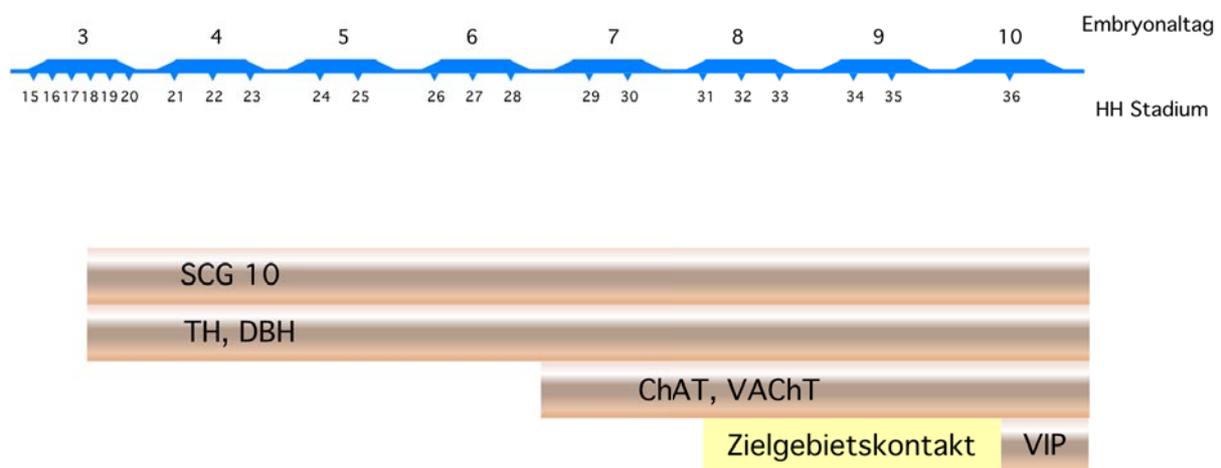
Für eine bedeutende Funktion des Zielgebiets während der Ausbildung des cholinergen Phänotyps sprechen Beobachtungen in Nagern, daß cholinerge Markergene (ChAT, VIP) in den Axonen erst nach Kontakt der Nervenfasern mit dem Zielgebiet auftreten (Schotzinger and Landis, 1988; Landis and Keefe, 1983). Dies wurde eindeutig für die Schweißdrüseninnervation gezeigt, bei der cholinerge sympathische Axone aus catecholaminergen Axonen hervorgehen (Guidry und Landis, 1998).

Die Transplantation von Schweißdrüsen in die Haut des lateralen Thorax, die rein noradrenerg innerviert wird, führt nach initialer Innervierung des Implantats durch noradrenerge Axone zu einem Wechsel der Eigenschaften zum cholinergen Phänotyp (Schotzinger and Landis, 1988). Zudem entwickeln die die Fußsohle innervierenden Axone keine cholinergen Eigenschaften, wenn die Schweißdrüsen fehlen, z.B. in „tabby“-Mäusen (Falconer, 1952; Gruneberg, 1971; Blecher et al., 1986), die aufgrund einer Mutation keine Schweißdrüsen ausbilden können (Rao et al., 1994). Ähnliche Resultate zeigen Transplantationsversuche, in denen die Schweißdrüsen aus den Fußsohlen entfernt und gegen Ohrspeicheldrüsen, die rein adrenerg innerviert werden, ersetzt wurden (Schotzinger and Landis, 1990).

Seit längerer Zeit ist man der Natur des cholinergen Differenzierungsfaktors auf der Spur. So zeigen *in vitro*-Experimente, daß sympathische Neuronen cholinerge Eigenschaften

entwickeln, wenn sie mit Schweißdrüsen kokultiviert werden, oder wenn sie mit dem Medium aus der Kokultur behandelt werden. Dies läßt vermuten, daß ein sekretierter, löslicher Faktor am Wechsel des Neurotransmitterphänotyps beteiligt ist (Habecker und Landis, 1994; Habecker et al. 1995). Ähnliche Arbeiten zeigen, daß eine ChAT-induzierende Aktivität in den Homogenaten der Schweißdrüsen von Ratten (Rao und Landis, 1990; Rao et al., 1992; Rohrer, 1992) und Mäusen (Habecker et al., 1995) vorhanden ist. Demgegenüber fehlt diese Aktivität in Fußsohlenextrakten von „tabby“-Mäusen (Habecker et al., 1995). Eine vergleichbare ChAT-induzierende, sekretierte Aktivität läßt sich auch in kultivierten Zellen aus dem Periost detektieren (Asmus et al., 2001). Andererseits ist auch die Innervation für die Entwicklung des Zielgebiets nötig. So zeigen Untersuchungen an TH-defizienten Mäusen, daß Catecholamine für die funktionelle Reifung der Schweißdrüsen notwendig sind (Tafari et al., 1997; Tian et al., 2000).

Im Gegensatz zur Schweißdrüseninnervation in Nagern, werden im Huhn frühe cholinerge Markergene bereits vor der Innervation des Zielgebietes exprimiert. Schon an Embryonaltag 6,5 ist ChAT- und VACHT-mRNA in Neuronen sympathischer Ganglien nachweisbar (Ernsberger et al., 1997, Stanke et al., 1999), die Innervation der Zielgebiete erfolgt im Huhn jedoch erst ab dem achten Tag der Embryonalentwicklung (Abb.3).



**Abb.3: Zeitliches Auftreten diverser Markergene während der Differenzierung sympathischer Ganglien des Huhns.** Während der Entwicklung cholinergere sympathischer Neuronen exprimieren die Vorläuferzellen neben den panneuronalen Genen wie SCG10, auch noradrenerge Markergene wie TH und DBH. Anschließend durchläuft ein Teil dieser zunächst noradrenergen Neuronen einen Phänotypwechsel von noradrenerg zu cholinerg. An E6 findet man die ersten ChAT/VACHT-positiven Neuronen, wobei die noradrenergen Markergene TH und DBH in diesen Neuronen allmählich herunterreguliert werden. Erst an E10, nachdem die cholinergen sympathischen Neuronen ihre Zielgebiete innervieren, lassen sich die ersten VIP-positiven Neuronen detektieren. Diese cholinergen sympathischen Neuronen exprimieren gleichzeitig ChAT, VACHT und VIP.

### ***1.6 Identität des in vivo relevanten cholinergen Differenzierungsfaktors***

Für die Induktion des cholinergen Phänotyps in sympathischen Neuronen kommen neurotrophe Faktoren aus drei verschiedenen Familien in Frage. Zumindest *in vitro* fördert GDNF und Neurturin (TGF- $\beta$ -Familie) cholinerge Eigenschaften, ebenso NT-3 (Neurotrophin-Familie) und CNTF (IL-6-Familie) (Broski et al., 2002). Jedoch ist die *in vivo* Relevanz von GDNF, Neurturin und NT-3 für die cholinerge Differenzierung sympathischer Neuronen noch ungeklärt. Im Gegensatz dazu ist die *in vivo* Beteiligung von Mitglieder der IL-6-Familie an der cholinergen Differenzierung sympathischer Neuronen bereits untersucht worden (Geissen et al., 1988). In Hühnerembryonen konnte die VIP-Induktion, nicht jedoch die ChAT-Expression durch Blockade von gp130 (einer von den vorgestellten Faktoren gemeinsam verwendeten signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit) gehemmt werden (Geissen et al., 1998).

Die Interleukin-6 (IL-6) Familie der neuropoetischen Zytokine umfaßt folgende Mitglieder:

- „Leukemia inhibitory factor“ (LIF), auch als „cholinergischer Differenzierungsfaktor“ (CDF) bezeichnet (Yamamori et al., 1989), ist ein multifunktionelles Zytokin und wurde erstmals von der Arbeitsgruppe Metcalf beschrieben (Gearing et al., 1987). Die Aufreinigung und Klonierung erfolgte aufgrund der Fähigkeit, die leukämische Zelllinie M1 zu Monocyten zu differenzieren und die Proliferation zu inhibieren. Es stellte sich im Lauf der Zeit heraus, daß LIF ein vielfältiges Wirkungsspektrum besitzt (Übersicht in Murphy et al., 1997): In den frühen Entwicklungsstadien supprimiert LIF die Differenzierung von embryonalen Stammzellen. In späteren Entwicklungsstadien kann LIF als Überlebens- und Proliferationsfaktor für primordiale Keimzellen wirken. Neben der Bedeutung von LIF für die Blutbildung und Knochenhomeostase hat LIF zahlreiche Funktionen innerhalb des Nervensystems, z.B. als Traumafaktor bei verletzten peripheren Nervenzellen (Rao et al., 1993; Ito et al., 1998).
- „Ciliary neurotrophic factor“ (CNTF) wurde ursprünglich als Ziliarneuronen-Überlebensfaktor aus der Ratte isoliert und kloniert (Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989). Da weder Ratten- noch Hasen-CNTF ein Signalpeptid besitzen, geht man davon aus, daß CNTF nicht sekretiert wird. Ein Indiz dafür ist, daß CNTF bei Transfektions-Experimenten nicht im Medium nachweisbar ist (Stöckli et al., 1989; Lin et al., 1989). Funktionell gibt es Hinweise, daß nach Nervenläsionen CNTF aus verletzten Schwannzellen freigesetzt wird (Übersicht in Terenghi, 1999).

- „Cardiotrophin-1“ (CT-1), wurde kloniert, da es *in vitro* eine Größenzunahme (Hypertrophie) von Herzmuskelzellen auslösen kann (Pennica et al., 1995). Die Expression von CT-1 mRNA konnte im Herzen und anderen Mausgeweben nachgewiesen werden (Pennica et al., 1995).
- „Oncostatin M“ (OSM) wurde aus dem Überstand von U-937 Lymphomazellen isoliert, die nach Behandlung mit Phorbol-Ester zu makrophagenähnlichen Zellen differenzieren können. Die Aufreinigung des Faktors ergab ein 28kDa großes Protein (Zarling et al., 1986), welches von Malik et al., (1989) kloniert werden konnte.
- „Cardiotrophin-like cytokine“, (CLC; Shi et al., 1999) ist assoziiert mit „Cytokine-like factor-1“ (CLF-1; Elson et al., 1998) und bindet als heterodimerer CLC/CLF-1-Ligand an CNTFR $\alpha$ . Diese Beobachtung erklärt auch den unterschiedlichen Phänotyp CNTF-defizienter und CNTFR $\alpha$ -defizienter Mäuse. Während CNTF-defiziente Mäuse einen milden Phänotyp aufweisen (Masu et al., 1993), sterben CNTFR $\alpha$ -defiziente Mäuse kurz nach der Geburt (De Chiara et al., 1995). Der Verlust von CNTF kann anscheinend weitgehend durch CLC/CLF-1 kompensiert werden. Dies wird durch die Analyse CLF-1-defizienter Mäuse bestätigt, die ähnlich den CNTFR $\alpha$ -defizienten Mäusen eine 20-30%ige Reduktion an lumbalen Motoneuronen aufweisen (Forger et al., 2002).
- „Growth promoting activity“ (GPA), ein weiterer Ziliarneuronen-Überlebensfaktor, wurde aus Vogelgewebe isoliert und charakterisiert (Eckenstein et al., 1990). Dieser Faktor hat ein Molekulargewicht von 21,5 kDa und ist zu 50% homolog zum Säuger-CNTF (Leung et al., 1992). Es besitzt ähnliche Eigenschaften wie CNTF (Leung et al., 1992). Doch im Gegensatz zu CNTF handelt es sich bei GPA um ein sekretiertes Protein.

Die Gemeinsamkeiten im Wirkungsspektrum im Bezug auf die Entwicklung und Regeneration von peripheren Nervenzellen (Ito et al., 2000), sowie Gemeinsamkeiten der Proteinstruktur und des Aufbaus ihrer Rezeptoren, haben zur Einordnung der genannten Faktoren in die Familie der neuropoietischen Zytokine geführt (Bazan, 1991). Die abgeleitete Proteinstruktur dieser Faktoren zeigt konservierte Bereiche, z.B. vier  $\alpha$ -Helix-Bereiche (Bazan, 1991), welche durch Kristallstruktur-Analysen von LIF und CNTF (Lee et al., 1988) bestätigt werden konnten. Zu den neuropoietischen Zytokinen werden auch weitere Faktoren, wie Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-11 (IL-11) gezählt, die aber soweit bisher bekannt, nur eine geringe Funktion im Nervensystem besitzen (Mehler et al., 1993; Patterson, 1992; Fann und Patterson, 1994).

Neuropoietische Zytokine vom IL-6 Typ verwenden gp130 (ein membrandurchspannendes 130kDa Glykoprotein) als signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit (Übersicht in Heinrich et al., 1998). Zusätzliche signaltransduzierende  $\beta$ -Rezeptoruntereinheiten wie LIFR $\beta$  und ligandenspezifische  $\alpha$ -Untereinheiten definieren die Spezifität der einzelnen Rezeptorkomplexe für die verschiedenen neuropoietischen Zytokine. So besteht der IL-6-Rezeptor aus IL-6R $\alpha$  und zwei gp130 Untereinheiten, der CNTF-Rezeptor aus CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  und gp130 (Abb.4).

Faktor	Organismus	Rezeptoruntereinheit
CDF/LIF	Säuger	gp130, LIFR $\beta$
CNTF	Säuger	gp130, LIFR $\beta$ , CNTFR $\alpha$
CLC/CLF	Säuger	gp130, LIFR $\beta$ , CNTFR $\alpha$
CT-1	Säuger	gp130, LIFR $\beta$ , CT-1R $\alpha$
OSM	Säuger	gp130, LIFR $\beta$ gp130, OSMR $\beta$
IL-6	Säuger	gp130, gp130, IL-6R $\alpha$
GPA	Huhn	gp130, LIFR $\beta$ , GPAR $\alpha$

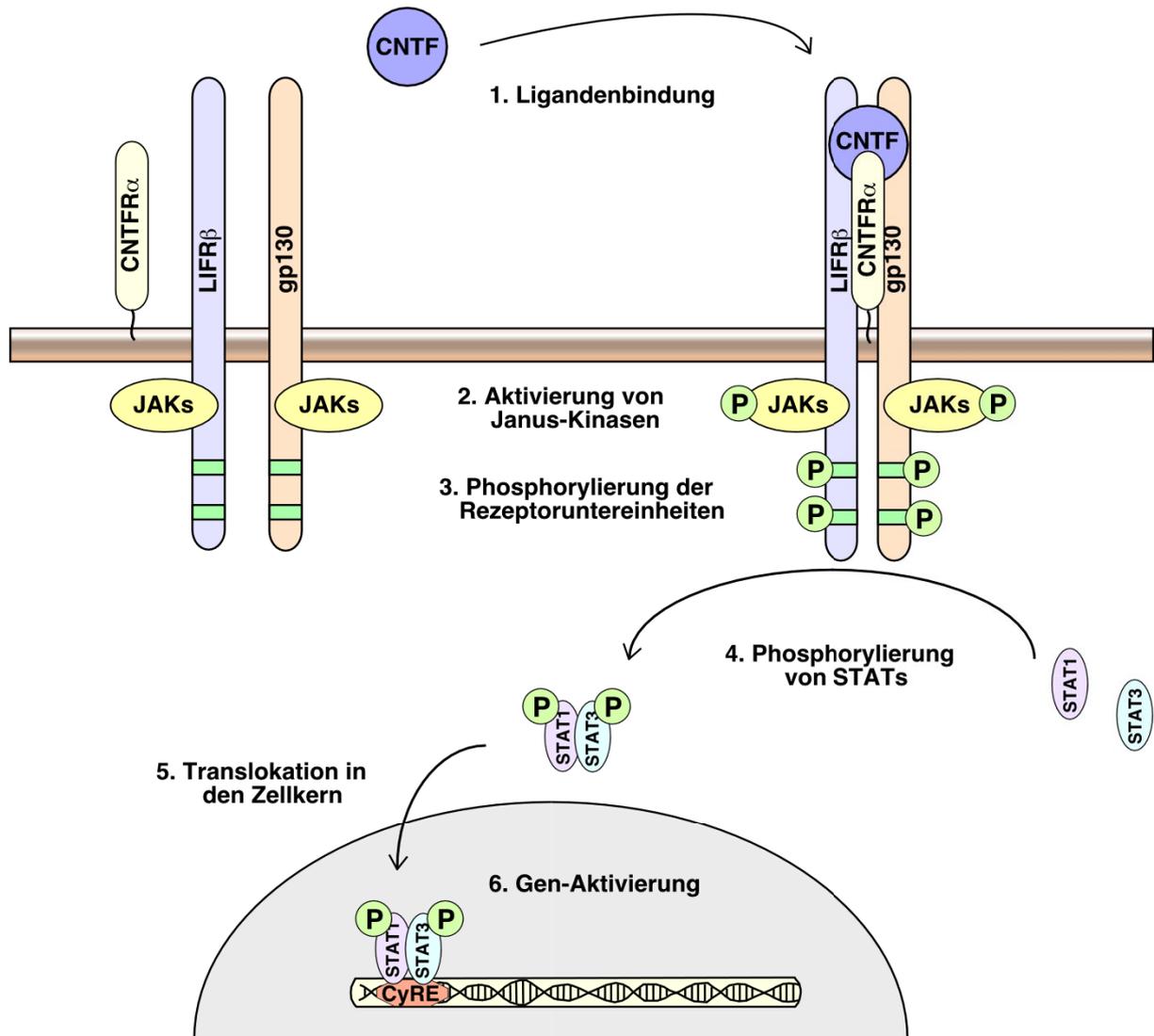
**Abb.4: Bislang bekannte neuropoietische Zytokine und deren Rezeptoren.** Die signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten sind farblich abgesetzt: gp130 (rot) und LIFR $\beta$  (blau). Mit Ausnahme des zweiten OSMR $\beta$ -Rezeptorkomplex und des IL-6-Rezeptorkomplex verwenden alle neuropoietischen Zytokine gp130 und LIFR $\beta$  als signaltransduzierende Rezeptoruntereinheiten.

**1.7 Signaltransduktionsweg neuropoietischer Zytokine**

Als typisches Beispiel für die Signaltransduktion neuropoietischer Zytokine soll im folgenden der Signaltransduktionsweg von CNTF erläutert werden (Abb.5; Übersicht in Frank und Greenberg, 1996; Heinrich et al., 1998; O'Shea et al., 2002). CNTF bindet zunächst an eine  $\alpha$ -Untereinheit, CNTFR $\alpha$ . Diese ist über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI-) Rest mit der Zellmembran verankert und trägt somit nicht zur cytoplasmatischen Signaltransduktion bei (Davis et al., 1991). Die Bindung des Liganden führt zur Rekrutierung und Dimerisierung der signaltransduzierenden  $\beta$ -Untereinheiten, gp130 und LIFR $\beta$ . Die anschließende

Phosphorylierung der  $\beta$ -Komponenten sowie weiterer Proteine in der CNTF-Signalkaskade durch lösliche Tyrosin-Kinasen der Jak-Tyk-Familie (Muramaki et al., 1993; Stahl et al., 1994) führt zur Rekrutierung und Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (signal transducer and activator of transcription; Ihle, 1995; Ihle, 1996; Rajan et al., 1996). Im Falle des gp130/LIFR $\beta$ -Rezeptorkomplexes wurde die spezifische Aktivierung von STAT1- und STAT3-Molekülen nachgewiesen (Bonni et al., 1993; Briscoe et al., 1994). Aktivierte STATs aggregieren zu Homo- oder Heterodimeren und können in den Zellkern eindringen (Bonni et al., 1993; Briscoe et al., 1994). Die Bindung von STATs an bestimmte Promotorregionen (CyRE, cytokine response element) von Zielgenen ermöglicht dann deren Transkription (Darnell, 1997; Pellegrini und Dusanter-Fourt, 1997). Promotorstudien zeigen, daß CyR-Elemente sowohl in der Promotorregion des VIP-Gens (Symes et al., 1995, Symes et al., 1997) als auch im ChAT- und VAcHT-Promotor vorhanden sind (Misawa et al., 1993). *In vitro* Luziferase-Reporterassays zeigen zudem, daß für die vollständige Aktivierung von ChAT und VIP über STAT1 und STAT3 die C-terminalen 47aa von gp130 benötigt werden (Bartoe und Nathanson, 2002). Eine direkte Aktivierung von Genen über STAT-Moleküle, die spezifisch in cholinergen sympathischen Neuronen exprimiert werden, ist daher möglich (Habecker et al., 1997). Diese Reporterstudien unterstützen somit die Zellkulturexperimente und die Vorstellung, daß neuropoietische Zytokine an der Differenzierung cholinerg sympathischer Neuronen beteiligt sein könnten.

Diese Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden (Übersicht in: O'Shea et al., 2002; Aaronson und Horvath, 2002). Neben den Mechanismen wie Rezeptorinternalisierung in endocytotischen Vesikeln und Degradierung der Rezeptoren erfolgt eine spezifische Inhibierung durch Tyrosinphosphatasen. Dies erfolgt zum einen auf der Ebene des Membran-assoziierten-Rezeptor-Kinasekomplexes oder im Zellkern durch Dephosphorylierung der aktivierten STAT-Dimere, zudem kann die Kinaseaktivität der JAKs von spezifischen Inhibitoren, den SOCS (suppressor of cytokine signaling), durch direkte Bindung inaktiviert werden. Die Expression der SOCS kann wiederum durch das gleiche Zytokin stimuliert werden, das den STAT-Signalweg aktiviert. Im Zellkern können die aktivierten STATs von PIAS-Proteinen (protein inhibitors of activated STATs) an der DNA-Bindung gehindert werden.



**Abb.5: Modell des CNTF-Signaltransduktionsweges.** Die Bindung von CNTF an CNTFR $\alpha$  führt zu einer Zusammenlagerung des trimeren Rezeptorkomplexes, bestehend aus CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  und gp130, und zur Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytosomatischen Domäne von gp130 und LIFR $\beta$ . Diese Tyrosin-Phosphorylierung der  $\beta$ -Komponenten, sowie weiterer Proteine in der CNTF-Signalkaskade wird durch lösliche Tyrosin-Kinasen der JAK-Tyk-Familie katalysiert. Intrazellulär erfolgt eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die zur STAT-Familie gerechnet werden. Aktivierte STATs aggregieren zu Homo- oder Heterodimeren und können in den Zellkern transferieren, dort binden sie an CyRE von Zielgenen und ermöglichen deren Transkription.

### 1.8 Die Bedeutung bisher bekannter neuropoetischer Zytokine für die cholinerge Differenzierung sympathischer Neuronen

Zahlreiche *in vitro*-Studien unterstreichen die Beteiligung von neuropoetischen Zytokinen bei der Differenzierung cholinergischer sympathischer Neuronen (Übersicht in Francis and Landis, 1999; Ernsberger and Rohrer, 1999), die zumindest *in vitro* in dissoziierten sympathischen Neuronen cholinerge Eigenschaften induzieren können. Es stellt sich daher die Frage, ob eines der bisher bekannten neuropoetischen Zytokine *allein* die Entwicklung der

cholinergen Innervation sympathischer Zielgebiete bewirkt. Dies kann in dieser Form verneint werden, da experimentell alle Mitglieder dieser Familie in Säugetieren als mögliche *alleinige* Kandidaten ausgeschlossen wurden: Im Falle von LIF zeigen anti-LIF-Antikörper keine blockierende Wirkung auf die cholinerge Aktivität des unbekanntes Schweißdrüsenfaktors auf sympathische Neuronen (Rao and Landis, 1990). Weiterhin ist die Innervation der Schweißdrüsen in homozygoten „LIF-knock out“-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unbeeinträchtigt (Francis et al., 1997). Auch CNTF konnte ausgeschlossen werden, da zum einen homozygote „CNTF-knock out“-Mäuse keine Veränderung in der Schweißdrüseninnervation aufweisen (Masu et al., 1993), und der von den Schweißdrüsen sekretierte Faktor *in vitro* nicht durch ein lösliches Dimer aus CNTFR $\alpha$  und gp130 (CGX) blockierbar ist (Habecker et al., 1997). Dieses Resultat schließt gleichzeitig CLC/CLF-1 als möglichen Kandidaten aus, da dieser über den CNTFR $\alpha$  transduziert (Elson et al., 2000). Eine Expression von CT-1-mRNA in den Fußsohlen konnte zwar durch RT-PCR nachgewiesen werden (Habecker et al., 1995), jedoch ist die von den Schweißdrüsen sekretierte cholinerge Differenzierungsaktivität weder in Kulturexperimenten noch in Fußsohlenextrakten mit Anti-CT-1-Antiserum blockierbar (Habecker et al., 1995). RT-PCR-Analysen zeigen, daß OSM zwar in den Fußsohlen exprimiert wird, jedoch nicht in den Schweißdrüsen nachweisbar ist. Somit ist auch OSM ein unwahrscheinlicher Kandidat für das induzierende Agens (Habecker et al., 1997).

Keiner der im Säuger bislang identifizierten Faktoren (LIF, CNTF, CLC/CLF-1, OSM, CT-1) ist demnach der von den Schweißdrüsen identifizierte Faktor, der *in vivo* den cholinergen Transmitterphänotyp induziert.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß *in vivo* mehrere Faktoren aus der gleichen Familie diesen cholinergen Differenzierungsschritt einleiten. In mutanten Tierstämmen, in denen nur ein Faktor betroffen ist, könnten andere Faktoren diesen Verlust kompensieren. Diese Möglichkeit wurde für CNTF und LIF in doppel-defizienten Mäusen ausgeschlossen, da sie keine Veränderung in den Eigenschaften der Schweißdrüseninnervation aufweisen (Francis et al., 1997).

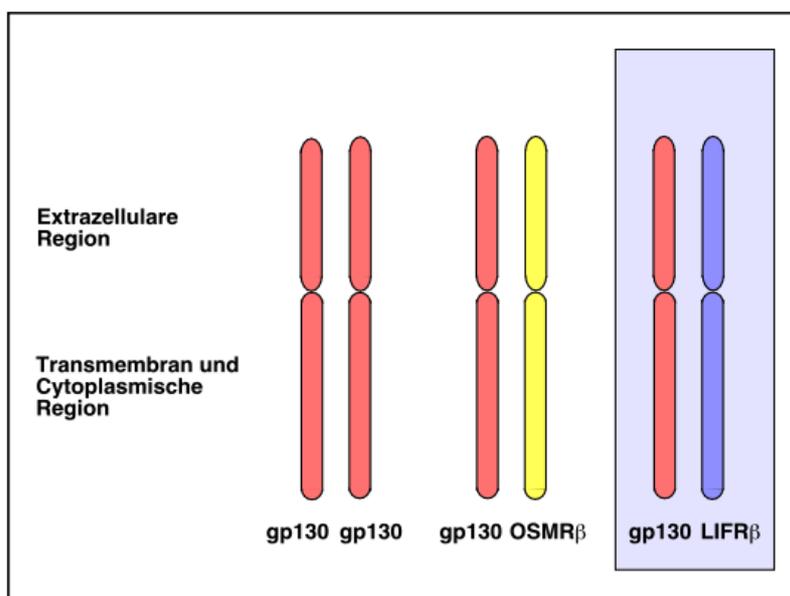
Eine weitere Möglichkeit wäre, daß ein bisher nicht identifiziertes Mitglied dieser Zytokinfamilie für die cholinerge Differenzierung der peripheren sympathischen Neuronen verantwortlich ist (Landis, 1996; Habecker et al., 1997).

Für das Huhn wurde die Beteiligung von neuropoietischen Zytokinen an der cholinergen Differenzierung sympathischer Neuronen durch die Blockade von gp130 während der Differenzierungsphase gezeigt (Geissen et al., 1998). Die VIP-Induktion in cholinergen

sympathischen Neuronen konnte durch Expression von gp130-antisense RNA blockiert werden, was die Beteiligung von neuropoietischen Zytokinen an der Differenzierung cholinerg sympathischer Neuronen belegt. Im Gegensatz zur VIP-Expression ist die Expression des eigentlichen cholinergen Markers ChAT durch Blockierung der gp130 Funktion nicht betroffen. Eine Aussage über die Natur des Liganden kann jedoch nicht getroffen werden (Geissen et al., 1998).

GPA, einziges bekanntes neuropoietisches Zytokin in Huhn, besitzt ähnliche Eigenschaften wie CNTF (Leung et al., 1992). Es ist daher unwahrscheinlich, daß GPA der cholinerge Zielgebietsfaktor ist. Zudem wird es stark in Gliazellen der peripheren Nerven exprimiert (Leung et al., 1992). Vorläufige *in vivo* Untersuchungen zeigen zudem, daß die VIP-Expression in cholinergen sympathischen Neuronen im Hühnerembryo nicht durch CNTFR $\alpha$ -antisense RNA inhibiert werden kann (Geissen, unveröffentlicht). Obwohl nicht zwingend davon ausgegangen werden kann, daß ein Effekt von CNTFR $\alpha$ -antisense RNA *in vivo* ausreichend ist, die VIP-Expression zu hemmen, so ist dieses Resultat zusammen mit den beschriebenen Untersuchungen in Nagern ein Indiz dafür, daß GPA alleine nicht der cholinerge Differenzierungsfaktor ist. Dieses vorläufige Resultat schließt ebenfalls Huhn-Homologe von CLC/CLF als mögliche Kandidaten aus, da diese über den CNTFR $\alpha$  transduzieren (Elson et al., 2000).

Die Suche nach dem für die cholinerge Differenzierung relevanten unbekanntem neuropoietischen Zytokin kann prinzipiell durch die Charakterisierung der beteiligten Rezeptoruntereinheiten eingegrenzt werden. In den meisten Fällen wird der LIFR $\beta$  als zweite signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit verwendet (Abb.4, 6), außerdem OSMR $\beta$  oder gp130.



**Abb. 6: Möglicher Signaltransduktionskomplex des unbekanntem cholinergen Zielgebietsfaktors.** *In vitro*-Daten sind mit der Beteiligung eines heterodimeren Rezeptorkomplexes aus LIFR $\beta$  und gp130 kompatibel. gp130 (rot), OSMR $\beta$  (gelb), LIFR $\beta$  (blau).

*In vitro*-Versuche zeigen, daß die Blockierung der signaltransduzierenden LIFR $\beta$ -Rezeptoruntereinheit mit spezifischen Antikörpern zur Inhibition der cholinergen Differenzierung in Neuronen/Schweißdrüsen Kokulturen führt (Habecker et al., 1997). Im Einklang dazu steht auch die Beobachtung, daß Faktoren in Schweißdrüsen-Extrakten die Phosphorylierung von gp130 und LIFR $\beta$ , sowie von STAT-3 stimulieren (Habecker et al., 1997). *In vivo* konnten diese Resultate durch die Analyse LIFR $\beta$ -defizienter Tiere nicht verifiziert werden, da homozygote Tiere an P0 sterben, bevor die sympathischen Fasern ihre Zielgebiete erreichen (Ware et al., 1995; Guidry and Landis, 1998). Der Kontakt von sympathischen Faser mit den Schweißdrüsen erfolgt in Nagern erst an P2 (Vorderpfoten) bzw. P4 (Hinterpfoten, Guidry und Landis, 1998; Landis und Keefe, 1983). Diese offene Frage kann im Huhnssystem durch räumlich begrenzte Expression von antisense LIFR $\beta$ -mRNA mittels eines retroviralen Vektors geklärt werden. Vorteil dieser Methode ist, daß lediglich im regionalen Infektionsbereich die LIFR $\beta$ -Expression reprimiert ist. Die Verwendung eines retroviralen Vektors führt im Laufe der Zeit über Sekundärinfektion zu einer starken Ausweitung des Wirkungsbereiches. Im Gegensatz zum vollständigen „knock out“ überleben die Embryos meistens den regionalen Verlust des Gens und können zu einem Zeitpunkt analysiert werden, an dem der cholinerge Phänotypwechsel bereits erfolgt ist.

### **1.9 Zielsetzung**

*In vitro*-und *vivo*-Studien belegen die Bedeutung von neuropoietischen Zytokinen bei der Differenzierung sympathischer Neuronen. Die Identität des physiologisch relevanten Zytokins ist jedoch bis heute ungeklärt. Aus diesem Grunde sollte eine Eingrenzung der bei diesem Prozess beteiligten neuropoietischen Zytokine vorgenommen werden, in dem der beteiligte Rezeptorkomplex untersucht wird. Vorangegangene *in vitro*-Untersuchungen sprechen für die Beteiligung eines Rezeptorkomplexes, der zumindest die Rezeptoruntereinheiten gp130 und LIFR $\beta$  enthält.

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit LIFR $\beta$  an der VIP-Induktion cholinergischer sympathischer Neuronen *in vivo* beteiligt ist. Weiterhin sollten neuropoietische Zytokine im Huhn gefunden und charakterisiert werden. Hierzu sollen dimere Rezeptor-Antikörper-Fusionsproteine (Rezeptorfusionsprotein) aus LIFR $\beta$ -Fc und/oder gp130-Fc hergestellt werden, mit denen eine Expressionsbank durchsucht werden kann. Die Expressionsbank sollte aus kultivierten Herzzellen gewonnen werden, die einen unbekanntem VIP-induzierenden Faktor produzieren.

## 2. Material

### 2.1 Bakterienstämme

Stamm	Gentische Marker	Bezugsquelle
JM110	RpsL(str <sup>r</sup> ) thr, leu, thi-1, lacY, galK, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ(lac.proAB), (F' traD36, pro AB, lac <sup>q</sup> ZΔM15)	Stratagene
TOP10	F- mcr Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR)endA1 nupG	Invitrogen
XL-1 Blue	RecA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F'proAB, lac <sup>q</sup> ZΔM15, Tn10, (tet <sup>r</sup> ))	Stratagene
Y1090r-	AraD139, hsdR (rk-, mk+), mcr A-, rpsL, supF, trpC22	Clontech

### 2.2 Enzyme/Marker

#### 2.2.1 Enzyme

Enzyme	katalytische Aktivität	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Phosphatase	Roche Diagnostics
Desoxyribonuklease I	Desoxyribonuklease	Sigma
DNA Polymerase I	DNA abhängige DNA Polymerase, Klenow-Enzym	Roche Diagnostics
Proteinase K	Proteinase	Sigma
Restriktionsenzyme	DNA-Endonukleasen	Roche Diagnostics, Amersham
Ribonuklease A	Ribonuklease	Roche Diagnostics
Ribonuklease H	Ribonuklease	Roche Diagnostics
Ribonuklease (aus Rinderpankreas)	Ribonuklease	Roche Diagnostics, Sigma
Taq DNA Polymerase	DNA abhängige DNA Polymerase, hitzestabil	Invitrogen
T3-RNA Polymerase	DNA abhängige RNA Polymerase	Invitrogen
T7-RNA Polymerase	DNA abhängige RNA Polymerase	Invitrogen
T4-DNA Ligase	DNA Ligase	Invitrogen
T4-Polynukleotidkinase	Kinase	Stratagene, Roche Diagnostics
Trypsin	Proteinase	Worthington
Trypsin-EDTA	Proteinase	Invitrogen

# Material

---

## 2.2.2 Molekulargewichtsmarker

Molekül	Bezeichnung	Hersteller
DNA	1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
DNA	Smart Ladder	Eurogentec
Proteine	Color Markers, High Range, Wide Range	Sigma

## 2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

### 2.3.1 Bezugsquellen von Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die Chemikalien und das Verbrauchsmaterial wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham, ABI, Becton Dickinson, Biomol, BRL, Costar, Difco, Falcon, Fischer, Fluca, Greiner, Kodak, Merck, Messer Griesheim, Invitrogen, Nunc, Pharmacia, Promega, Riedel-de Haen, Roche Diagnostics, Qiagen, Roth, Schleicher & Schüll, Serva, Sigma, USB.

### 2.3.2 Spezielles Verbrauchsmaterial und Kits

Kit	Hersteller
dNTP Set	Invitrogen
DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	ABI
NAP-Säulen/Nick-Säulen	Pharmacia
Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll)	Fischer
Nylonmembran (Hybond-N; Hybond-N+)	Amersham
Qiagen Plasmid Kits	Qiagen
Lambda DNA Purification Kit	Qiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen
Geleluations Kit	Qiagen
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rediprime Random Primer Labelling	Amersham
Röntgenfilme (Kodak XAR-5)	Sigma
5'-Race Kit	Roche Diagnostics
Slide-A-Lyzer Casette	Pierce

## Material

---

Quick-Spin Columns G-50 Sephadex RNA Purification	Roche Diagnostics
Hi Speed Plasmid Midi Kit	Qiagen
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen
pGEMT®T-Easy Vector System I	Promega
Superfect	Qiagen
Efectene	Qiagen

---

### 2.4 Plasmide

#### 2.4.1 Plasmid-Konstrukte

Plasmid	Größe	Resistenzen u. besondere genetische Merkmale	Hersteller
pBlueskript KS	2,96kb	AmpR, lacP/O $\alpha$ , f(1)+ori	Stratagene
pcDNA-lacZ	8,6kb	AmpR, CMV-Promotor, SV40intron/pA, E.coli lacZcds	S. Heller
pBK-CMV	4,5kb	NeoR, CMV-Promotor, SV40intron/pA, lacP/O $\alpha$ , f(1)-ori	Stratagene
pcDNA3.1(+)	5,4kb	AmpR, NeoR, CMV-Promotor, f(1)+ori	Stratagene
pCMX	ca. 5kb	AmpR, CMV-Promotor, SV40intron/pA	Davis et al. (1991)
RCAS (B)	11,6kb	AmpR	Hughes and Kosik (1984)
pGEM®-TEasy Vector	3,0kb	AmpR, lacZ, TA-Klonierungsvektor	Promega
pBK-CMV hIgG		NeoR, CMV-Promotor	S. Heller
pFC-gp130		NeoR, CMV-Promotor	D. Junghans
pGEM 3Z GPA		AmpR	R. Nishi
pBK-SK RT		AmpR	S. Heller
pGEM 3Z SCG10		AmpR	P. Jeffrey
pBK II SK+ VIP		AmpR	P. Sharp
p ChAT		AmpR	T. Jessell
p TH		AmpR	U. Ernsberger
p LIFR $\beta$	5,5kb	AmpR	M. Geissen

---

## 2.4.2 HCM-Expressionsbank

1. cDNA Bibliothek aus kultivierten Huhnzellen in pcDNA3.1(+)
2. Primärtiter  $3,8 \times 10^5$  cfu
3. Bezugsquelle: Scinet Bioproducts GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig

## 2.5 Oligonukleotidprimer

Primer	Beschreibung	Sequenz
A2	RACE-Primer, antisense	5'-CATTCGGAGTACCTCAATCTC-3'
A3	RACE-Primer, antisense	5'-GGCATATCTGACTTCCAGTTCC-3'
A15	LIFR $\beta$ (Konstrukt E), sense, Cla I	5'-CCATCGATGCCGGCTGTGCAAATAACTGACCAG-3'
A16	LIFR $\beta$ (Konstrukt E), antisense, Cla I	5'-CCATCGATTGCACACTATATTTGTCCCACTGGC-3'
A55	pcDNA3.1, sense, Insert flankierend	5'-TACGACTCACTATAGGGAGAC-3'
A56	pcDNA3.1, antisense, Insert flankierend	5'-CAACTAGAAGGCACAGTCGA-3'
A57	GPA, sense	5'-GAGCTCCCGGCTGGAATGCACC-3'
A58	GPA, antisense	5'-GGCTCTCCAGATGCTTTATTTGCTCAGC-3'
A63	GAPDH, sense	5'-GTCAACGGATTTGGCCGTAT-3'
A64	GAPDH, antisense	5'-AATGCCAAAGTTGTCATGGATG-3'
A65	Actin, sense	5'-TATGCCAACACAGTGCTGTCTGGTGG-3'
A66	Actin, antisense	5'-TAGAAGCATTGCGGTGGACAATGG-3'
RCASB <sub>1</sub>	Sequenzierprimer, sense	5'-GTGAAATACGCTTTTGTCTGTGTG-3'
RCASB <sub>2</sub>	Sequenzierprimer, antisense	5'-ACAACCGAAGCCCCGCTTTTCGCC-3'
Sp6	Sequenzierprimer	5'-TTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAG-3'
T3	Sequenzierprimer	5'-CGAAATTAACCCTCACTAAAGG-3'
T7	Sequenzierprimer	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCG-3'

## 2.6 Puffer und Lösungen

### 2.6.1 Allgemeine Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Denaturierungs-Lösung	0,5M NaOH; 1,5M NaCl
Denhardt's (50x)	1% (w/v) Ficoll; 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 1% (w/v) BSA; (nicht autoklaviert)
DNA-Probenpuffer (6X)	0,25% (v/v) Bromphenolblau; 0,25% (v/v) Xylencyanol FF; 30% (v/v) Glycerol; (nicht autoklaviert)
Hybridisierungspuffer	DNA-Membranen: 50% (v/v) Formamid; 5xSSPE; 5xDenhardt's; 0,1% (w/v) SDS; 100µg/ml Heringssperma-DNA (denaturiert); (nicht autoklaviert)
MOPS-Puffer (10x)	200mM MOPS; 50mM Na-Acetat; pH7,0; (mit NaOH einstellen)
Neutralisierungslösung	1,5M NaCl; 1,5M Tris-HCl; pH7,5; (nicht autoklaviert)
SSC (20x)	3M NaCl; 300mM Trinatriumcitrat; pH7,0
SSPE (20x)	3M NaCl; 200mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 20mM EDTA; pH7,4 (mit NaOH einstellen)
TAE (20x)	1mM EDTA; 400mM Na-Acetat; 800mM Tris-HCl; pH8,0 (mit Essigsäure einstellen)
TBE (5x)	1mM Tris-HCl; 1M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 25mM EDTA; pH8,0
TE-Puffer	10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH8,0
Waschpuffer 1	2xSSC; 0,5% (v/v) SDS; (nicht autoklaviert)
Waschpuffer 2	1xSSC; 0,1% (v/v) SDS; (nicht autoklaviert)
Waschpuffer 3	0,2xSSC

### 2.6.2 In situ-Hybridisierung

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
AP-Puffer	0,1M Tris; 50mM MgCl <sub>2</sub> ; 100mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20; 0,024% (w/v) Levamisol; pH9,5 (nicht autoklaviert)
Hybridisierungspuffer	50% (v/v) Formamid; 1xSalz, 10% (w/v) Dextransulfat; 1xDenhardt's; 10% (w/s) Hefe-RNA; (nicht autoklaviert)
MAB	100mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH7,5
MABT	MAB; 0,1% (v/v) Tween-20; (nicht autoklaviert)
Salz (10x)	0,461g Tris; 3,24g NaCl; 0,234g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O; 0,213g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 50mM EDTA; pH7,5 (30ml)
Waschlösung	1xSSC, 50% Formamid, 0,1% Tween

## Material

---

### 2.6.3 Immunfärbungen-/ DAB-Färbung

Puffer	Zusammensetzung
BBS(2x)	50mM BES; 280mM NaCl; 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH6,94; (steril filtriert)
Boratpuffer	150mM H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> ; pH8,3 (mit NaOH einstellen); (steril filtriert)
KRH	Krebs-Ringer-Hepes; 25mM Hepes; 125mM NaCl; 4,8mM KCl; 1,3mM CaCl <sub>2</sub> ; 1,2mM MgSO <sub>4</sub> ; 1,2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 5,6mM Glucose; pH7,3; (steril filtriert)
PBS	137mM NaCl; 3mM KCl; 6,5mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH7,3
PBST (0,1%)	0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS
PBST (10%)	10% (v/v) Eseserum in (0,1%) PBST
PBST (0,2%)	0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS
PBST (20%)	10% (v/v) Eseserum; 10% (v/v) Kälberserum in (0,2%) PBST
PBS/Glycerin	PBS/Glycerin 1:1 (v/v)
PBT1	1xPBS; 0,1% (v/v) Triton X-100; 1% (w/v) BSA; (nicht autoklaviert)
PBT2	1xPBS; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,1% (w/v) BSA; (nicht autoklaviert)
PORN	Poly-DL-Ornithin (0,5mg/ml) in Boratpuffer; (nicht autoklaviert)
Trisphosphatpuffer (TPE), pH 7,8	90mM Tris-Phosphat; 2mM EDTA; pH 7,8 (mit Phosphorsäure einstellen)

### 2.6.4 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Acrylamid/ Bisacrylamid	29,2 g / 100 ml Acrylamid; 0,8 g / 100ml N'N'-bis-methylen-arylamid in Wasser
Trenngelpuffer	0,1 M Tris / HCl; pH8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris / HCl; pH6,8
SDS-Stocklösung	10% SDS (w/v) in Wasser
TGS-Laufpuffer (5x)	15 g / l Tris; 72 g / l Glycin; 5 g / SDS
Probenpuffer reduzierend (4x)	0,5 M Tris-HCl, pH6,8; 10% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 1% (w/v) Bromphenolblau
Probenpuffer nicht reduzierend (4x)	0,5 M Tris-HCl, pH6,8; 10% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS; 1% (w/v) Bromphenolblau

### 2.6.5 Coomassie blue-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Lösungen	Zusammensetzung
Coomassie blue-Färbelösung	0,1% Coomassie blue R-250, 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Entfärberlösung	40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 4% (v/v) Glycerin

## Material

### 2.6.6 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Fixierpuffer 1	50% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure
Fixierpuffer 2	5% (v/v) Ethanol; 5% (v/v) Essigsäure
Farmers-Reagenz	1,5 g/l $K_3Fe(CN)_6$ ; 3 g/l $Na_2S_2O_3$ ; 0,5 g/l $Na_2CO_3$
Silbernitratlösung	100 mg/50 ml (12 mM)
Entwicklerlösung	30 g/l $Na_2CO_3$ ; 500 $\mu$ l/l Formaldehyd (37%)
Stopplösung	1% (v/v) Essigsäure

### 2.6.7 Transfer von Proteinen auf Membranen

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer	20% (v/v) Methanol in TGS

### 2.6.8 Immundetektion von Proteinen auf Membranen

Puffer	Zusammensetzung
TBS	10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, pH8,0
TBST	10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20, pH8,0
Blockpuffer	5% (w/v) Milchpulver in PBST

### 2.6.9 Aufreinigung von heterodimeren Rezeptorfusionsproteinen auf Protein A-Säulen

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	300 mM NaCl, 50 mM $NaH_2PO_4$ , pH7,3
Puffer B	300 mM NaCl, 50 mM $NaH_2PO_4$ , pH6,3
Puffer C	300 mM NaCl, 20 mM Zitronensäure, 40 mM $NaH_2PO_4$ , pH5,5
Puffer D	300 mM NaCl, 20 mM Zitronensäure, 40 mM $NaH_2PO_4$ , pH5,3
Puffer E	300 mM NaCl, 20 mM Zitronensäure, 40 mM $NaH_2PO_4$ , pH4,9
Puffer C, D, E	mit $NaH_2PO_4$ , Citronensäure und NaOH einstellen

## 2.7 Bakterienkulturen

### 2.7.1 Medien und Substrate

Medium	Zusammensetzung
LB-Broth	1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 171mM NaCl; pH7,0
LB-Agar	LB-Broth; 1,5% (w/v) Bacto-Agar
LB-Topagarose	LB-Broth; 0,75% (w/v) Agarose
LB-Topagar	LB-Broth; 1,5% (w/v) Bacto-Agar

## Material

---

### 2.7.2 Zusätze für Bakterienkultur

Agentien	Zusammensetzung	Hersteller
Ampicillin (Amp)	0,5% (w/v) Amp-Na-Salz in Wasser; 1/500, sterilf.	Sigma
Kanamycin (Kan)	0,5% (w/v) Kan-sulfat in Wasser; 1/1000, (sterilfiltriert)	Roche Diagnostics
Tetracyclin (Tet)	0,025% (w/v) Tet in Ethanol/Wasser (50%); 1/100	Serva
IPTG	0,1M IPTG in Wasser	Biomol
X-Gal	2% (w/v) X-Gal in DMF	Biomol

---

## 2.8 Zellkultur

### 2.8.1 Zelllinien

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Ursprungsorganismus
COS-7	Niere	Cercopithecus aethiops
DF-1	Fibroblastenzellen	Gallus gallus
HEK 293	Niere	Homo sapiens

---

### 2.8.2 Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
MEM	ohne Glutamin, mit Earle's Salzen	Invitrogen
MEM*	MEM; 10%(v/v) Pferdeserum, 5%(v/v) fötales Kälberserum; 1%(v/v) Pen/Strep Antibiotikallösung	
DMEM	Dubecco's Mod Eagle Medium, Glucose, Pyridoxine HCl	Invitrogen

---

### 2.8.3 Zusätze für die Zellkultur

Lösungen	Behandlung und Dosierung	Hersteller
CNTF (human rekombinant)	1,5ng/ml (Endkonzentration)	Leihgabe von H. Huber
fötales Kälberserum	hitzeinaktiviert (30min, 56°C)	Invitrogen
Geneticin	100mg/ml G-418 Sulphat in Wasser; 1/100	Invitrogen

---

## Material

Glutamin	200mM Glutamin; 1/100 (Stocklösung)	Invitrogen
Laminin	10µg/ml (Endkonzentration), PBS	Invitrogen
Pferdeserum	hitzeinaktiviert (30min; 56°C)	Roche Diagnostics
Penicillin (Pen)	0,6% (w/v); 1/100 (Stocklösung)	Sigma; Invitrogen
Streptomycin (Step)	1,33% (w/v); 1/100 (Stocklösung)	Sigma; Invitrogen
Trypsin	189U/ml (Endkonzentration)	Worthington
Trypsin-Inhibitor	äquivalent zu Trypsin	Worthington

### 2.8.4 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Bezugsquelle
anti $\beta$ -Galactosidase	1/1000	Maus	Promega
anti-DIG FAB-Fragment	1/5000	Schaf	Roche Diagnostics
anti-Fluorescein	1/5000	Schaf	Roche Diagnostics
anti-GAG	1/100	Maus	Dev. Hybridoma Bank
anti-Human IgG Fc	1/20000 (Western) 1/200 (Färbung)	Ziege	Sigma
anti-Human IgG Fc-HRP	1/20000 (Western) 1/200 (Färbungen)	Ziege	Sigma
anti-LIFR $\beta$	1/500	Hase	Santa Cruz
anti-Maus IgG FITC	1/100	Maus	Dianova
anti-rabbit IgG Cy3	1/500	Ziege	Dianova
anti-VIP	1/100	Hase	Incstar

### 2.9 Bruteier

Die Bruteier des Haushuhns (*Gallus domesticus*) wurden vom Forsthaus Finkenloch (Nidda) bezogen. Zur Infektion mit RCAS(B) Retrovirus wurden virusfreie SPF-Bruteier der Firma Charles River eingesetzt.

## 3. Methoden

### 3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe verschiedener Methoden. Ausgangspunkt der Aufreinigung ist die Herstellung einer Bakterienflüssigkultur. Anschließend erfolgt die Freisetzung der Plasmid-DNA durch eine alkalische Lyse der Bakterien (Sambrook et al., 1989). Die bakteriellen Zelltrümmer und die an der Kernmembran verankerte DNA werden dann mittels Zentrifugation (11.000g, 5min) von der Plasmid-DNA getrennt. Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA kann entweder nach der klassischen alkalischen Lyse (3.1.1; Sambrook et al., 1989) oder mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (3.1.2) erfolgen.

#### *3.1.1 Klassische alkalische Lyse (Sambrook et al., 1989)*

Die alkalische Lyse nach Sambrook et al., (1989) ist eine Methode zur Isolierung kleiner Plasmid-DNA Mengen. Die isolierte Plasmid-DNA ist jedoch häufig nach der alkoholischen Fällung (3.3) noch durch bakterielle Proteine und Salze verunreinigt. Diese schnelle Methode bietet sich zur Präparation einer größeren Anzahl von Bakterienkolonien und folgender Restriktionsanalyse (3.5) an. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades der isolierten Plasmid-DNA kann eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2) vor der Ethanolfällung (3.3) durchgeführt werden. Die aufgereinigte DNA eignet sich im Anschluß daran für Sequenzierreaktionen.

#### *3.1.2 Plasmid-DNA Isolierung mittels Ionenaustauschchromatographie*

Diesem Verfahren liegt eine unterschiedliche Aufreinigungsmethode der Plasmid-DNA zugrunde. Hierbei wird die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse freigesetzt (Sambrook et al., 1989) und durch Zentrifugation von größeren bakteriellen Zellbestandteilen befreit. Die sich anschließende Ionenaustauschchromatographie führt zu einem hohen Reinigungsgrad der gewonnen Plasmid-DNA, da lediglich DNA-Moleküle an die Säulenmatrix gebunden werden. Die Präparation der DNA erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen und Promega). Die mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigte DNA eignet sich u.a. für Sequenzanalysen und zur Transformation von eukaryontischen Zellen.

### 3.2 Phenol/Chloroform-Extraktion (Brawermann et al., 1972)

Zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus der DNA-enthaltenden Lösung, wird die Phenol/Chloroform-Extraktion verwendet. Hierbei wird zum DNA-Proteingemisch 1 Volumen Phenol/Chloroform-Lösung (1:1) zugegeben und gut gemischt, bis sich eine weiße Emulsion gebildet

## Methoden

---

hat. Während der Zentrifugation bei 10000g (10min) bildet sich eine Interphase zwischen der wässrigen und der Phenol/Chloroform-Phase. Zellfragmente und Proteine verbleiben in der lipophilen Phenol/Chloroform-Phase bzw. der Interphase, während die DNA in der wässrigen Phase gelöst ist. Die DNA-haltige wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und mehrmals mit je 1 Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu beseitigen. An die Extraktion schließt sich eine Ethanolfällung (3.3) an.

### **3.3 Fällung von Nucleinsäuren (Shapiro, 1981)**

Mit Zugabe von Alkohol zu einer DNA- oder RNA-Lösung kann man in Anwesenheit hoher Konzentration monovalenter Kationen eine Aggregation der DNA bewirken und diese präzipitieren, hierbei verbleiben z.B. Oligonukleotide und Nukleotide in Lösung. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, eine Konzentrierung und Aufreinigung der DNA zu erreichen.

Zur Fällung der Nucleinsäuren wird die DNA- oder RNA-Lösung mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3M, pH5,2) versetzt und nach Zugabe von 2,5 Volumen absoluten Ethanol gut gemischt. Die Präzipitation der Nucleinsäuren erfolgt bei -20°C. Alternative kann die Fällung auch mit Isopropanol (0,7-faches Volumen) bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nach mindestens 30 Minuten wird die DNA durch Zentrifugation (25000g, 4°C; 30min) pelletiert. Im Anschluß daran wird das Pellet mit 70% (w/w) Ethanol gewaschen, getrocknet und in einer geeigneten Menge H<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren**

Die Konzentration von Nucleinsäuren (DNA oder RNA) wird photometrisch ermittelt. Grundlage dieser Messung ist das „Lambert-Beersche Gesetz“. Die Absorption der verdünnten Nucleinsäure-Lösung wird in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 und 280nm, gegen das Lösungsmittel gemessen. Ein Extinktionswert von 1 bei 260nm entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50µg DNA/ml, bei einzelsträngiger DNA von 33µg DNA/ml und bei RNA 40µg RNA/ml. Der Reinheitsgrad der Nucleinsäurelösung wird durch den Quotienten der Extinktionsmesswerte bei 260nm/280nm bestimmt. Für DNA-Lösungen soll der Quotient bei 1,8, für RNA-Lösungen bei 2,0 liegen.

### **3.5 Restriktionsverdau von Nucleinsäuren**

Für die Linearisierung von Plasmiden, Überprüfung von Ligationen und Kartierung von Konstrukten werden Restriktionsenzyme eingesetzt. Pro µg DNA werden 2-5 Units Restriktionsenzym benötigt. Die Standardkonzentration der DNA-Lösung sollte zwischen 40-150ng/µl liegen. Die Inkubationsdauer beträgt zwischen 2 bis 3 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur und entsprechenden Pufferbedingungen.

### 3.6 „Fill in“-Reaktion zur Herstellung glatter Enden

Für einige Klonierungsreaktionen werden glatte, doppelsträngige DNA-Enden benötigt. Die bei einigen Restriktionsverdau und PCR-Produkten auftretenden kohäsiven Enden (sticky ends) müssen aus diesem Grunde geglättet werden. Die „Fill-in“-Reaktion wird durch das Klenow-Enzym der DNA-Polymerase I aus *E. coli* katalysiert. Das Klenow-Enzym ist in der Lage, die überhängenden 5'-Enden zu komplementieren. 3'-überhängende Enden werden hingegen mit Hilfe der 3'-5'-Endonuklease-Aktivität des Enzyms abgedaut. Die Reaktion (<1µg Template) erfolgt in Mediumsalz-Puffer (z.B. Roche Diagnostics Restriktionspuffer M) mit einer Endkonzentration von 5mM dNTPs, mit 1U Klenow-Enzym in einem 20µl Ansatz (37°C, 30min). Im Anschluß wird das Enzym hitzeinaktiviert (70°C, 10min).

### 3.7 Kinasieren von DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden

Synthetisierte Oligonukleotide besitzen gewöhnlich keine 5'-Phosphatgruppe. Aus diesem Grunde lassen sich PCR-Produkte nur ineffizient subklonieren (3.16.3). Zur Vermeidung dieses Problems können die Oligonukleotide oder PCR-Produkte (3.16.1) mit Polynukleotidkinase (PNK) kinasiert werden. Das Enzym katalysiert den Transfer der endständigen Phosphatgruppe von dATP auf die 5'-Hydroxylgruppe eines DNA- oder RNA-Fragments (Richardson, 1965). Die Reaktion erfolgt in 1xPNK-Puffer (Amersham) mit 0,1mM dATP und 10U PNK, in einem Reaktionsvolumen von 30µl (30min, 37°C). Es werden bis zu 400ng Nukleinsäuren pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Polynukleotidkinase kann auch zur radioaktiven Endmarkierung von DNA-Fragmenten eingesetzt werden. Hierbei wird dATP durch [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP ersetzt.

### 3.8 Entfernung der 5'-Phosphatgruppe von DNA-Fragmenten

Die Behandlung eines linearen Vektors (3.5) mit alkalischer Phosphatase zur Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppen verringert den Anteil an rezirkularisiertem Plasmid bei einer Ligationsreaktion (3.11) und begünstigt die Klonierung des DNA-Fragments in den geöffneten Vektor (3.11). Nach dem Restriktionsverdau (3.5) wird die Plasmid-DNA mittels Ethanol präzipitiert (3.3) und in H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von Dephosphorylierungspuffer und 2U alkalischer Phosphatase wird der Ansatz inkubiert (37°C; 30min). Bei 3'-überhängenden Restriktionsschnittstellen empfiehlt sich, nach erneuter Zugabe von 2U alkalischer Phosphatase, eine zusätzliche Inkubation (56°C, 30min). Durch die erhöhte Temperatur wird dem Enzym der Zugang zum 5'-Ende erleichtert. Im Anschluß wird die DNA durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (3.10).

### 3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von geladenen Molekülen unterschiedlicher Größe mit Hilfe eines elektrischen Feldes (Meyers et al., 1976). Sie wird u.a. dazu verwendet, die Effizienz eines Restriktionsverdau (3.5) zu überprüfen, die Größen von DNA-Fragmenten zu bestimmen oder DNA-Fragmente aufzureinigen (3.10.1/2). Bei dieser Trennungsmethode macht man sich die Eigenschaft zu nutze, daß die negativ geladene DNA, in Abhängigkeit von ihrer Ladung und damit von ihrer Größe, unterschiedlich schnell im elektrischen Feld wandert (Sambrook et al., 1989). Zusätzliche Faktoren beeinflussen die Wanderung der DNA-Moleküle im Agarosegel. Hierzu gehören die Größen und Konfiguration der zu trennenden DNA-Moleküle, Pufferbedingungen, die angelegte Spannung und die Konzentration der Agarose. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle wandern antiproportional zum  $\log_{10}$  der Anzahl der Basenpaare in der Gelmatrix. Ringförmige DNA-Moleküle bewegen sich in Abhängigkeit zur Konfiguration, dabei bewegt sich die superhelikale Form schneller als die relaxierte Form.

Für die Auftrennung der DNA-Moleküle werden Agarosegele verwendet, deren Agarosekonzentration sich nach der Größe der zu analysierenden DNA richtet (Sambrook et al., 1989). Die entsprechende Agarosemenge wird in 1xTAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen sind. Nach dem Abkühlen der Agaroselösung (ca. 50°C) wird die Agarose in eine Flachbettkammer gegossen und der Kamm eingesteckt. Nachdem die Agarose festgeworden ist, wird die Gelkammer mit 1xTAE-Puffer gefüllt und der Kamm vorsichtig abgezogen. Zum Auftragen der Proben werden diese mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Die Größe der DNA-Moleküle wird mit Hilfe eines DNA-Längenstandards ermittelt. Die Elektrophorese wird mit 6-8V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Zur Analyse wird das Agarosegel anschließend in einem Ethidiumbromidbad (0,5µg/ml) gefärbt (15min). Abschließend wird das Gel auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 254nm fotografiert.

### 3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

#### 3.10.1 Stickstoff-Methode

DNA-Fragmente werden zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.9) und nach der Anfärbung mit Ethidiumbromid unter langwelligem UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wird mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. In den Boden und in den Deckel des Reaktionsgefäßes wird vorher mit einer dünnen Kanüle ein feines Loch gestochen. Nach Zugabe von ca. 100µl H<sub>2</sub>O wird das Gemisch in flüssigen Stickstoff eingefroren (mind. 15min). Anschließend wird das gefrorene Reaktionsgefäß in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (12000g, 15-45min, RT). In einem zusätzlichem Zentrifugationsschritt werden noch vorhandenen Agarosestücke pelletiert (25000g, RT). Der Überstand wird abgenommen, und die DNA wird mit Ethanol über Nacht gefällt (3.3).

### 3.10.2 Geleluation von DNA-Fragmenten nach Qiagen

Bei diesem Verfahren wird das ausgeschnittene Gelstück mit der DNA in einem Puffer (Qiagen) inkubiert (50°C). Dabei löst sich die Agarose und wird anschließend auf einer Säule, bestehend aus einer Kieselgelmatrix, abgetrennt. Nach den Waschschritten kann die DNA mit H<sub>2</sub>O eluiert werden. Alle Schritte erfolgen gemäß den Herstellerangaben.

### 3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Verknüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer benachbarten 3'-Hydroxylgruppe. Die verwendete T4-DNA-Ligase benötigt als Cosubstrat dATP.

Für eine Standard-Ligation werden 30-100ng eines linearisierten, dephosphorylierten Vektors und die 2-5 fache molare Menge an freien Termini des zu klonierenden DNA-Fragments eingesetzt. Die Ligation erfolgt unter den Pufferbedingungen des Herstellers (Invitrogen) unter Verwendung von T4-DNA Ligase (1U) in einem 10µl Ansatz über Nacht (gegebenenfalls mehrere Tage) bei 8°-16°C.

### 3.12 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

1l LB-Medium werden mit 1ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und auf einem Schüttler bei 37°C solange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,8 erreicht ist. Die Zellsuspension wird dann in einem Eisbad auf 4°C abgekühlt, bevor sie bei 4°C pelletiert wird (15min, 7000g, Sorvall, GSA-Rotor). Wichtig für alle folgenden Schritte ist die kontinuierliche Kühlung der Zellen auf 4°C. Im Anschluß an die Zentrifugation werden die Zellen wie folgt gewaschen (wobei nach jedem Waschschriff wie zuvor zentrifugiert wird): Nacheinander jeweils einmal mit 250ml und 125ml eiskaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O. Anschließend wird einmal mit 50ml eiskaltem Elektroporationsmedium (10% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O) gewaschen. Nach dieser Zentrifugation wird das Bakterienpellet in 2ml eiskaltem Elektroporationsmedium resuspendiert. Schließlich werden die kompetenten Zellen in 25µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.13 Elektrottransformation (Fiedler und Wirth, 1988)

Eingefrorene 25µl-Aliquots kompetenter E. coli Bakterien werden im Eisbad aufgetaut. Zu den Bakterien werden 1-2µl einer DNA-Lösung (2-200ng/µl) pipettiert und gemischt. Das Bakterien/DNA-Gemisch wird dann in eine vorgekühlte 0,2cm Elektroporationsküvette (Biorad) überführt und in die Pulschammer gestellt. Die Elektrottransformation erfolgt mit einem „Gene Pulser“ von Biorad, gemäß den Anweisungen des Herstellers. Hierbei wird der „Gene Pulser“ auf 2,5kV

(Feldstärke 12,5kV/cm) und der „Puls-Controller“ auf 200W eingestellt. Die Kapazität des Kondensators beträgt 25 $\mu$ F. Somit ergibt sich eine Pulsdauer von 5msec ( $200W \times 25\mu F = 5msec$ ). Nach dem Puls werden sofort 800 $\mu$ l LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die transformierten Zellen, in unterschiedlichen Konzentrationen, auf Selektionsplatten ausgestrichen und inkubiert (37°C, üN).

### 3.14 Vermehrung und Lagerung von Bakterienstämmen

Bei der Anzucht von Bakterienstämmen wird unter sterilen Bedingungen eine vereinzelte Bakterienkolonie von Agarplatte in frisches Nährmedium (mit geeignetem Antibiotikum) überimpft und in einem Schüttler kultiviert (37°C, üN).

Für die Lagerung von Bakterienkulturen bieten sich zwei verschiedene Verfahren an (Sambrook et al., 1989) :

- Agar-Stabs: Aus einer Übernachtskultur werden Bakterienzellen mit einer Impföse in einen Agarblock (1ml Stab-Agar, 1,5ml Schraubdeckelröhrchen) eingestochen. Die Kultur wird mit locker aufgeschraubtem Deckel inkubiert (37°C, üN) und ist mit geschlossenem Deckel etwa 2 Jahre im Dunkeln und bei Raumtemperatur lagerungsfähig.
- Flüssig-Stabs: 500 $\mu$ l einer Übernachtskultur werden mit 500 $\mu$ l steriler 30% (v/v) Glycerin-Lösung in einem Schraubdeckelröhrchen gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

### 3.15 „Bakterien-Lifting“ und „Dot-Blot“

Diese Methoden dienen der schnellen Identifizierung von positiven Klonen aus einer größeren Anzahl von Klonen. Bakterien oder gelöste DNA werden zunächst auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran transferiert. Beim „Bakterien-Lifting“ werden die einzelnen Klone auf die Membran ausgestrichen, im Falle eines „Dot-Blots“ wird die DNA-Lösung auf die Membran getropft. Dann werden die an der Membran locker gebundenen Moleküle denaturiert (0,5M NaOH; 1,5M NaCl; 2min), neutralisiert (1,5M NaCl; 1M Tris-HCL; pH 7,5; 5min) und die Membran kurz in 20xSSC gebadet. Die Fixierung an die Membran erfolgt durch UV-Bestrahlung („auto crosslink“, Stratalinker 2400, Stratagene) oder Inkubation (80°C, 2h).

#### 3.15.1 Markierung von DNA-Sonden

Für die radioaktive Markierung von DNA wird das Verfahren der „random primed“ DNA-Markierung nach Feinberg und Vogelstein (1983) angewendet. Das Verfahren beruht auf der Hybridisierung eines Gemisches von Hexanukleotiden zufälliger Sequenz an die zu markierende, hitzedenaturierte DNA

## Methoden

---

(5min, 96°C). Diese dient als Matrize für die Synthese des komplementären DNA-Stranges durch das Klenow-Enzym. Die Markierung erfolgt durch den Einbau von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP. Zur Markierung wird der „rediprime Random Primer Labelling“-Kit (Amersham) nach Herstellerangaben verwendet. Die Aufreinigung der radioaktiven Sonden erfolgt durch eine Gelfiltration mit Sephadex G-50 (Nick Column, Pharmacia Biotech) nach den Angaben des Herstellers.

### 3.15.2 Hybridisierung der Membranen

Bei Verwendung einer radioaktiven DNA-Sonde wird die Membran zunächst für vier Stunden bei der später verwendeten Hybridisierungstemperatur in DNA-Hybridisierungspuffer (ca. 50ml) vorinkubiert. Dies dient der Blockierung von unspezifischen Bindungen. Für die Hybridisierung wird eine hitzedenaturierte (5min, 96°C), radioaktive Sonde (3.15.1) zu den prähybridisierten Filtern hinzupipettiert. Die Hybridisierung erfolgt auf einem Schüttler (42°C, üN). Am folgenden Tag werden die Filter zunächst in Waschpuffer 1 (100ml) geschwenkt (20min, RT). Danach erfolgen zwei Waschschrte in Waschpuffer 2 (100ml): je 1 Stunde. Die Temperatur der Waschlösung richtet sich nach den Bindeeigenschaften der Sonde. Hochstringente Hybridisierungen werden bei 65°C, mittelstringente bei 60°C und niederstringente bei <55°C durchgeführt. Falls nach diesen Waschschrten der unspezifische Hintergrund (gemessen an einem Kontrollfilter) noch zu hoch ist, so werden die Filter zusätzlich in Waschpuffer 3 bei der entsprechenden Temperatur inkubiert (1h). Die Aufnahme des autoradiographischen Signals erfolgt in einer Expositionskassette (Du Pont) mittels eines Röntgenfilms (X-OMAT AR, Kodak). Die Expositionsdauer richtet sich nach der Stärke des radioaktiven Signals. In der Regel 3-4 Tage. Beim „Dot-Blot“ und „Bakterien-Lifting“ reichen 4 Stunden bis über Nacht. Die anschließende Entwicklung des Films erfolgt mittels eines automatischen Filmentwicklers (Kodak).

### 3.16 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR, Saiki et al., 1988) ermöglicht die enzymatische Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* durch eine Abfolge von Inkubationsschrten bei verschiedenen Temperaturen. Bei dieser Methode wird ein Oligonukleotidpaar, das den zu amplifizierenden Bereich flankiert (in sense und antisense Orientierung) an die denaturierte Matrize hybridisiert (annealing) und durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-DNA-Polymerase), aus „*Thermus aquaticus*“ elongiert (Elongation). Durch wiederholten Ablauf eines solchen PCR-Zyklus können DNA-Abschnitte  $10^5$ - $10^9$ -fach amplifiziert werden (Sambrook et al., 1989).

### *3.16.1 Standard PCR-Bedingungen*

1xPCR-Puffer, 0,2µM Nukleotidmischung (dATP, dCTP, dGTP,dTTP), je 50µM Primer, 10-100ng Template (für RT-PCR werden 1-2µl der Erststrangsynthese eingesetzt) und 2,5U Taq-DNA-Polymerase werden im Eisbad mit H<sub>2</sub>O auf 50µl aufgefüllt und gemischt. Zur Amplifikation werden 20-35 Zyklen aufeinanderfolgender Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsschritte durchgeführt (Perkin Elmer Thermal Cycler TC480). Die verwendeten Temperaturen und Inkubationszeiten richten sich nach der jeweiligen Matrize, der gewünschten Spezifität der Reaktion, der Hybridisierungstemperatur der Primer und der Länge der erwarteten PCR-Fragmente. Ein 5-minütiger Polymerisationsschritt bei 72°C schließt die Amplifikation ab. Zur Reduzierung unspezifischer Nebenprodukten wird der PCR-Ansatz vor Beginn der PCR hitzedenaturiert (1min, 96°C).

### *3.16.2 Direkte PCR auf Bakterien oder Zellen*

Hierzu werden 1-5µl einer Bakterienkultur bzw. Zellen in 50µl 70% Ethanol (w/w) aufgenommen und der Alkohol bei 95°C vollständig verdampft. Dann werden 50µl PCR-Ansatz zugegeben (3.16.1), gut gemischt und die PCR-Reaktion, bei den für das Reaktionsprodukt optimalen Bedingungen, durchgeführt (3.16.1).

### *3.16.3 Subklonierung von PCR-Fragmenten*

Ein 5µl Aliquot der PCR-Reaktion wird zunächst gelelektrophoretisch überprüft (3.9). Danach wird der PCR-Ansatz über Ionenaustauschchromatographie (Qiagen, nach Herstellerangaben) aufgereinigt. Sind geeignete Restriktionsschnittstellen in der amplifizierten Sequenz vorhanden oder die in der PCR eingesetzten Oligonukleotide mit Restriktionsschnittstellen versehen, so wird das Fragment mit den geeigneten Enzymen verdaut (3.5), gelelektrophoretisch aufgereinigt (3.10.1/2) und ligiert (3.11). Für eine „blunt-end-Ligation“ werden die Enden der PCR-Produkte geglättet (3.6), der Ansatz gefällt (3.3) und die 5'-Enden kinasiert (3.7). Das so behandelte PCR-Produkt wird gelelektrophoretisch aufgereinigt (3.10.1/2) und ligiert (3.11). Als Alternative wurde ein TA-Klonierungskit (pGem-T Easy Vector Systems, Promega) nach Herstellerangaben eingesetzt.

## **3.17 DNA-Sequenzanalyse**

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgt mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (ABI 373A DNA Sequencer) unter Verwendung eines Sequenzierkits nach Herstellerangaben (Dye Desoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer). Die „Annealing-Temperatur“ des Sequenzier-Primers läßt sich anhand der Formel:  $(C + G) \times 4 + (A + T) \times 2 - 5^{\circ}\text{C}$  abschätzen. Nach Abschluß der Amplifikation wird die Probe nach den Angaben des Herstellers aufbereitet. Die gelelektrophoretische Auftrennung

und die Speicherung der Daten erfolgen mit dem automatischen Sequenzer. Die Analyse und Aufarbeitung der Sequenzdaten erfolgte am Computer unter Verwendung des Herstellerprotokolls.

### **3.18 Bebrütung von befruchteten Hühnereier**

Befruchtete Hühnereier werden in einem Brutschrank bei 37°C und 70% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Tag des Einlegens wird als Embryonaltag 0 (E0) definiert.

### **3.19 Zellbiologische Methoden**

Für alle zellbiologischen Arbeiten werden immer sterile Lösungen, Medien, Gefäße, Pipetten und Pipettenspitzen verwendet. Es werden immer Handschuhe getragen, und alle Arbeiten werden an einem Reinstluftarbeitsplatz durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, werden alle Arbeiten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellinkubationen erfolgen im Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter 3%iger bzw. 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Alle Zellkulturösungen sollen, wenn nicht anders angegeben, eine Temperatur von 37°C aufweisen.

#### *3.19.1 Vorbereitung der Kulturschalen für neuronale Primärkulturen*

Zuerst werden die Vertiefungen („wells“) der Kulturschalen (4 well Schalen, Greiner) mit Poly-DL-Ornithin (PORN) in 0,15M Boratpuffer (pH8,3) beschichtet (mind. 12h, RT). Die so behandelte Fläche wird dann zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Danach sind die PORN-beschichteten Schalen bis zu 6 Wochen lagerungsfähig (4°C). Kurz vor der Verwendung der beschichteten Kulturschalen, werden diese mit Laminin (10µg/ml (w/v), 1xPBS) beschichtet (2h, RT), zweimal mit 1xPBS gewaschen und Kulturmedium in die „wells“ gefüllt.

#### *3.19.2 Präparation der sympathischen Ganglien*

Embryonen geeigneten Alters werden mit einer Schere dekapitiert, der Bauchraum geöffnet, die inneren Organe und die dorsale Aorta entfernt. Mit einer Pinzette seitlich an der Wirbelsäule entlang fahrend, werden die paravertebralen sympathischen Ganglien gelöst und können aus dem lumbosakral Bereich herauspräpariert werden. Von gegebenenfalls anhaftenden Geweberesten befreit, werden die sympathischen Ketten in steriler Glucoselösung (1mg/ml, PBS) gesammelt.

#### *3.19.3 Inkulturnahme sympathischer Neuronen*

Zunächst werden die Ganglien mit einer silikonisierten Pasteurpipette in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des Überstandes werden die Ganglien mit 1ml Trypsinlösung (Trypsin 1% (w/v), PBS) bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsdauer

## Methoden

---

richtet sich jeweils nach dem Alter der Embryonen. Für 7 Tage alte Embryonen beträgt die Inkubationszeit 25 Minuten. Durch Zugabe von Sojabohnen-Trypsininhibitor (Endkonzentration 0,02mg/ml) wird die Proteinaseaktivität gestoppt und freigesetzt, genomische DNA wird durch Zugabe von Desoxyribonuklease I (Endkonzentration 0,02mg/ml) verdaut. Danach werden die Ganglien zunächst zweimal mit Kulturmedium (MEM\*) gewaschen und dann in 1ml MEM\* aufgenommen. Die Dissoziation der sympathischen Ganglien zu Einzelzellen erfolgt durch Trituieren mit einer rundgeschmolzenen, silikonisierten Pasteurpipette in 1ml Kulturmedium. Nach Ermittlung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer werden für Transfektionsexperimente etwa 35000 Zellen pro „well“ ausgebracht.

### *3.19.4 Kulturbedingungen für verschiedene eukaryontische Zellen*

4. sympathische Neuronen: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in MEM\*-Medium.
5. HEK 293 Zellen: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in MEM-Medium (+10%FCS, 1% P/S, 1% Glutamin)
6. DF-1 Zellen: 37°C, 10% CO<sub>2</sub> in DMEM-Medium (+10% FCS, 1% P/S)
7. COS-7 Zellen: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in MEM-Medium (+10% FCS, 1% P/S, 1% Glutamin)

### *3.19.5 Lagerung und Rekultivierung eukaryontischer Zellen*

Zur Lagerung werden Zellen in einer 75cm<sup>2</sup> Kulturschale bis zur Konfluenz angezogen, trypsiniert und in 5ml eiskaltem Kulturmedium mit 10% DMSO (v/v) vorsichtig resuspendiert. Die Zellen werden über Nacht mit einer Gefrierbox bis auf -70°C gekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Rekultivierung erfolgt in serumfreiem, vorgewärmtem Medium. Hierbei werden die Zellen zügig aufgetaut, zentrifugiert (150g, 10min, RT) und das Pellet in 5ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen werden anschließend in eine Kulturschale (Ø 6cm) überführt und unter Standardbedingungen kultiviert.

### *3.19.6 Passagieren von eukaryontischen Zellen*

Konfluent gewachsene, adherente Zellkulturen müssen regelmäßig gesplittet und weiterkultiviert werden. Hierzu wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA Lösungen von der Zellkulturschale abgelöst. Der Trypsinverdau wird danach mit Zugabe von Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen können nun je nach Zelllinie verdünnt (1:4 - 1:8) auf neue Kulturschalen überführt werden.

## Methoden

---

### *3.19.7 Transfektion eukaryontischer Zellen.*

Um Plasmide in eukaryontische Zellen einzubringen, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Die Methode richtet sich nach dem verwendeten Zelltyp und der angestrebten Transfektionseffizienz.

Für DF-1 Fibroblasten, sowie HEK 293-Zellen hat sich die Verwendung von aktivierten Dendrimern (Tang et al., 1996) als sehr effektiv herausgestellt. Hierbei bindet die Plasmid-DNA an die Dendrimere, welche aktiv von den Zellen aufgenommen werden. In der Regel werden 5µg DNA in 150ml serumfreiem Medium aufgenommen. Danach werden 30µl Transfektionsreagenz (Superfect, Qiagen) zugegeben, gemischt und inkubiert (5min, RT). Eine zu 50-60% konfluente 6cm Zellkulturschale wird in der Zwischenzeit mit PBS gewaschen. Nach der fünfminütigen Inkubation wird dem Transfektionsansatz 1ml serumhaltiges Kulturmedium zugesetzt, kurz gemischt und auf die Kulturschale überführt. Die Zellen werden für 2-3 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Danach wird mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium (z.T. mit Selektionsantibiotikum) zugegeben.

Die Transfektion von COS-7-Zellen erfolgt mit dem Effectene Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben. Das Effectene Transfektions Reagenz ist eine nichtliposomale Lipidverbindung, die in Kombination mit einem DNA-Kondensationsenhancer verwendet wird. Bei dieser Methode werden die DNA-Moleküle zunächst über den Enhancer kondensiert. Das mitgelieferte Effectene Reagenz bewirkt eine partielle Umhüllung der DNA mit kationischen Lipiden und ermöglicht die effektive Aufnahme von DNA in eukaryontischen Zellen.

Für sympathische Neuronen hat sich die Ca-Phosphat-Methode bewährt. Die erzielte Transfektionseffizienz beträgt in der Regel ca. 1:1000.

Sympathische Neuronen werden hierzu präpariert (3.19.1/2) und in einer Dichte von ca. 35000 Zellen/well ausgesät (3.19.6). Danach werden die Zellen mindestens zwei Stunden lang kultiviert (3.19.4), damit sie sich absetzen und sich von der Trypsin-Behandlung (3.19.6) erholen können. Für die Transfektion werden 18µg Plasmid-DNA und gegebenenfalls 2µg Markerplasmid in einem Gesamtvolumen von 75µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zu dieser Lösung werden 25µl 1M CaCl<sub>2</sub> und 100µl BBS (pH6,91-6,95) zugegeben, gemischt und inkubiert (10min, RT). Vor der Transfektion werden die Kulturschalen mit Transfektionsmedium (MEM+0,5% (v/v) Serum) zweimal gewaschen, 1,8ml Transfektionsmedium werden zugegeben, das DNA-Calzium-Präzipitat wird der Kultur zugetropft und sorgfältig verteilt. Die Transfektion erfolgt in einem Zellkulturinkubator (37°C, 3% CO<sub>2</sub>, 6-8h). Danach werden die Kulturen zweimal mit MEM\*-Medium gewaschen und inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### *3.19.8 Herstellung klonaler und stabiler exprimierender HEK 293-Zelllinien zur Expression von Rezeptorfusionsproteinen*

Hierzu werden HEK 292-Zellen mit geeigneten eukaryontischen Expressionsvektoren (z.B. pFc-LIFRβ, pFc-gp130) transfiziert (3.19.7) und anschließend mit antibiotikumhaltigem Medium (1mg/ml Geneticin) kultiviert. Nach zwei Wochen werden am Mikroskop isolierte Einzelklone mit einer Pipette

## Methoden

---

abgesaugt und in einer 96 Well-Schale überführt. Nur Zellen, die die Plasmidinformation und somit auch die Antibiotika-Resistenz in ihr Genom integriert haben, überleben den Geneticin-Selektionsdruck. Anschließend können Überstände der klonalen Kulturen über Mini-Ni-2<sup>+</sup>-Säulen (Qiagen) aufgereinigt (3.22.9/10) und im Silber-gefärbten SDS-Acrylamidgel (3.22.2/4) analysiert werden.

### *3.19.9 Herstellung von hängenden DF-1-Fibroblastenaggregaten*

Eine konfluent gewachsene Fibroblastenkultur (75cm<sup>2</sup> Kulturflasche) wird durch Zugabe von 2ml Trypsin-EDTA vereinzelt (3.19.6), der Verdau mit 10ml Kulturmedium abgestoppt und zentrifugiert. Schließlich wird das Zellpellet in 500-700µl Kulturmedium resuspendiert. Danach werden jeweils 60µl der Zellsuspension in Form von Tropfen unter den Deckel einer Kulturschale vorsichtig angehängt. In die Kulturschale wird zusätzlich Kulturmedium zugegeben. Nach Inkubation haben sich jeweils Aggregate am Kegel jedes Tropfen gebildet (üN). Die großen Aggregate können nun je nach Bedarf verkleinert und für die Implantationen proportioniert werden.

### *3.19.10 Implantationen von Zellaggregaten in Hühnerembryonen*

Die virusfreien befruchteten Hühnereier werden in waagerechter Position 48 Stunden im Brutschrank (37°C, 65% Luftfeuchtigkeit) bebrütet. Die Eierschale wird mit 70% (v/v) alkoholischer Lösung desinfiziert. Mit einer sterilen Kanüle werden etwa 3,5ml Eiweiß entnommen. Dann wird die Oberseite des Eies mit transparentem Klebeband (Scotch) sorgfältig abgeklebt. An dieser Stelle wird mit einer Feinschere ein Loch von etwa 1,5-2cm Durchmesser geschnitten, so daß man von oben auf den Embryo sehen kann. Mit einer feinen Glaskapillare wird Tuschelösung (Pelikan, schwarz) unter den Embryo injiziert. Die Vitellinmembran wird oberhalb der Implantationsstelle mit einem Augenskalpell eingeschnitten. Der Einschnitt erfolgt auf Höhe der Somiten 18-23 zwischen Rückenmark und Somit. Er umfaßt maximal den Bereich zwischen zwei benachbarten Somiten. Ein oder zwei Fibroblastenaggregate (3.19.9) der gewünschten Größe (etwa 1/4 Somit) werden mit einer sterilen Pinzette in die Nähe der Implantationsstelle gebracht und mit sterilen Stahlnadeln in die Öffnung gedrückt. Im Anschluß werden 400µl Antibiotikumlösung (1% Pen, 1% Strep in PBS) auf die Vitellinmembran pipettiert und die Öffnung der Schale mit Klebeband verschlossen. Die behandelten Embryonen werden im Brutschrank inkubiert (3.18).

### 3.20 Immunfärbungen

#### 3.20.1 Immunfärbung kultivierter Zellen

Zuerst wird das Medium aus den Schalen entfernt und die Zellen einmal mit KRH gewaschen (RT). Danach werden die Zellen mit Paraformaldehyd-Lösung (4% (w/v) PA, PBS) fixiert (15min, RT). Anschließend werden die fixierten Zellen mit PBT1 gewaschen und im gleichen Puffer permeabilisiert (15min, RT). Der Erstantikörper wird, in PBT1 verdünnt, zugegeben und inkubiert (40min, RT). Zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern werden die Zellen jeweils zweimal mit PBT1 und PBT2 gewaschen. Die Zugabe des fluoreszenzmarkierten Antikörpers erfolgt in PBT2. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten wird nicht-gebundener Zweitantikörper durch jeweils zwei Waschschritte mit PBT2 und PBS entfernt. Schließlich werden die Präparate für die mikroskopische Auswertung mit 50% (v/v) Glycerin in PBS eingedeckt.

#### 3.20.2 Immunfärbung auf Kryoschnitten

Die Gefrierkryoschnitte (3.21.1/2) werden zunächst auf Raumtemperatur angeglichen. Anschließend werden die Objektträger mit einem Fettstift (PAP PEN, SCI Science Services) eingerahmt, damit die aufgetragene Flüssigkeit an den Ränder nicht ablaufen kann. Die Objektträger werden für 2 Stunden blockiert (jeweils 500µl PBS, 0,1% (v/v) Tween und 10% (v/v) Serum). Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgt in PBS, 0,1% (v/v) Tween, 10% (v/v) Serum (üN, RT). Am nächsten Tag werden die Objektträger mit PBS, 0,1% (v/v) Tween in einer Küvette gewaschen (1h, RT). Der fluoreszenzmarkierte Antikörper wird in 0,1% (v/v) Tween-PBS verdünnt und auf den Schnitten inkubiert (30min, RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Objektträger mit jeweils 30µl 50% (v/v) PBS/Glycerin eingedeckt.

### 3.21 In situ-Hybridisierung

#### 3.21.1 Präparation und Fixierung von Embryonen

Hühnerembryonen des gewünschten Alters werden dekapitiert, Haut und die inneren Organe werden entfernt. Anschließend werden die Extremitäten und die Rippen (etwa 0,2-0,5cm von der Wirbelsäule entfernt) abgeschnitten. Der so präparierte Embryo wird in sterilem PBS gewaschen und danach in Paraformaldehydlösung (4% (w/v) Paraformaldehyd; 0,1M Phosphatpuffer) fixiert (4°C, üN). Nach der Fixierung werden die Präparate mit 15% (w/v) Saccharose (0,1M Phosphatpuffer) entwässert (mind. 24h) und zuletzt mit Tissue-Tek (Sakura Finetek) eingebettet. Das eingebettete Gewebe wird bei -20°C gelagert.

### *3.21.2 Anfertigen von Gefrierschnitten*

Die vorbehandelten Präparate (3.21.1) werden mit einem Kryostaten (Jung Frigocut 2800E) in einer Schnittdicke von 14µm geschnitten und auf Super Frost Plus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgenommen. Nach dem Trocknen (1h, 37°C) sind die Präparate fest an die Objektträger gebunden. Die so behandelten Präparate werden bei -20°C gelagert (bis zu 2 Monate verwendbar). Längere Lagerungszeiten können durch Einfrieren bei -70°C erreicht werden.

### *3.21.3 Sondensynthese für die In situ-Hybridisierung*

20µl Plasmid-DNA werden restriktionsverdaut (3.5). Ein Aliquot davon wird gelelektrophoretisch überprüft (3.9). Nach Feststellung des vollständigen Verdaus wird die Plasmid-DNA mittels PCR-Purifikation Kit (Qiagen) aufgereinigt, in RNase freiem Wasser aufgenommen. Die DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt (3.4). Die RNA-Synthese mit digoxigeninmarkierten UTPs (DIG RNA-labelling Kit, Roche Diagnostics) erfolgt nach Herstellerangaben. Die RNA-Probe wird mit Quick-Spin-Säulen (Roche Diagnostics) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### *3.21.4 Kontrolle der markierten RNA-Proben über einen „Spot-Assay“*

Die synthetisierten Proben (3.21.3) werden verdünnt (pur, 1:10, 1:100, 1:1000) auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Membran (Pharmacia) aufgetropft und über UV-Bestrahlung („auto crosslink“, Stratalinker 2400, Stratagene) mit der Membran vernetzt. Dann wird mit MAB gewaschen (5min) und danach mit MAB/20% (v/v) Hühnerserum blockiert (1h, RT). Die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper (1:5000-10000) erfolgt in MAB/20% (v/v) Hühnerserum (1h, RT). Nach einmaligem waschen in MAB (30min) und in AP-Puffer (5min) erfolgt die Färbereaktion für 5-10Minuten. Im Anschluß wird mit MAB gestoppt und mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

### *3.21.5 Durchführung der In situ-Hybridisierung*

Die tiefgefrorenen Kryostatenschnitte werden zunächst auf Raumtemperatur angeglichen. In der Zwischenzeit werden die DIG-markierten RNA-Sonden in Hybridisierungspuffer verdünnt (1:100) und denaturiert (10min, 70°C). Pro Objektträger werden 100µl der denaturierten Sonde eingesetzt, mit einem hitzesterilisierten Deckglas (200°C, 12h) eingedeckt und in einer feuchten Kammer (Waschpuffer) inkubiert (65°C, üN). Das Deckglas wird abgeschwemmt, und die Objektträger werden unter stringenten Bedingungen in einer Glasküvette gewaschen (Waschpuffer, 1h, 65°C). Die Objektträger werden in eine mit MABT gefüllte Glasküvette überführt und inkubiert (1h, RT). Zur Blockierung unspezifischer Bindungen für die folgende Antikörperdetektion werden die Schnitte mit 300µl Blockpuffer (MABT, 20% (v/v) CHS) eine Stunde lang behandelt. Der Anti-DIG-Antikörper (Roche Diagnostics) wird 1:5000 in Blockpuffer verdünnt und 1 Stunde auf Eis vorinkubiert. Auf

## Methoden

---

jeden Objektträger werden 100µl dieser Antikörperlösung pipettiert. Die Objektträger werden mit einem sterilem Deckglas abgedeckt. Die Bindung des Anti-DIG-Antikörpers (Roche Diagnostics) erfolgt in einer feuchten Kammer (H<sub>2</sub>O) (RT, üN). Überschüssiger Antikörper wird mit MABT entfernt (90min, RT, Glasküvette), und der Objektträger wird 2 mal mit AP-Puffer gewaschen (10min, RT). Für die Farbreaktion wird die NBT/BCIP-Stocklösung (Roche Diagnostics) in AP-Puffer im Verhältnis 1/100 verdünnt und auf jeden Objektträger (120µl) aufgetragen. Zur Vermeidung eines unspezifischen Präzipitats, das durch Reaktion mit dem Luftsauerstoff erfolgen kann, werden die Präparate mit einem Deckglas abgedeckt. Die Farbreaktion erfolgt in einer lichtundurchlässigen, feuchten Kammer (H<sub>2</sub>O) für mehrere Stunden (ggf. über Nacht). Die Farbreaktion wird mit PBS abgestoppt, und die Objekte werden mit Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckt.

### 3.21.6 Doppel-*In situ*-Hybridisierung

Das Protokoll entspricht dem der einfachen *In situ*-Hybridisierung auf Schnitten (3.21.5), wobei allerdings eine DIG-markierte und eine Fluorescein-markierte cRNA-Probe gleichzeitig hybridisiert werden. Nach dem Waschvorgang und der Blockierung entsprechend dem Standardprotokoll wird anti-Fluorescein AP (1:250, Roche Diagnostics) in MABT/20% (v/v) CHS appliziert und inkubiert (RT, üN). Danach wird mit MABT gewaschen (3x20min). In der Zwischenzeit wird eine Fast Red-Tablette in 2ml 0,1M Tris (pH8,2) gelöst und steril filtriert. Danach werden die Objektträger mit 0,1M Tris (pH8,2) gewaschen (2x10min). Anschließend erfolgt die 1. Färbereaktion unter Luftausschluß mit 100µl Fast Red-Lösung. Hierzu werden die Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt. Die Farbreaktion läuft in der Regel innerhalb der ersten sechs Stunden ab. Sie kann aber unter Umständen auch über Nacht erfolgen. Danach werden die Objektträger kurz in PBS gewaschen (Glasküvette) und zum Photographieren mit 30µl 50% (v/v) PBS/Glycerin abgedeckt. Im Anschluß daran wird das Deckglas abgeschwemmt. Die Objektträger werden abgetrocknet und mit 300µl PBS gewaschen. Das Strippen des Erstantikörpers erfolgt durch Waschen in 0,1M Glycin (pH1,8; 3x10min). Nach 2x30 Minuten Waschen in MABT und 30 Minuten in MABT/20% (v/v) CHS erfolgt die Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper (1:1000-5000, üN, RT). Die Farbreaktion am nächsten Tag erfolgt wie beschrieben mit NBT/BCIP und kann unter Umständen mehrere Tage dauern.

### 3.21.7 Morphometrische Analyse

Mittels morphometrischer Analyse sollte die Anzahl von Neuronen pro Flächeneinheit des Ganglions bzw. das Verhältnis unterschiedlicher neuronaler Populationen zueinander ermittelt werden.

Zuerst wurde in alternierenden Kryoschnitten die mRNA-Expression für RT, VIP, ChAT und SCG10 über *In situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Anschließend wurde die Anzahl VIP-positiver und ChAT-positiver Zellen in den sympathischen Ganglien gezählt. Auf einem weiteren alternierenden Gewebsschnitt wurde die Fläche der SCG10-mRNA Expression bestimmt. Die Ausmessung der

Fläche erfolgte mit der Metamorph Imaging System-Software (Version 4.0, Universal Imaging Corporation). Zuletzt wurde die Anzahl der VIP-positiven und ChAT-positiven Zellen auf die SCG10-positive Fläche bezogen und als Anzahl VIP<sup>+</sup> oder ChAT<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> dargestellt.

### 3.22 Biochemische Methoden

#### 3.22.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Lowry 1951, Bradford, 1976)

Proteinbestimmungen werden mit fertigen Proteinbestimmungs-Kits (Bio-Rad) durchgeführt. Für Detergentien-freie Proteinlösungen wird ein Bio-Rad Protein Assay verwendet, der auf der Methode von Bradford (1976) basiert. Für Detergentien-haltige Lösungen wird ein Bio-Rad DC Protein Assay nach Lowry (1951) eingesetzt. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

#### 3.22.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen werden in der Regel SDS-Acrylamidgele verwendet. Durch vorheriges Aufkochen der Proben in SDS-haltigem Puffer werden die Proteine denaturiert. Ggf. werden die Proteine dabei durch Zugabe von Reduktionsmittel (z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol) reduziert. Sie erhalten durch Anlagerung von SDS eine negative Ladung. Somit können sie im Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Es werden Trenngele zwischen 6% und 15% Polyacrylamid verwendet. Für das Sammelgel werden immer 4% Acrylamid eingesetzt. Da es weniger dicht vernetzt ist und einen niedrigeren pH-Wert besitzt, erhält man mit diesem diskontinuierlichen Gelsystem sehr scharfe Probenbanden (Gabriel, 1971).

Nach Zugabe von TEMED (Katalysator) und APS (Radikalstarter) wird die Trenngellösung in die Gelgießkammer gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Auspolymerisierung wird das Isopropanol abgezogen und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wird das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingesteckt. Die Proben (bis 5 $\mu$ g Protein Spur) werden mit 1/4 Volumen 4x Probenpuffer versetzt, aufgeköcht (10min, 95°C) und anschließend auf Eis gehalten. Zur Größenabschätzung wird ein Probenmarker mit aufgetragen. Soll anschließend ein „Western-Blot“ (3.22.5) durchgeführt werden, so sollte ein farbmarkierter Proteinstandard (2.2) verwendet werden. Die Elektrophorese wird in 1x TGS und einer Spannung von 200V durchgeführt.

#### 3.22.3 „Coomassie-Blue-Färbung“ von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Für eine „Coomassie-Blue-Färbung“ wird das Gel in Coomassie-Blue R-250 (0,1%) in Fixativ (40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig inkubiert (30min) und anschließend in mehrfachen Waschrufen mit Fixativ entfärbt, um den Hintergrund zu entfernen (normalerweise 1 bis 3h, 3x). Das gefärbte Proteingel wird auf Whatmanpapier übertragen und im Vakuumtrockner getrocknet (2h).

### *3.22.4 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Meril et al., 1981)*

Zum Anfärben von Proteinen in Acrylamidgelen eignet sich, neben der Färbung mit „Coomassie-Blue“ (3.22.3), die Färbung mit Silbernitrat. Der Vorteil besteht in der größeren Sensitivität dieser Methode, die den Nachweis von weit weniger als einem  $\mu\text{g}$  Protein ermöglicht. Das Gel wird in Fixierpuffer 1 fixiert (mind. 20min). Danach wird in Fixierpuffer 2 gewaschen (3x10-15min). Anschließend wird das Gel in Farmers-Reagenz inkubiert (1-2min). Das Gel wird danach so oft mit Wasser gewaschen (etwa 5x 3min), bis es wieder klar und transparent erscheint. Im Anschluß wird in 0,012 M Silbernitratlösung inkubiert (30min). Diese wird danach verworfen. Das Gel wird mit Wasser gespült. Nun wird solange in Entwicklerlösung inkubiert, bis Proteinbanden sichtbar werden. Die Reaktion wird mit 1%iger Essigsäure abgestoppt (10-30min). Das Gel wird in Wasser gewaschen (1-2h) und ggf. getrocknet.

### *3.22.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Kyhse-Andersen, 1984)*

Die „Western-Blot Methode“ ermöglicht es, Proteine, die mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.22.2) aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu transferieren, um diese anschließend mit Hilfe von immunologischen Methoden (3.22.7) zu analysieren. Zum Transferieren wird eine Naßgelkammer (Biometra) verwendet. Das Polyacrylamidgel wird auf drei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapierlagen aufgelegt. Darauf kommt eine in Transferpuffer getränkte Nylonmembran, gefolgt von drei weiteren Lagen getränkten Whatmanpapiers. Der Transfer erfolgt mit einer Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  für 60-90 Minuten.

### *3.22.6 „Ponceau S-Färbung“ (Harlow and Lane, 1988)*

Zur Mengenabschätzung der transferierten Proteine auf der Nylonmembran, kann eine „Ponceau S-Färbung“ durchgeführt werden. Hierbei wird die Membran in „Ponceau S-Färbelösung“ inkubiert (5min). Falls notwendig kann nun der Größenstandard nachgezeichnet werden. Die anschließende Entfärbung des roten Signals erfolgt durch mehrfaches Waschen mit Wasser.

### *3.22.7 Immunodetektion von Proteinen auf Membranen*

Sollen auf Membranen geblottete Proteine (3.22.5) identifiziert werden, oder sollen spezifische Mengenbestimmung (Dot blot) von Proteinen durchgeführt werden, so wird ein Immunnachweisverfahren eingesetzt. Die Membran wird in Blockpuffer inkubiert (1xTBST-Puffer mit 5% Milchpuffer, 60min, RT). Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Danach wird die Membran mit dem Erstantikörper in Blockierungspuffer inkubiert ( $4^\circ\text{C}$ , üN). Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST (10-15min) wird der Zweitantikörper (z.B. HRP-gekoppelt) in Blockierungspuffer verdünnt, zugegeben und inkubiert (1h, RT). Nach dreimaligem

## Methoden

---

Waschen mit TBST (10-15min) wird abschließend mit TBS gewaschen (5min), um Detergentien zu entfernen. Um den gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wird ein Chemolumineszenzverfahren (Supersignal, Pierce) angewandt. Das Enzym „Horseradish Peroxidase“ (HRP) setzt dabei ein Substrat um, welches bei diesem Vorgang Licht emittiert. Das emittierte Licht kann über einen aufgelegten Röntgenfilm (Kodak Biomax) nachgewiesen werden.

### 3.22.8 „Strippen von Western-Blot Membranen“

Damit eine „Western-Blot Membran“ für einen weiteren Antikörper verfügbar ist, müssen bereits gebundene Antikörper wieder von der Membran entfernt werden (strippen). Hierzu wird die Membran 4x mit 0,2M Glycin (pH2,9) behandelt (10min, 37°C). Um die Stringenz zu erhöhen, können SDS (0,1M) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1%) zugegeben werden. Anschließend wird mit TBST-Puffer gewaschen (2x5min). Danach ist die Membran für eine weitere Immunodetektion von Proteinen verwendbar (3.22.7).

### 3.22.9 Aufreinigung von Rezeptorfusionsproteinen durch Affinitätschromatographie

Rezeptorfusionsprotein-enthaltende Überstände (gewöhnlich 200-250ml) werden in 3 Volumen PBS mit Proteaseinhibitoren (Complete Protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics) verdünnt und filtriert (45 $\mu$ m Filter). Eine 1ml Protein-A-Sepharose-Säule (Pharmacia) wird zunächst mit PBS equilibriert und gewaschen. Die verdünnten Zellüberstände werden anschließend auf die Säule gepumpt (1-1,5ml/min) und dann mit 25 Säulenvolumen PBS gewaschen. Danach wird solange mit PBS gewaschen, bis die UV-Absorption des Eluats wieder auf die Basislinie zurückgekehrt ist (i.d. Regel 20 Säulenvolumen). Die Eluation erfolgt anschließend mit 0,2M Glycin, pH3. Alle Fraktionen des Eluats werden mit 1M Tris-HCl (1/5Vol, pH7,4) abgepuffert und in Dialysekassetten (Pierce) gegen PBS dialysiert. Danach wird die Konzentration bestimmt (3.22.1).

### 3.22.10 Aufreinigung von HIS-Tag-markierten Rezeptorfusionsproteinen

In HEK293-Zellen exprimierte Rezeptorfusionsproteine (3.19.8) werden zuerst an einer Protein A-Säule aufgereinigt (3.22.9). Dabei werden sowohl homodimere, als auch heterodimere Rezeptorfusionsproteine isoliert. Zur Aufreinigung von heterodimeren und homodimeren Histidin (HIS)-markierten Rezeptorfusionsproteinen wird eine Ni<sup>2+</sup>-Sepharosematrix verwendet. Heterodimere Rezeptorfusionsproteine (LIFR $\beta$ -Fc/gp130-Fc) besitzen einen einzigen HIS-Tag, wohingegen Homodimere entweder keinen (LIFR $\beta$ -Fc/LIFR $\beta$ -Fc) oder zwei HIS-Tags (gp130-Fc/gp130-Fc) besitzen. Bei diesen Verfahren wird auf der Säule gebundene LIFR $\beta$ -Fc/gp130-Fc und gp130-Fc/gp130-Fc von Homodimer LIFR $\beta$ -Fc/LIFR $\beta$ -Fc abgetrennt. Die Rezeptorfusionsproteine werden mit dem gleichen Volumen Puffer (300mM NaCl, 50mM Phosphat, pH7,3) verdünnt und auf eine Ni<sup>2+</sup>-Sepharosesäule (1ml, Qiagen) gegeben, die mit Puffer A equilibriert wurde. Anschließend wird

## Methoden

---

mit jeweils 8-10 Säulenvolumen Puffer B, C, D bzw. E gewaschen. Dabei wird der pH-Wert stufenweise von 7,3 auf 4,9 erniedrigt. Die gesammelten Fraktionen werden mit 1M Tris (pH7,3) abgepuffert, anschließend aufkonzentriert (Centricon 30kD, Amicon) und mittels Dialysekassetten (Slide-A-Lyzer, Pierce) umgepuffert. Zum Schluß erfolgt die Analyse der Fraktionen mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese.

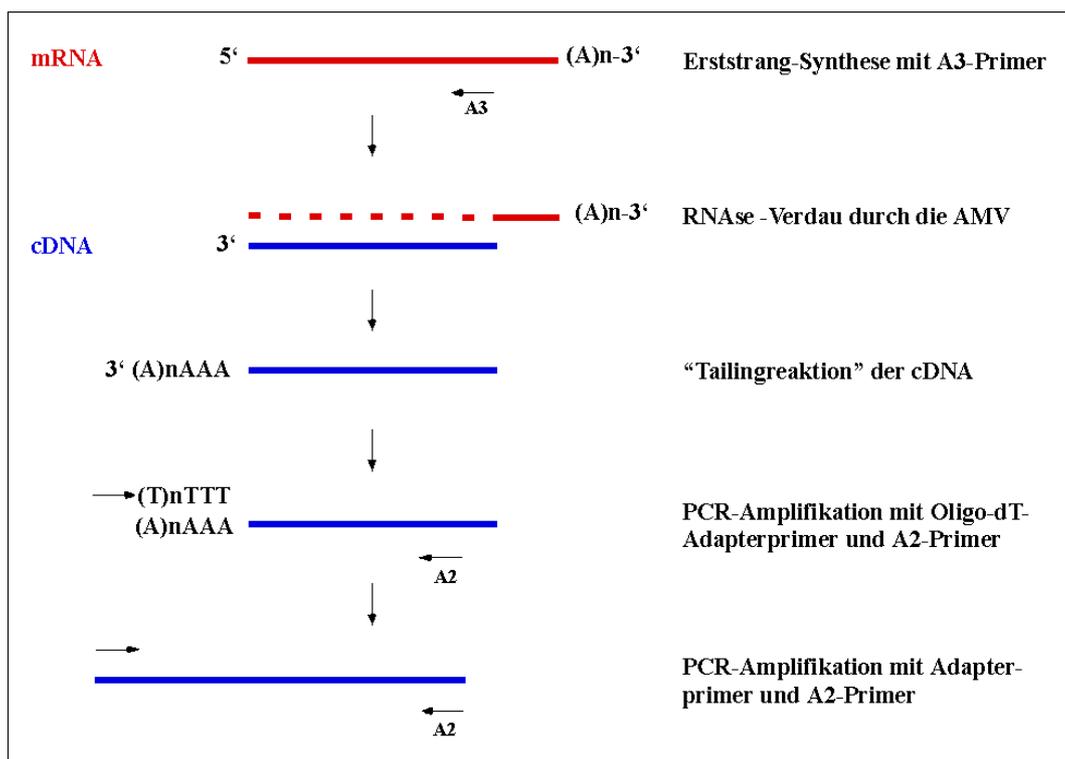
### *3.22.11 DAB-Färbungen auf Kulturen mit Rezeptorfusionsproteinen*

In 10cm Schalen transfizierte COS-7-Zellen (3.19.7) werden 1x mit PBS gewaschen und in 1,8% (w/v) Paraformaldehyd/PBS fixiert (15min). Danach wird kurz 2x mit PBS gewaschen. Die anschließende Inkubation mit Methanol, 0,3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dient der Inaktivierung von endogenen Peroxydasen (30min). Nach 2x Waschen mit PBS wird mit Blockierungspuffer (0,2% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) Eseserum, 10% (v/v) Kälberserum in PBS) blockiert (30min). Aufgereinigte Rezeptorfusionsproteine (3.22.9/10) werden 1:50-1:100 in Blockierungspuffer verdünnt und inkubiert (4°C, üN). Am nächsten Tag wird 4x mit Blockierungspuffer gewaschen und zusammen mit dem Zweitantikörper (anti-IgG, HRP, 1:200) inkubiert (1h, RT). Nach 3x Waschen in 0,1M Trisphosphatpuffer (pH7,8) erfolgt die DAB-Färbereaktion in Färbepuffer (50µl DAB-Substrat, 1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), 2,5ml 0,1M Trisphosphatpuffer). Nach 5-10 Minuten wird die Färbereaktion mit 0,1M Trisphosphatpuffer abgestoppt und 2x mit PBS gewaschen. DAB-gefärbte Zellen können nun von der Kulturschale abgepickt und analysiert werden. Zur Analyse bietet sich zum einen die PCR-Methode (3.16.2) bzw. die Isolierung der Plasmid-DNA an. Für die Isolierung der Plasmid-DNA werden DAB-positive COS7-Zellen direkt in Lysispuffer (100mM EDTA, 10mM Tris, pH8, 0,1% (w/v) SDS, 200 µg/ml Proteinase K) aufgenommen und verdaut (56°C, üN). Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt über Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2). Anschließend wird die Plasmid-DNA in Bakterien elektroporiert (3.13). Einzelne Klone werden isoliert und über Sequenzanalyse identifiziert (3.17).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vervollständigung der Huhn-LIFR $\beta$ über 5'-RACE

In vorangegangenen Arbeiten von Markus Geissen (Geissen, Doktorarbeit 1998) und Chi Vinh Duong (Duong, Diplomarbeit 1999) zur Ermittlung von Huhn LIFR $\beta$  war es nicht gelungen, den gesamten kodierenden Bereich zu klonieren. Am 5'-Ende fehlten etwa 300bp bis zum Translationstartpunkt der bekannten LIFR $\beta$ -Sequenzen von Maus und Menschen. Zur Vervollständigung dieses offenen Leserahmens wurde eine 5'-Race auf eine cDNA durchgeführt, die aus Leber von 9 Tagen alten Hühnerembryonen (E9) gewonnen wurde (Abb.8).



**Abb.8 Schematische Darstellung der 5'-RACE.** Hierzu wurde aus 9 Tage alten Embryonen die Leber präpariert, Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Synthese der LIFR $\beta$ -spezifischen cDNA erfolgt unter Verwendung des 5'/3' RACE Kit (Roche Diagnostics) mit dem antisense LIFR $\beta$ -spezifischen Primer A3 (2.5). Nach der cDNA-Aufreinigung wird über eine „Tailing-Reaktion“ ein Poly-A Schwanz mit Hilfe einer terminalen Transferase angefügt. Die Amplifikation des unbekannte LIFR $\beta$ -Fragments erfolgt dann über einen Adapter-enthaltenden Oligo dT-Primer und den weiter in Richtung 5' gelegenden Primer A2. In einer zweiten PCR-Reaktion wird ein weiteres Fragment über den „Adapterprimer“ und den A2 Primer amplifiziert (2.5). Das somit erhaltene Fragment wird über die EcoRV-Schnittstelle in den pBluescript subkloniert (3.16) und durch Sequenzanalyse (3.17) verifiziert.

Es wurde ein Fragment mit der Länge von 650bp gefunden. Die Sequenz überlappt in 200bp mit der bereits bekannten Sequenz und enthält weitere 450bp, unter anderen den Translationsstartpunkt.

Zur Auswertung der Sequenzdaten wurde das Mac Vektor-Programm, das „Gapped blast“ und „PSI blast“-Programm von NCBI (National Center for Biotechnology Information, Internet-Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hinzugezogen.

Die auf diese Weise über den Translationsstart vervollständigte Huhn LIFR $\beta$  cDNA-Sequenz umfaßt 4114bp. Der abgeleitete offene Leserahmen kodiert für 1083 Aminosäuren. Die Protein-Sequenz ist zu 51% identisch mit der Human-Sequenz und zu 49% identisch mit der Maus-LIFR $\beta$ -Sequenz (Gearing et al., 1991). Zu den Säuger-OSMR $\beta$ -Sequenzen besteht nur eine geringe Homologie (32%, Mensch (Mosley et al., 1996) und 31%, Maus (Tanaka et al., 1999)). Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz enthält alle für die gp130-Rezeptorfamilie beschriebenen konservierten Sequenzmotive.

Eine hydrophobe N-terminale Sekretionssequenz (1-24AS) ist vorhanden, die mittels der vorhergesagten Proteaseschnittstelle (VHS-RE) abgespalten werden könnte. Im extrazellulären Bereich befinden sich zwei konservierte Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS)-Motive, wie sie für die Säuger-LIFR $\beta$ -Rezeptoren beschrieben worden sind (Abb.9, Bazan 1990). Des Weiteren existieren 17 mögliche N-verknüpfte Glykosylierungsschnittstellen (NXT/NXS) und zwei Regionen mit hoher Homologie zu fn3-Domänen (Computer-Vorhersage). Die Cystein-Reste befinden sich an den konservierten Positionen. In der Transmembrandomäne sind 16 von 22 Aminosäuren identisch zur Humansequenz. C-terminal der Transmembrandomäne befinden sich die für Hämatoopoietin-Rezeptoren charakteristischen Konsensussequenzen, Box1 und Box2 (Bazan, 1990). Zusammen mit den ebenso cytoplasmatisch lokalisierten konservierten Tyrosinresten und den Tyr-X-X-Gln (YXXQ)-Motiven (Stahl et al., 1995) enthält die gefundene Sequenz alle Elemente, die für die Aktivierung von STATs und Tyrosinphosphatasen der SH-PTP2-Familie notwendig sind (Ihle, 1995; Taga and Kishimoto, 1997; Heinrich et al., 1998). Aufgrund der Präsenz aller dieser für die gp130-Rezeptorfamilie konservierten Motiv-Elemente und der Homologie zu den bekannten Säuger-Sequenzen kann von einer erfolgreichen Klonierung des Huhn-LIFR $\beta$  ausgegangen werden.

## Ergebnisse

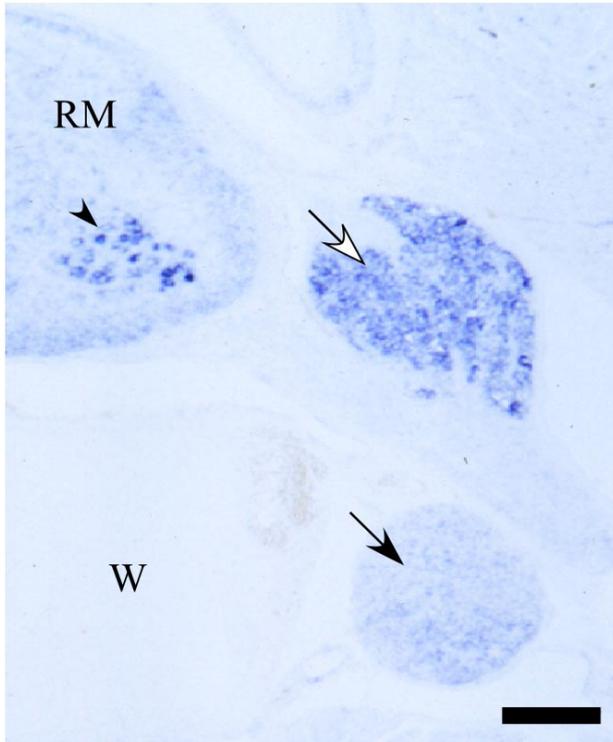
Huhn		<b>MWTN</b>	<b>PNLRLPFSS</b>	<b>FLCLTSLVHS</b>	REIGSQGDPQ	NLKC <b>V</b> THNLH	KMV <b>C</b> TWEISS	ERRHGQTEF <b>C</b>
Human		<b>mvdnkrMrTa</b>	<b>snfqw-llSt</b>	<b>Fi-LlyLmnq</b>	<b>vnsqkGaPh</b>	dLKC <b>V</b> TnNLq	vwn <b>C</b> sWkapS	gtRgtdyEv <b>C</b>
Maus		<b>mvdnkrRsrmt</b>	<b>PNLpwllSal</b>	<b>tL-LhltmHa</b>	<b>ngl-krG-vQ</b>	dLKC <b>C</b> tTnNmr	vvd <b>C</b> TWpapl	gvspGtKdi <b>C</b>
Huhn	YPTE <b>C</b> FKTKE	ERVEIPVPES	STTVKITTYS	ISGTAFATRH	FEIHKKDISF	VPLAPRILSL	TPDFSTFTLT	LKWS <b>D</b> NGSPF
Human	isrs <b>Cy</b> qlek	tsikIP-als	hgdyeITinS	lhdfgssTsk	FtlneqnvSl	iPdtPeILnL	saDFSTsTLY	LKWnDrGSvF
Maus	ikds <b>Ch</b> plet	tnVkiPalsp	gdhevtinY-	lnG--Fgsk-	FtlneKDvSl	iPetPeILdL	saDFfTsLl	LKWnDrGSal
Huhn	PYGLDASWEI	EVLrNGN <b>NVT</b>	RETYSKLIH	EDIHSNWNK	SDMPLECTSH	HVRIRHY <b>NI</b>	<b>TQ</b> FDGPK <b>DWS</b>	<b>AW</b> SRVVVP <b>PGK</b>
Human	PhrsnviWEI	kVLRkeselv	kvThNttLNg	kdTlHhWswa	SDMPLECa <b>ih</b>	fVeIRcYIdn	lhFsGlee <b>WS</b>	<b>dWS</b> pVkn <b>isw</b>
Maus	PhpsnAtWEI	kVLqNtepVa	lvllNtmLsq	kDQvqhWNWt	SDlPLeqCatH	sVsIRwhIds	phFsGyKe <b>WS</b>	<b>dWS</b> plkn <b>isw</b>
Huhn	DTEPSGSLGF	PQDTVVAVGS	<b>NVT</b> FCCVHKE	GQQIQRMSYG	AKDYPLIRLS	SRSSAIRVLN	<b>AN</b> ASSASG <b>TN</b>	IVCTMS <b>EDWM</b>
Human	ipd-SqtkvF	PQDkVilVGS	diTFCCVsqE	-kvlsal-ig	htncPLIhLd	genvAIkirN	isvSasSG <b>TN</b>	vVfT-tED <b>ni</b>
Maus	-irntetnvF	PQDkVVlaGS	NmTiCCm-sp	t-kvlsqgiG	ntlrlPLIhLy	gqtvAIhiLN	ipvSenSG <b>TN</b>	Iifitddd-v
Huhn	DGAULFVGYG	PDTPKGLSCE	TSNFV <b>I</b> IKCT	WKPGRATGLY	KARGTKYSLT	ESISG <b>KNV</b> SC	EVNEMK <b>KKH</b> V	CGFPVLAD <b>QK</b>
Human	fGtViFaGYp	PDTpQqLnCE	ThdlkeIiCs	WnPGRvTaLv	gpRaTsYtLv	ESfSGKyVr1	kraEapt <b>nes</b>	yyFqmLpn <b>Qe</b>
Maus	yGtVvFaGYp	PdvPqkLSCE	ThdlkeIiCs	WnPGRiTGlv	gpRnTeYtLf	ESISG <b>Ks</b> Vfh	riegl <b>tnety</b>	rGvqmhpg <b>Qe</b>
Huhn	TYSFILGASN	PIGQTEASLL	VDLNQRV <b>ME</b>	TPEKLTASGN	<b>SSTS</b> VHLRWF	<b>INGS</b> FAEIRL	LCEIEI <b>SSGH</b>	SEQKLH <b>NVSM</b>
Human	iYnFtLnAhN	PlGrsqstiL	VnitekVyPh	TPtsfkykdi	nStAvkLsWh	lpGnFAkInF	LCEIEI <b>kk</b> sn	SvQeqr <b>NVTi</b>
Maus	ihnFtLtrGrN	PlGQaqsavv	invteRv <b>aph</b>	dPtsLkvkdi	nStVtfsWy	lpGnFtkInL	LCQIEI <b>ckan</b>	Skkevr <b>Nati</b>
Huhn	PGGKFS <b>NYTA</b>	QLNALHPYTK	YQFKVRCSAA	DHFWR <b>WS</b> DWS	GTLEYTTLEA	PPTRGPDIWR	ERSPSG <b>KSLR</b>	IFWKPLSL <b>SE</b>
Human	kGvenSsYlv	aLdkLnPYTL	YtFriRCS-t	etFWk <b>WS</b> KWS	nkkqhlTtEA	sPskGPDtWR	EwSsdG <b>KnLi</b>	IyWKPLpin <b>E</b>
Maus	rGaedStYhv	avdkLnPYTa	YtFrVRCS-s	ktFWk <b>WS</b> -rWS	dekrhlTtEA	tPskGPDtWR	EwSsdG <b>KnLi</b>	vyWKPLpin <b>E</b>
Huhn	ANGKIVSYEV	SCYLLEKSLE	YKEVMEPS <b>NS</b>	<b>TE</b> IKLGNDC	VISVVAKNHA	GSSPPSRITS	VELPSD <b>NVKT</b>	DRAVAMG <b>NGI</b>
Human	ANGKIlsYnV	SCssdEetqs	lsEipdpqhk	aEIrLdkNDY	iISVVAKNsv	GSSPPSkIas	mEiPnDd <b>lKi</b>	eqvVgMG <b>KGI</b>
Maus	ANGKIlsYnV	SCsLnEetqs	vLEifDpQhr	aEItqLsKNdy	iISVVarNsa	GSSPPSkIas	mEiPnDditv	eqAvq1GN <b>Ri</b>
Huhn	YISWNSFPNM	TCGYIVK <b>WCH</b>	SSGSEPC <b>SVD</b>	WQKFPS <b>NTTD</b>	AVIKSALFRP	GVRYN <b>FS</b> LYG	CKSSGY <b>QLLK</b>	<b>NIT</b> GYMK <b>ELP</b>
Human	lltWhydPNM	TCdYviK <b>WCn</b>	SSrSEPC <b>lmd</b>	WrKvPSNsTe	tVieSdeFRP	GiRYNFfLYG	CrnqGY <b>QLLR</b>	smiGyie <b>ELa</b>
Maus	fltwrhdpNM	TCdYviK <b>WCn</b>	SSrSEPC <b>l1d</b>	WrKvPSNsTe	tVieSdqFqP	GVRYNFyLYG	CtnqGY <b>QLLR</b>	siIGyve <b>ELa</b>
Huhn	PKRA <b>FN</b> FTVE	ETSSDSILVK	WEDMSIEDCQ	GFLEGYRLSF	AKGEKDALRP	RLLESGNPEL	KVK <b>NIT</b> DLTK	KSLKILD <b>LQ</b>
Human	PivAP <b>FN</b> FTVE	dTSaDSILVK	WEDipvEeLr	GFLrGYlfyF	gKGErDtskm	RvLESGrsdi	KVK <b>NIT</b> Disq	KtLrIaD <b>LQ</b>
Maus	PivAP <b>FN</b> FTVE	dTSaDSILVK	WdDipvEeLr	GFLrGYlfyF	qKGErDtpkt	RsLEphsdi	K1KN <b>IT</b> Disq	KtLrIaD <b>LQ</b>
Huhn	KTSYQLDLQA	YTAGGLSP <b>EN</b>	SLYVVTKEDS	VGLI <b>IAILFP</b>	<b>VAVV</b> LLGVV	<b>TSIF</b> CYRKRE	WIKET <b>F</b> PEI	PN <b>PE</b> TSKALQ
Human	KTSYhLvLrA	YTDGGvg <b>PEk</b>	SmYVVTKE <b>NS</b>	VGLI <b>IAILiP</b>	<b>VAVaviv</b> GVV	<b>TSIL</b> CYRKRE	WIKET <b>F</b> pdI	PN <b>PE</b> ncKALQ
Maus	KTSYhLvLrA	YThGGlg <b>PEk</b>	SmfVVTKE <b>NS</b>	VGLI <b>IAILiP</b>	<b>VAVaviv</b> GVV	<b>TSIL</b> CYRKRE	WIKET <b>F</b> pdI	PN <b>PE</b> ncKALQ
Huhn	FQKNICEGNK	SLKTLEM <b>NP</b> C	TPNTVE <b>V</b> EVET	QSAAPK <b>I</b> EDT	EMMSTTDTI	VPEDGSDSET	ENHVV <b>V</b> SY <b>CP</b>	PIIEE <b>E</b> ISNP
Human	FQKsvCEGss	aLKTLEM <b>NP</b> C	TPNnVE <b>V</b> lET	rSAfPK <b>I</b> EDT	EiiSpvaer-	-PEDrSdaEp	ENHVV <b>V</b> SY <b>CP</b>	PIIEE <b>E</b> I <b>p</b> NP
Maus	FQKsvCEGsn	aLKTLEM <b>NP</b> C	TPNnVE <b>V</b> lEs	rSivPK <b>I</b> EDT	EiiSpvaer-	-PgerSevdp	ENHVV <b>V</b> SY <b>CP</b>	PIIEE <b>E</b> I <b>t</b> NP
Huhn	TMDEPVGLSQ	VV <b>Y</b> IDIQ <b>S</b> MY	QPQIKPEEES	EIDLVT <b>T</b> AGY	KPQMQLPVSA	LKIESRTPAE	EESDKTAG <b>YR</b>	PQAN <b>T</b> AWNM
Human	aaDEagGtaQ	Vi <b>Y</b> IDvQ <b>S</b> MY	QPQaKPEEEQ	EnDpVggAGY	KPQ <b>M</b> hLPins	-tvEd-iaAE	EdLDKTAG <b>YR</b>	PQAN <b>V</b> nTWN1
Maus	aaDEvgGaSQ	VV <b>Y</b> IDvQ <b>S</b> MY	QPQaKaEEEQ	dvDpVvvAGY	KPQ <b>M</b> rLPiSp	-avEd-TaAE	dEegKTAG <b>YR</b>	PQAN <b>V</b> nTWN1
Huhn	DTPDSPGSVE	SNNENTSFGS	PCSINSRQFL	LPPK <b>D</b> EDSP	KPSNTGWSFT	FFFQNK <b>PND</b>		
Human	vsPDSPrSid	SnsEivSFGS	PCSINSRQFL	iPPK- <b>D</b> EDSP	KsnggGWSFT	nFFQNK <b>PND</b>		
Maus	vsPDSPrStd	SNNEvvSFGS	PCSINSRQFL	iPPK- <b>D</b> EDSP	KsnggGWSFT	nFFQNK <b>PND</b>		

**Abb.9 Sequenzvergleich der abgeleiteten Huhn LIFR $\beta$  Aminosäuresequenz mit den entsprechenden Human/Maus Orthologen.** Identische Aminosäuren sind in den Säugersequenzen in Großbuchstaben hervorgehoben. Farblich abgesetzt: Signalpeptid (blau), Transmembranregion (hellrot, AS 819-840), Cysteinreste (orange) und die beiden WSXWS-Motive (grün). Potentielle Asparagin-verknüpfte Glycosylierungsstellen (NXS/T) sind durch Fettschrift hervorgehoben und die beiden Regionen mit hoher Homologie zur „fn3 Domäne“ sind eingeklammert. Box1 und Box2 sind eingerahmt. Die für den STAT-Signaltransduktionsweg wichtigen Tyrosinreste und die YXXQ-Motive sind rot markiert.

### 4.2 LIFR $\beta$ -mRNA-Expression im Huhn

Vorangegangene Arbeiten (Duong, 1999; Geissen, unveröffentlicht; Ernsberger, unveröffentlicht) zeigten, daß der LIFR $\beta$  in Motoneuronen des Rückenmarks, in den sensorischen Hinterwurzelganglien (dorsal root ganglia, DRG) und den paravertebralen sympathischen Ganglien an den untersuchten Embryonaltagen E7-E14 exprimiert ist. Hierbei

ist die Expression im sympathischen Ganglion signifikant höher als im umgebenden Gewebe, wie Muskel und Knochen. Sie erscheint jedoch niedriger im Vergleich zum DRG und den Motoneuronen zu sein (Abb.10).

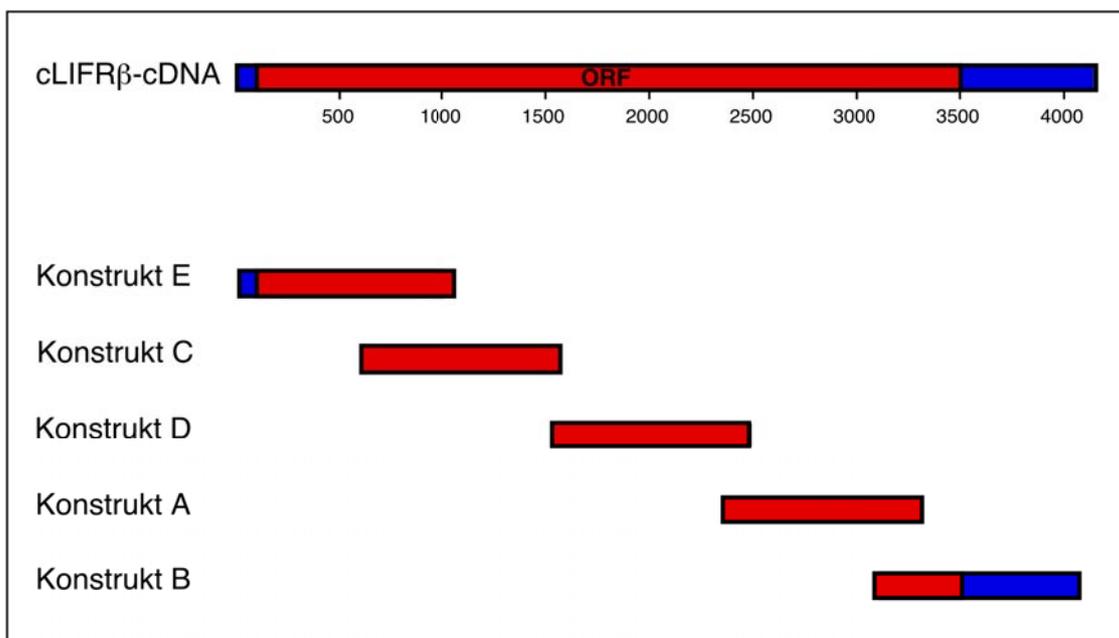


**Abb. 10 LIFR $\beta$ -mRNA-Expression in vivo, Thorakaler Querschnitt.** *In situ*-Hybridisierung für LIFR $\beta$  mRNA auf einem Querschnitt aus dem Thorakalbereich. E14 Hühnerembryonen zeigen eine starke LIFR $\beta$ -mRNA-Expression in Motoneuronen (Pfeilkopf), DRG (weißer Pfeil) und sympathischem Ganglion (schwarzer Pfeil). Rückenmark (RM), Wirbelkörper (W) Schnittdicke 14 $\mu$ m, Maßstab 300 $\mu$ m.

### 4.3 Blockierung der CNTF-induzierten VIP-Expression mit antisense LIFR $\beta$ -RNA

Das Neuropeptid VIP ist in sympathischen Neuronen ab E10 nachweisbar (New and Mudge, 1986, Ernsberger et al., 1997). *In vitro* zeigen E7 sympathische Neuronen nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen keine VIP-Expression (Ernsberger et al., 1989). Die VIP-Expression erfordert somit ein Signal, das *in vivo*, jedoch nicht mehr *in vitro* vorhanden ist. Appliziert man aber GPA oder CNTF ins Kultivierungsmedium (bei einmaliger Zugabe zu Beginn der Kulturperiode), so kann die VIP-Expression in einen großen Teil der Zellen induziert werden. Der prozentuale Anteil der VIP-positiven Neuronen ist in diesem Fall abhängig von der Dosis und der Zeitdauer der Faktorzugabe. Er kann bei täglicher Faktorapplikation auf etwa 90% gesteigert werden (Rohrer, unveröffentlicht). Da die Kulturen von E7 sympathischen Neuronen fast keine nicht-neuronalen Zellen enthalten (Rohrer und Thoenen, 1987), ist die VIP-Induktion in den Neuronen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein direkter Effekt der zugesetzten Faktoren auf die Nervenzellen. Diese CNTF-induzierte VIP-Expression kann durch eine Hemmung der Expression der Rezeptoruntereinheiten mit Hilfe

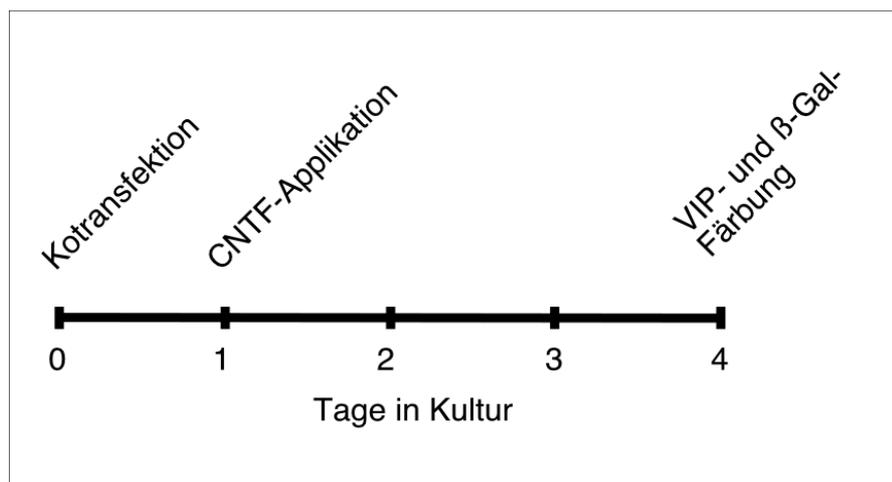
von CNTFR $\alpha$ - bzw. gp130-antisense RNA (Heller et al., 1995; Geissen et al., 1998) verhindert werden. Dieses Verfahren sollte nun ebenfalls eingesetzt werden, um die Funktion des LIFR $\beta$  zu blockieren. Die Interferierung mit der endogenen Genexpression über antisense RNA führt nicht immer zu den angestrebten Effekten (Übersicht in: Fiset und Gounni, 2001). Vielmehr ist beschrieben, daß zuweilen antisense Konstrukte nur schwache, bzw. keine Effekte bewirken oder das korrespondierende sense Konstrukt ebenfalls einen inhibierenden Effekt besitzt (Stein und Krieg, 1994). Aus diesen Gründen ist es notwendig, die später *in vivo* zum Einsatz kommenden Genabschnitte zunächst *in vitro* in einem kontrollierten Assay zu testen. Hierzu wurden 5 überlappende Fragmente der LIFR $\beta$ -cDNA (Abb.11), die die gesamte LIFR $\beta$ -Sequenz abdecken, über PCR amplifiziert (3.16), sequenziert (3.17) und in sense bzw. antisense Orientierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pBK-CMV subkloniert (3.16.3).



**Abb.11 Schematische Darstellung der LIFR $\beta$ -cDNA-Bereiche, die zur Synthese von sense bzw. antisense LIFR $\beta$ -mRNA verwendet wurden.** Die entsprechenden cDNA-Bereiche wurden über PCR amplifiziert und mittels beigefügter ClaI-Schnittstellen in den eukaryontischen Expressionsvektor pBK-CMV subkloniert. Kodierender Bereich (offener Leserahmen, ORF), rot; nicht kodierender Bereich, blau.

Im Anschluß daran wurden die Konstrukte in Kulturexperimente eingesetzt und ihr Einfluß auf die CNTF-induzierte VIP-Expression ermittelt. Für diesen *in vitro*-Assay (Abb.12) wurden E7 sympathische Neuronen präpariert, dissoziiert und in Kultur genommen (3.19.1-3). Nach der Anheftung der Neuronen an das Lamininsubstrat, wird jeweils eines dieser

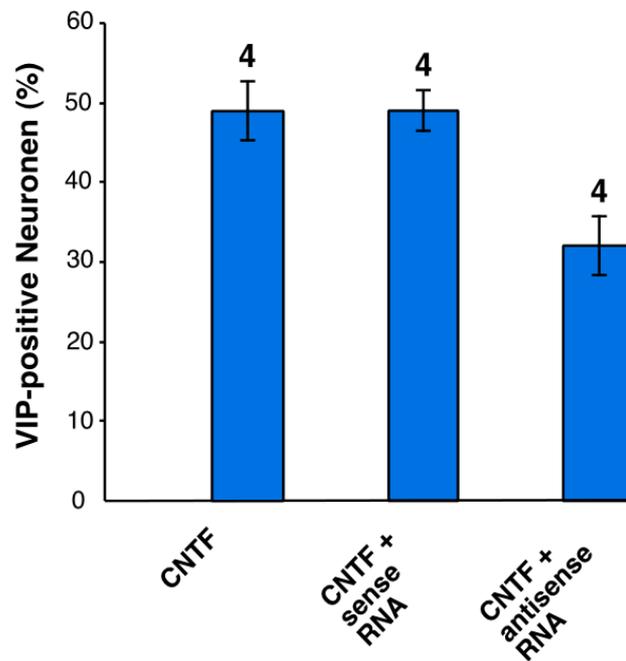
Konstrukte zusammen mit einem  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Plasmid (10 $\mu$ g LIFR $\beta$ -Plasmid / 2 $\mu$ g pcDNA-lacZ-Plasmid) durch Transfektion in die sympathischen Neuronen eingebracht (3.19.7). Die dabei verwendete CaCl<sub>2</sub>-Präzipitationsmethode führt zur Aufnahme einer Mischung vieler Plasmidmoleküle in Form von Präzipitatkristallen. Da die verwendete Konzentration an  $\beta$ -Gal-Plasmid wesentlich geringer ist als das LIFR $\beta$ -Konstrukt, ist davon auszugehen, daß eine  $\beta$ -Gal-transfizierte Zelle nach der Kotransfektion ebenfalls sense bzw. antisense Plasmide enthält. 24 Stunden nach der Kotransfektion wird die VIP-Expression mit CNTF stimuliert. Das dabei verwendete Säuger CNTF ist weniger aktiv, als das CNTF- verwandte, im Huhn vorkommende GPA (Heller et al., 1995). Es ist aber aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit dem spezieeigenen Faktor vorgezogen worden. Nach weiteren drei Kultivierungstagen wurden die sympathischen Neuronen über eine Immundoppelfärbung mit Antikörpern gegen VIP und  $\beta$ -Galactosidase markiert und fluoreszenzmikroskopisch optisch ausgewertet (3.20.1).



**Abb.12 Zeitliche Abfolge der Faktor-induzierten VIP-Expression in kultivierten sympathischen Neuronen.** E7 sympathische Neuronen werden in Kultur genommen, mit sense-/antisense Expressionsvektor und einem  $\beta$ -Gal-Vektor (5:1) kotransfiziert. Nach 24 Stunden wird die VIP-Expression mit Zugabe von CNTF stimuliert. Die Analyse erfolgt über Immunfärbung gegen VIP und  $\beta$ -Galaktosidase.

Nur eines der 5 getesteten Konstrukte wies den angestrebten Effekt auf. Die Auswertung der VIP-Expression in den  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Zellen zeigt, daß nur ausschließlich das Konstrukt E, welches den Translationsstartpunkt enthält (Abb.11) in der Lage ist, die CNTF-induzierte VIP-Expression zu reduzieren. Neuronen, in denen LIFR $\beta$ -antisense RNA exprimiert wird, zeigen einen reduzierten Anteil VIP-positiver Neuronen ( $p < 0,001$ ,

zweiseitiger T-Test) gegenüber Neuronen, die mit sense und Kontroll  $\beta$ -Gal-Plasmid transfiziert worden waren (Abb.13).

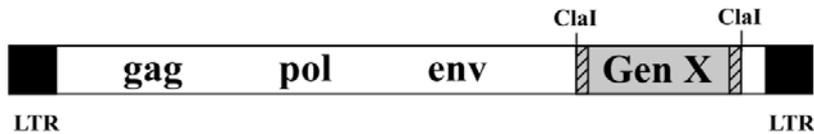


**Abb.13 *In vitro*-Effekt von antisense LIFR $\beta$ -mRNA.** Der Anteil VIP-positiver Neuronen der  $\beta$ -Gal-exprimierenden Zellen ist in Prozent angegeben. Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert. Die Anzahl der Versuche ist über den Säulen angegeben.

#### 4.4 *In vivo*-Expression von LIFR $\beta$ -antisense RNA

##### 4.4.1 Effekt von LIFR $\beta$ -antisense RNA auf noradrenerge, cholinerge und panneuronale Markergene

Zur *in vivo*-Expression von LIFR $\beta$ -sense bzw. antisense RNA wurde das *in vitro* erfolgreich getestete Fragment E über die angefügte ClaI-Schnittstelle in den retroviralen RCAS(B)-Vektor (Hughes and Kosik, 1984; Morgan and Fekete, 1996) subkloniert (Abb.14).

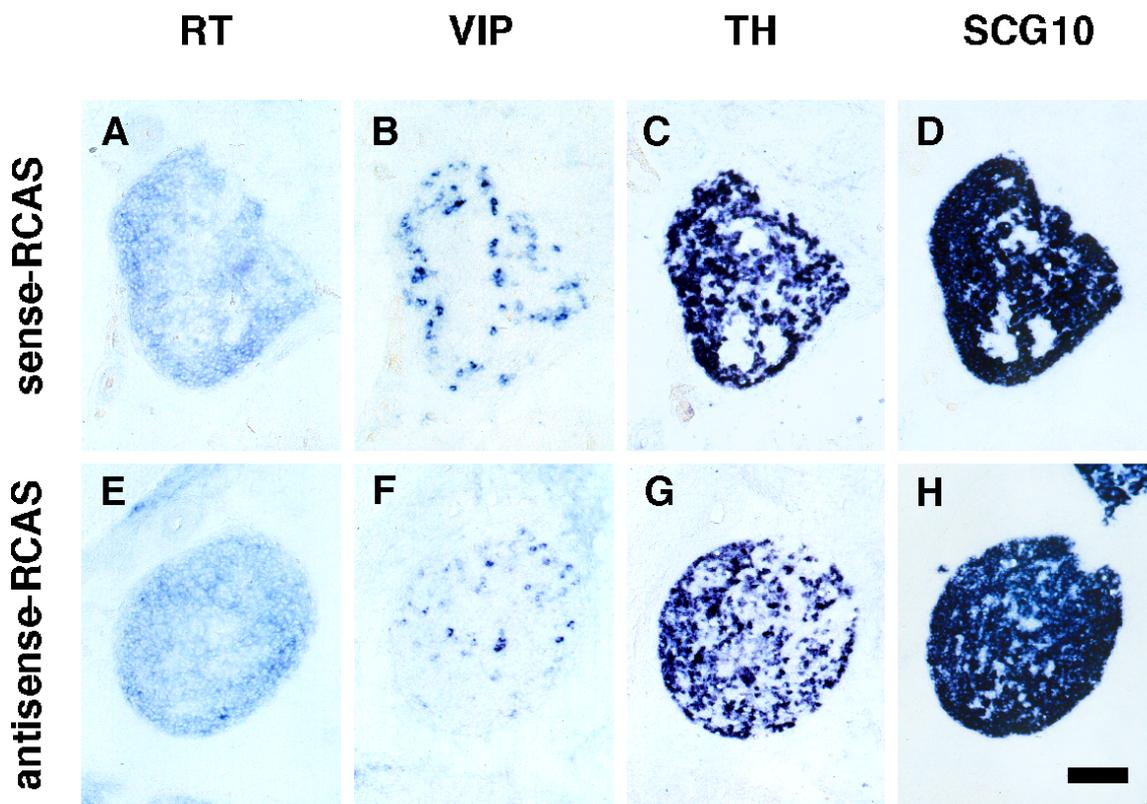


**Abb.14 Schematischer Aufbau des RCAS(B)-Provirus.** Der replikationskompetente retrovirale RCAS(B)-Virus leitet sich vom „Rous-Sarkoma-Virus“ ab. gag, pol und env sind Strukturgene des Provirus. Anstatt des ursprünglichen tumorinduzierenden Onkogen (src) können nach Belieben, über die ClaI-Schnittstellen, DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 2,4kb eingebracht (Gen X) und über den src-Promotor exprimiert werden (Morgan und Fekete, 1996). Als retroviraler Virus ist er in mitotischen Zellen in der Lage, in das Wirtsgenom zu integrieren. Vom Provirus wird dann die gesamte genetische Information, einschließlich der einklonierten Fragmente, transkribiert und ggf. translatiert. Die Virus-RNA wird außerdem verpackt, ausgeschleust und über Sekundärinfektionen können danach benachbarte Zellen infiziert werden. Das Vektorsystem eignet sich sowohl zur Expression von RNA, als auch von Proteinen.

Anschließend wurden Huhn DF1-Fibroblastenzellen (2.8.1) mit den retroviralen RCAS(B)-Vektoren transfiziert (3.19.7) und so lange kultiviert, bis über einen immunologischen Nachweis des GAG-Virusproteins (Immunfärbung, 3.20.1) die vollständige Infektion aller Zellen gewährleistet war. Anschließend wurden Aggregate der virusproduzierenden DF-1-Zellen unilateral in den Migrationsweg der Neuralleistenzellen an E2 implantiert (3.19.10). Nach Zielgebietsinnervation der cholinergen sympathischen Neuronen wurden an E13/14 (St. 39/40) serielle Gefrierschnitte (3.21.2) der cervikal/thorakalen Region angelegt und diese über *In situ*-Hybridisierungen (3.21) und Immunfärbungen (3.20.2) analysiert. Die Detektion der viralen Infektion erfolgt über mRNA-Nachweis der viruseigenen „Reversen Transkriptase (RT)“.

Der Einsatz von virusinfizierten DF-1-Zellen führte häufig zu einer effizienten Infektion der paravertebralen sympathischen Ganglien auf beiden Seiten des Embryos. Obwohl die Infektion an E2 nur auf einer Seite erfolgt war, hatte sich die Infektion bis E13/14 auf die Gegenseite ausgebreitet. Nach äußeren morphologischen Gesichtspunkten wurde die allgemeine Entwicklung, einschließlich des Nervensystems nicht beeinflusst. Die embryonale Entwicklung der sympathischen Ganglien konnte an Hand der Expression des adrenergen Markergens TH und des panneuronalen Markergens SCG10 untersucht werden. Analysen mittels *In situ*-Hybridisierungen zeigten keinen offensichtlichen Unterschied in der TH- bzw. SCG10-Expression in implantierten Embryonen, gegenüber den nicht implantierten Kontrolltieren. Bei genauer Betrachtung der VIP-Expression zeigen sich deutliche Unterschiede. Die VIP-Expression in infizierten sympathischen Ganglien von Embryonen, welche LIFR $\beta$ -antisense RNA produzieren (antisense LIFR $\beta$  Embryonen), war im Vergleich zu sense LIFR $\beta$  Embryonen und den nicht implantierten Kontrolltieren deutlich reduziert

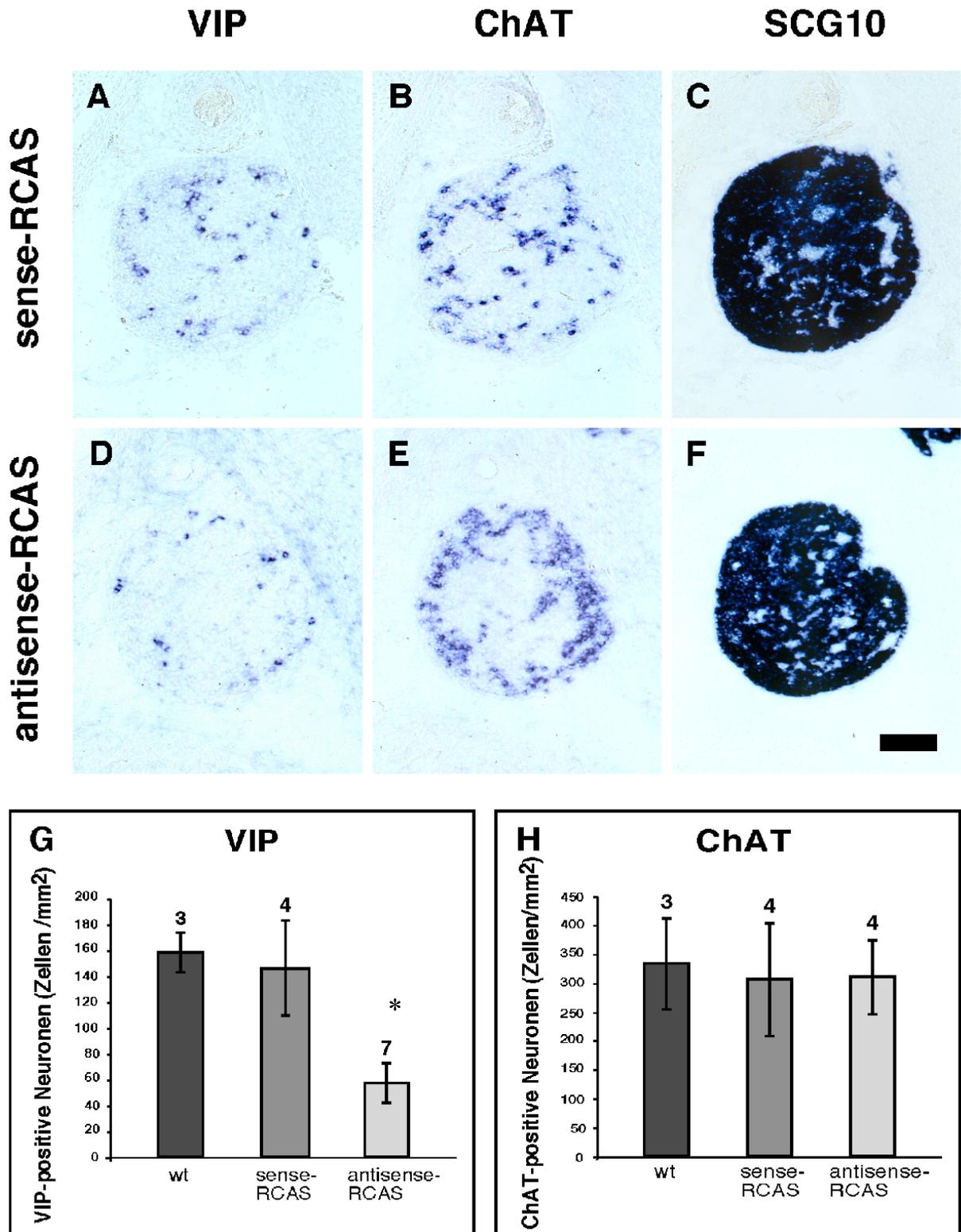
(Abb. 15). Dieser Effekt konnte durch Quantifizierung der VIP-mRNA exprimierenden Zellen pro durchschnittlicher sympathischer Ganglionfläche bestätigt werden. Hierbei wurde die Fläche der panneuronalen SCG10-Expression mittels *In situ*-Hybridisierung detektiert (3.21) und morphometrisch ausgemessen (3.21.7). Die ebenfalls über *In situ*-Hybridisierung detektierten VIP-positiven Zellen/Schnitt wurden ausgezählt und auf die ermittelte SCG10-positive Fläche des sympathischen Ganglions bezogen. Diese Analyse zeigte, daß in den Ganglien der antisense LIFR $\beta$  Embryonen die Anzahl der VIP-positiven Zellen ( $60 \pm 15$ ) signifikant reduziert ist gegenüber den sense LIFR $\beta$  Embryonen ( $148 \pm 35$ ) und den Kontrolltieren ( $160 \pm 15$ ,  $p < 0,0001$ , zweiseitiger t-Test). Da nun die Fläche des sympathischen Ganglions, gemessen an der Fläche der SCG10-positiven Neuronen nicht signifikant unterschiedlich ist in sense und antisense LIFR $\beta$  Embryonen ( $38808 \pm 5237 \mu\text{m}^2$  und  $35343 \pm 7520 \mu\text{m}^2$ ), reflektiert die reduzierte Anzahl VIP-positiver Neuronen eine Abnahme von VIP-exprimierenden Neuronen pro Ganglion.



**Abb.15 Ganglien, die mit antisense LIFR $\beta$ -RCAS infiziert sind, zeigen eine reduzierte Anzahl an VIP-exprimierenden Zellen.** Dargestellt ist ein mit sense LIFR $\beta$ -RCAS (A, B, C, D) bzw. antisense LIFR $\beta$ -RCAS (E, F, G, H) infiziertes sympathisches Ganglion. Die erfolgreiche Infektion der thorakalen sympathischen Ganglien an E13/14 wurde über RT-mRNA Expression nachgewiesen. Die mRNA Expression für VIP (B, F) TH (C, G) und SCG10 (D, H) wurde auf den folgenden seriellen Kryoschnitten detektiert. Schnittdicke  $14\mu\text{m}$ . Maßstab:  $100\mu\text{m}$ .

### 4.4.2 Quantifizierung des Effekts von antisense LIFR $\beta$ -RNA auf die VIP-Expression

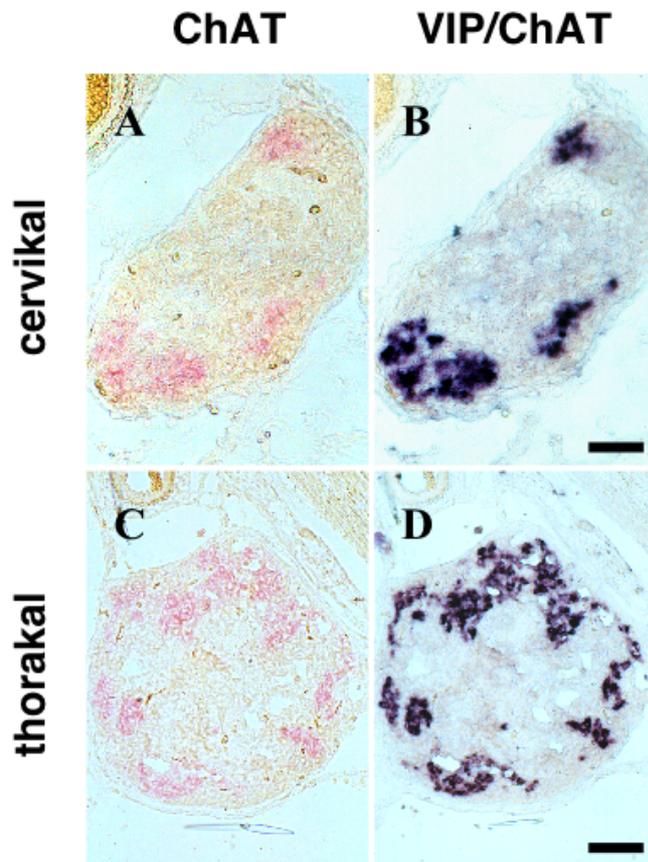
Im Prinzip kann die beobachtete Reduktion der VIP-positiven Neuronen auf einen Verlust von VIP-exprimierenden Neuronen durch Zelltod (Apoptose) oder auf eine Reduktion der VIP-Expression zurückgeführt werden. Ein Verlust von VIP-positiven Neuronen ließe sich nicht alleine mit der Beobachtung ausschließen, daß die Gangliongröße sich in sense LIFR $\beta$  Embryonen und antisense LIFR $\beta$  Embryonen nicht signifikant unterscheidet. Der Grund dafür ist der geringe Prozentsatz von ca. 30% VIP-exprimierenden Neuronen im ausdifferenzierten sympathischen Ganglion. Es ist fraglich ob eine Reduzierung der Gangliongröße um den Anteil VIP-exprimierender Zellen signifikant zu erfassen ist. Ein apoptotischer Effekt hätte neben VIP auch Auswirkungen auf die Detektierbarkeit anderer Gene. Da wir von einer selektiven Reduktion von VIP aufgrund eines fehlenden Differenzierungssignal ausgehen, sollen frühe cholinerge Marker nicht betroffen sein. Für das Huhn ist nun bekannt, daß VIP im differenzierten sympathischen mit den frühen cholinergen Markergenen VAcHt und ChAT (Ernsberger et al., 1997; Ernsberger und Rohrer, 1999) koexprimiert ist. Ein Verlust von VIP-positiven Neuronen sollte sich daher auch in einer Reduktion an VAcHt und ChAT-positiven Neuronen widerspiegeln. Die quantitative Analyse der ChAT-Expression zeigt, daß die Anzahl ChAT-positiver Neuronen in antisense LIFR $\beta$  Embryonen ( $313 \pm 64$ ) nicht reduziert ist, im Vergleich zu sense LIFR $\beta$  Embryonen ( $309 \pm 98$ ) und Kontrolltieren ( $336 \pm 79$ ). Damit ist eindeutig nachgewiesen worden, daß die VIP-Induktion in sympathischen Neuronen über LIFR $\beta$ -vermittelte Zytokine erfolgt, die jedoch keinen Einfluß auf die ChAT-Expression haben. Diese neuropoietischen Zytokine beeinflussen nicht das Überleben der ChAT- und VIP-exprimierenden Zellpopulation.



**Abb.16 Quantifizierung der VIP- und ChAT-Expression in E13/14 sympathischen Ganglien.** Die Anzahl der VIP-(A, D) und ChAT-(B, E) positiven Neuronen wurde in alternierenden cervikalen und thorakalen Kryoschnitten von infizierten sympathischen Ganglien bestimmt. Die Fläche der SCG10 (C, F)-Expression im sympathischen Ganglion wurde morphometrisch ausgemessen. Die Anzahl der VIP-(G) und ChAT-(H) positiven Zellen wurde auf die SCG10 positive Fläche bezogen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert. Die Anzahl der ausgewerteten Embryonen ist über den Balken angegeben. Die Zahl VIP-positiver Neuronen ist in antisense LIFR $\beta$ -Embryonen signifikant reduziert (Stern,  $p < 0,0001$ ). Schnittdicke, 14 $\mu$ m. Maßstab: 100 $\mu$ m.

### 4.4.3 VIP- und ChAT-Expression in E13/14 und E18 Wildtyp Embryonen

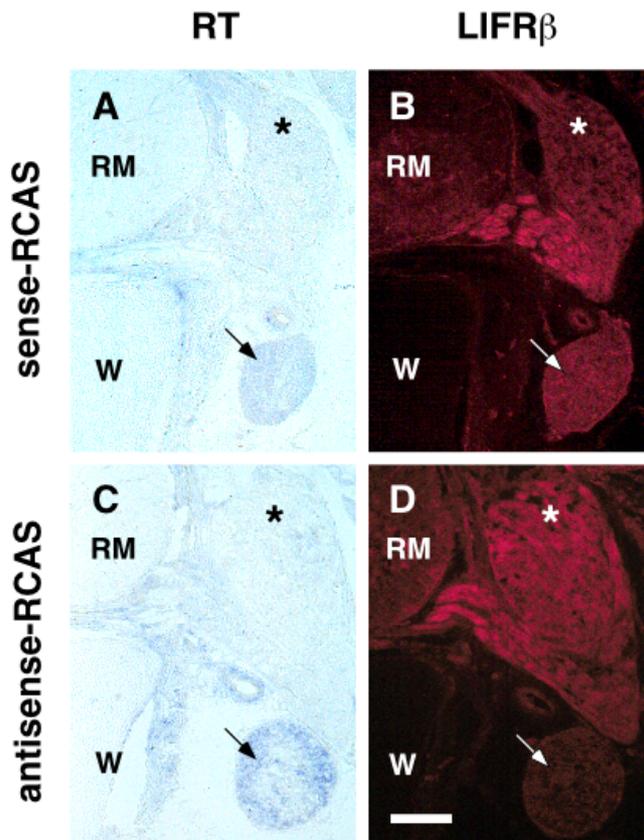
Die Differenzierung cholinerg sympathischer Neuronen findet im Huhn vermutlich in mehreren Schritten statt. Hierbei werden frühe cholinerge Markergene, wie ChAT und VACHT bereits vor der Innervation des Zielgebietes exprimiert (Ernsberger et al., 1997). Die Expression von VIP hingegen ist erst nach Zielgebietskontakt an E10 über *In situ*-Hybridisierung nachweisbar (Ernsberger et al., 1997). In ausdifferenzierten, thorakalen sympathischen Neuronen des Huhns findet man letztendlich folgendes Bild vor; es lassen sich ausschließlich cholinerge sympathische Neuronen detektieren, die sowohl VIP, als auch ChAT koexprimieren (Ernsberger und Rohrer, 1999). Die Quantifizierung von ChAT- und VIP-positiven Neuronen in cervikalen bis thorakalen Schnitten des sympathischen Ganglions an E13/14 ergaben nun eine geringere Anzahl VIP-positiver, als ChAT-positiver Neuronen. In Wildtypembryonen findet man im Mitte 160 VIP-positive Neuronen und 336 ChAT-positive Neuronen pro mm<sup>2</sup> (Abb.16). Diese Differenz könnte zum einen an einen Unterschied in der VIP- und ChAT Koexpression zwischen cervikalen und thorakalen sympathischen Neuronen liegen, oder aber an dem unterschiedlichen Entwicklungsalter. Die vorangegangenen Untersuchungen von Ernsberger und Rohrer (1999) bezogen sich nur auf die thorakale Region, daher wurden zur Klärung dieses Sachverhalts Doppel-*In situ*-Hybridisierungen für VIP und ChAT an cervikalen und thorakalen Schnitten von E18 Kontrolltieren durchgeführt (3.21). Das Resultat zeigt eine vollständige Koexpression von VIP und ChAT im cervikalen und auch im thorakalen Abschnitt des sympathischen Ganglions (Abb.18). Daraus folgt, daß die im Vergleich zur ChAT-Expression geringere Anzahl VIP-exprimierender Neuronen an E13/14 auf eine kontinuierliche Zunahme der VIP-Expression, oder eine Abnahme der ChAT-Expression zwischen E13 und E18 zurückzuführen ist.



**Abb. 17 VIP und ChAT sind in cervikalen und thorakalen sympathischen Ganglien an E18 koexprimiert.** Doppel-*In situ* Hybridisierung von Wildtyp E18 Huhnembryonen gegen ChAT (A, C, rot) und VIP (B, D, blau) zeigen eine vollständige Koexpression von ChAT und VIP in cervikalen (A, B) und thorakalen (C, D) sympathischen Ganglien. Schnittdicke, 14 $\mu$ m. Maßstab: 50 $\mu$ m (cervikal); 100 $\mu$ m (torakal).

#### 4.4.4 Effekt von LIFR $\beta$ -antisense RNA auf die endogene Proteinexpression

Zur Ermittlung der Spezifität des Effekts der antisense LIFR $\beta$ -mRNA wurde die Proteinexpression von LIFR $\beta$  in sense- und antisense LIFR $\beta$  Embryonen untersucht. Das verwendete Infektionsprotokoll führte in fast allen Embryonen zu einer effizienten Infektion des sympathischen Ganglions. Die Schnittserien haben gezeigt, daß DRG, Nerv und Rückenmark, wie schon in anderen Arbeiten beobachtet (Geissen et al., 1998), häufig nicht infiziert sind. Daher kann die LIFR $\beta$ -Expression im DRG und im Rückenmark als endogene Referenz für das LIFR $\beta$ -Expressionslevel im sympathischen Ganglion herangezogen werden. Immunfärbungen auf seriellen Kryoschnitten (3.20.2) von 14 Tage alten Tieren zeigen eine deutliche Reduktion von LIFR $\beta$  in sympathischen Ganglien von antisense LIFR $\beta$  Embryonen, im Vergleich zu Ganglien von sense LIFR $\beta$  Embryonen (Abb.18). Dagegen ist die LIFR $\beta$  Expression im DRG identisch in antisense- und sense LIFR $\beta$  Embryonen. Diese Ergebnisse wurden durch *In situ*-Hybridisierungen zum Nachweis der LIFR $\beta$ -mRNA-Expression bestätigt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 18 Die Expression von LIFR $\beta$  antisense RNA interferiert in vivo mit der endogenen LIFR $\beta$ -Proteinexpression.** Kryoschnitte aus der thorakalen Region von implantierten Embryonen (E14) wurden auf Virusinfektion (A, C) getestet. In jeweils alternierenden Kryoschnitten wurde die LIFR $\beta$ -Proteinexpression (B, D) durch Immunfärbung detektiert. Die Expression von antisense LIFR $\beta$ -mRNA im sympathischen Ganglion (Pfeil) führt zu einer starken Reduktion der endogenen LIFR $\beta$ -Proteinexpression (D), im Vergleich zu den nicht infizierten Neuronen in DRG (Stern) und Rückenmark. (RM), Wirbelknochen. (W). Maßstab: 200 $\mu$ m.

#### 4.4.5 Zusammenfassung des 1. Teils

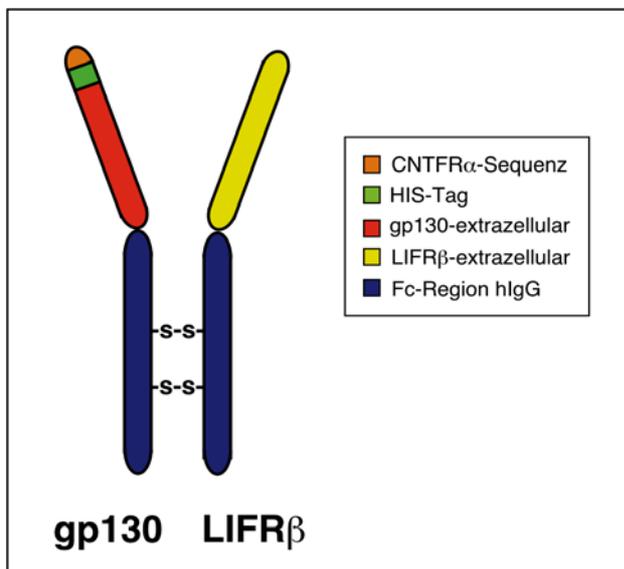
Die Ergebnisse zeigen, daß die Hemmung mit der LIFR $\beta$ -vermittelten Signaltransduktion zu einer selektiven Reduktion der VIP-Expression führt, wohingegen die frühe cholinerge (ChAT), noradrenerge (TH) und panneuronale (SCG10) Genexpression unbeeinflusst bleiben. Damit ist nachgewiesen, daß neuropoietische Zytokine, die über den LIFR $\beta$  wirken, essentiell und damit physiologisch relevant für bestimmte Aspekte terminaler Differenzierung (VIP-Expression) sympathischer Nervenzellen sind.

#### 4.5 Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen

##### 4.5.1 LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein

Aus den vorangegangenen Arbeiten geht hervor, daß die VIP-Induktion über einen Rezeptorkomplex vermittelt wird, der die signaltransduzierenden Untereinheiten LIFR $\beta$  und gp130 (Geissen et al., 1998) enthält. Diese wichtige Erkenntnis ist ausschlaggebend für die weitere Suche nach dem vom Zielgewebe präsentierten, VIP-induzierenden Zytokin(en). Neben dem (den) cholinergen Zielgebietsfaktor(en) sind allgemein alle neuropoietischen Zytokine interessant, da sie unterschiedliche Funktionen während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus erfüllen. Aus diesem Grunde wurde die Suche auf alle neuropoietische Zytokine ausgeweitet, die über einen homodimeren gp130/gp130-Rezeptorkomplex bzw. heterodimeren LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorkomplex transduzieren.

Zur gezielten Suche nach neuropoietischen Zytokinen wurden Rezeptor-Antikörper-Fusionsproteine (Rezeptorfusionsproteine) hergestellt, mit denen eine Expressionsbank nach neuropoietischen Zytokinen abgesucht wurde, u.a. nach dem cholinergen Differenzierungsfaktor. Das angestrebte LIFR $\beta$ /gp130- (Abb.19) bzw. gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein besteht aus ligandenbindenden, extrazellulären Regionen von LIFR $\beta$  bzw. gp130, die jeweils mit dem N-Terminus C-terminal mit der konstanten Immunglobulinkette (Fc) des humanen Immunglobulin (hIgG) verbunden sind. Die Dimerisierung zum Heterodimer bzw. Homodimer erfolgt über die angefügten Immunglobulinketten durch Ausbildung von Disulfidbrücken.



**Abb. 19 Schematische Struktur des LIFR $\beta$ -/gp130-Rezeptorfusionsproteins.**

Extrazelluläre ligandenbindene Regionen von LIFR $\beta$  und gp130 werden jeweils mit humanen Immunketten fusioniert. Die Dimerisierung des vollständigen LIFR $\beta$ -/gp130 Rezeptorfusionsproteins erfolgt über die Disulfidbrücken (S-S) der Immunglobulinketten.

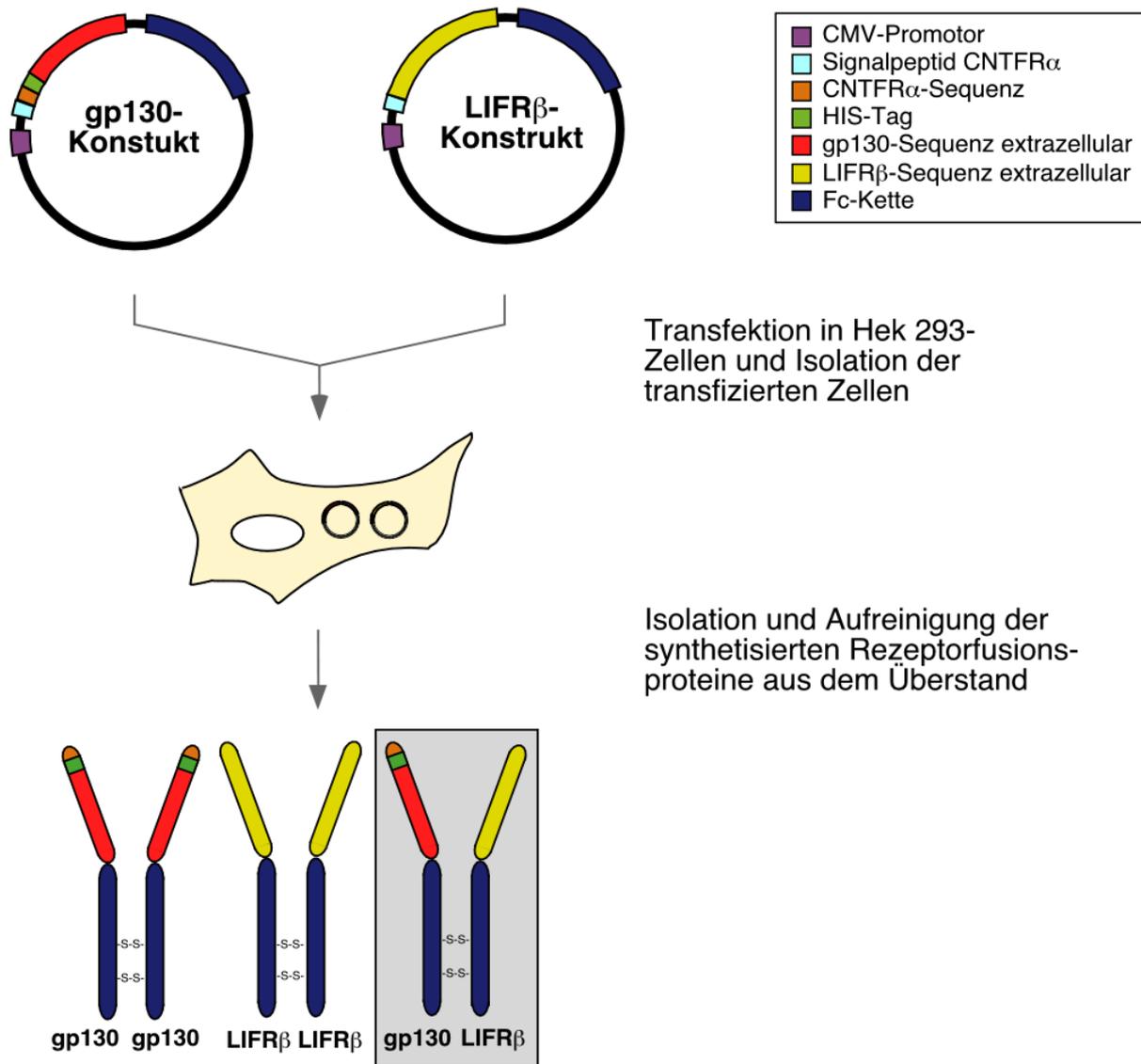
### 4.5.2 Klonierung und Produktion von Rezeptorfusionsproteinen in HEK 293 Zellen

Für die Konstruktion des LIFR $\beta$ -Rezeptorfusionsproteins wurde die extrazelluläre Region des LIFR $\beta$  in den eukaryontischen Expressionsvektor pBK-CMV-hIgG (2.4) subkloniert. Damit das Fusionsprotein erfolgreich aus den humanen HEK 293 Zellen ausgeschleust werden kann, wurde die Sekretionssequenz gegen die humane Sekretionssequenz des CNTFR $\alpha$  ausgetauscht (Das Signalpeptid von CNTFR $\alpha$  war bereits erfolgreich zur Produktion von gp130-Fc eingesetzt worden). Zudem wurde im 3'-Bereich der LIFR $\beta$ -Sequenz eine 5'-Splice-Site angefügt, über die nach der Synthese des primären Transkriptes die Fc-Kette angefügt wird. Das Einbringen einer 5'-Splice-Site war nötig, weil die humane Fc-Sequenz aus genomischer DNA gewonnen wurde.

Der entsprechende gp130-Rezeptorfusionsprotein-Expressionsvektor (2.4) wurde von Dirk Junghans hergestellt. Er enthält analog zum LIFR $\beta$ -Konstrukt eine humane CNTFR $\alpha$ -Sekretionssequenz, die extrazelluläre Domäne von gp130 und eine Fc-Kette, die auch beim Splicen angefügt wird. Die Aufreinigung der Rezeptorfusionsprotein-Varianten über Ni<sup>2+</sup>-Säulen (Abb.20) wird durch einen HIS-Tag ermöglicht, das am N-Terminus des gp130-Konstrukts angefügt wurde.

Zur Produktion des Rezeptorfusionsproteins wurden HEK 293 Zellen mit beiden Expressionskonstrukten kotransfiziert und in Selektionsmedium kultiviert. Einzelne stabil transfizierte Klone wurden nach 3 Wochen isoliert und getrennt kultiviert (3.19.7-8). Anschließend wurden Überstände dieser Klone über Nickelsäulen (Qiagen) aufgereinigt und mit Hilfe von Silber-gefärbten Polyacrylamidgelen untersucht (3.22.4).

Die Kotransfektion von HEK 293 Zellen hat zur Folge, daß einige Zellklone entweder nur das Homodimer LIFR $\beta$ -Fc, Homodimer gp130-Fc oder eine Mischung aus den beiden Homodimeren und dem Heterodimer LIFR $\beta$ -Fc/gp130-Fc synthetisieren.



**Abb.20 Schematischer Ablauf der Herstellung und Isolation von LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteine-exprimierenden HEK 293 Zellen.** Die Vektoren basieren auf pBKCMV-Vektoren mit bereits eingefügter humaner genomischer Fc-Sequenz. Die extrazellulären ligandenbindenden Regionen von LIFR $\beta$  und gp130 mit angefügtem CNTFR $\alpha$ -Signalpeptid wurden einkloniert, wobei 5'- und 3'-Splice-Sites die kodierenden Bereiche flankieren. Zur Herstellung von gp130- und LIFR $\beta$ -Rezeptorfusionsproteinen wurden HEK 293 Zellen mit beiden Expressionskonstruktionen kotransfiziert und unter selektiven Bedingungen gehalten, bis sich einzelne stabil transfizierte „Zellklone“ gebildet hatten. Diese „Zellklone“ wurden getrennt weiterkultiviert, und die Zellüberstände wurden auf die hergestellten Rezeptorfusionsproteine hin analysiert.

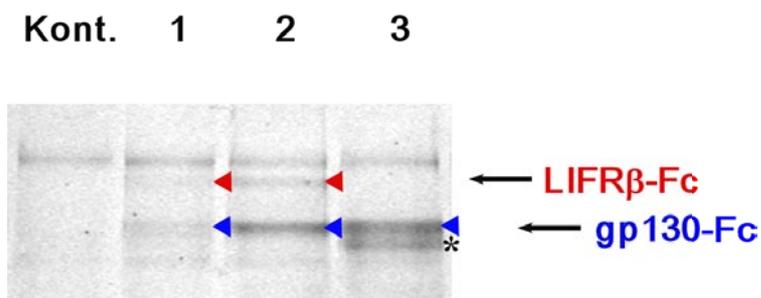
#### 4.5.3 Detektion, Isolierung und Aufreinigung von sekretierten Rezeptorfusionsproteinen aus den Zellüberständen.

Das Prinzip der Aufreinigung über Ni<sup>2+</sup>-Säulen beruht auf der spezifischen Bindung von Histidin an der Matrix bei den gewählten Bedingungen. Hierdurch wird durch die Konstruktion der Rezeptorfusionsproteine bedingt nur gp130-Fc gebunden (Homodimer

## Ergebnisse

gp130-Fc/gp130Fc und Heterodimer LIFR $\beta$ -Fc/gp130-Fc). Das homodimere LIFR $\beta$ /LIFR $\beta$ -Rezeptorfusionsprotein hingegen enthält kein HIS-Tag und wird nicht an der Säulenmatrix gebunden. Da die Rezeptorfusionsproteine unterschiedliche Molekulargewichte besitzen, ist es möglich, mittels Acrylamidgelelektrophorese (3.22.2) und Silberfärbung (3.22.4), die exprimierten Konstrukte zu identifizieren. Im reduzierenden Polyacrylamidgel werden monomere Rezeptorfusionsproteine untereinander aufgetrennt. Klone, die nur homodimeres LIFR $\beta$ /LIFR $\beta$ -Rezeptorfusionsprotein produzieren, erscheinen wie erwartet „ohne Bande“. gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein-exprimierende Klone weisen eine monomere Bande bei 140 kDa auf, LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein-exprimierende Zellen hingegen jeweils eine Bande für gp130-Fc bei 140 kDa und eine weitere für LIFR $\beta$ -Fc bei 180 kDa (Abb.21). Die Proteinbande bei ca. 200 kDa wird in allen aufgereinigten Klonüberständen und in aufgereinigten Überständen von nicht-transfizierten Hek 293 Zellen detektiert und stellt vermutlich eine Verunreinigung mit Serumprotein dar.

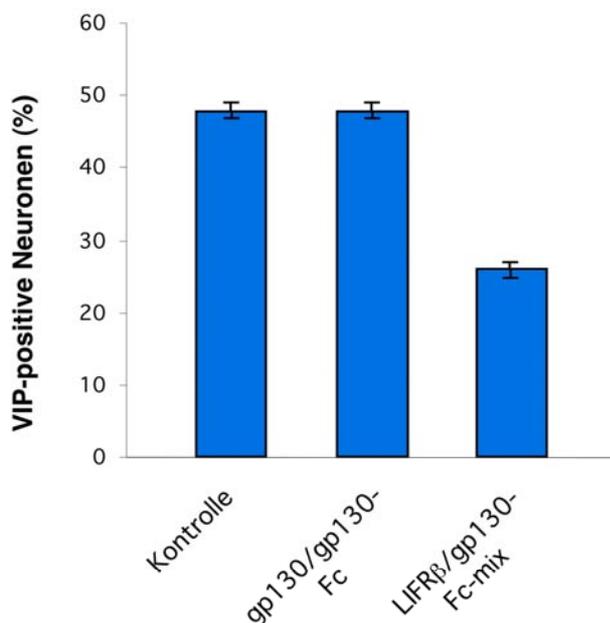
Insgesamt wurden 48 Klone isoliert, kultiviert und mit dem beschriebenen Verfahren identifiziert. Von den 44 untersuchten Klonen exprimierten 26 Klone homodimer LIFR $\beta$ /LIFR $\beta$ -Rezeptorfusionsprotein, 11 Klone exprimierten gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein und nur 7 exprimierten eine Mischung aus den verschiedenen Homodimeren zusammen mit dem heterodimeren LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein. Die Synthesemenge von heterodimeren LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteinen ist jedoch unter den 7 gefundenen Klonen sehr variabel (Abb.21).



**Abb.21 Detektion von Zellen, die LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteine exprimieren.** Ni<sup>2+</sup>-aufgereinigte Zellüberstände einzelner Zellklone wurden im Silber-gefärbten 7,5%igen Polyacrylamidgel untersucht. Klon 1 und 2 synthetisieren LIFR $\beta$ -Fc und gp130-Fc in unterschiedlicher Menge. Klon 3 synthetisiert nur gp130-Fc. Als Kontrolle dient Ni<sup>2+</sup>-Säulen-aufgereinigter HEK 293 Zellüberstand. \* In seltenen Fällen auftretendes Degradationsprodukt.

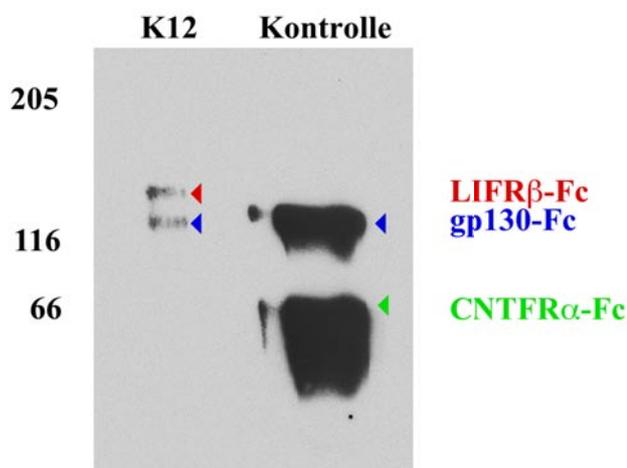
4.5.4 Funktionelle Analyse der synthetisierten Rezeptorfusionsproteine

Im vorigen Experiment wurde gezeigt, daß die produzierten Rezeptorfusionsproteine im Überstand der transfizierten HEK 293 Zellen detektiert werden können und somit eine erfolgreiche Sekretion stattgefunden hat. Um die Funktionalität der synthetisierten Rezeptorfusionsproteine zu überprüfen, wurden Zellüberstände von Klonen, die entweder nur homodimeres gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein oder eine Mischung aus heterodimeren und homodimeren Rezeptorfusionsproteinen exprimieren, dazu verwendet, die VIP-induzierende Aktivität in HCM zu blockieren. Sympathische Neuronen wurden kultiviert und die VIP-Expression mit HCM-Applikation stimuliert (3.19.1-4). Inkubiert man das zugegebene HCM mit Überständen von homodimer gp130/gp130-Rezeptorfusionsproteinen-enthaltenen Überständen (4:1), so ist die VIP-Induktion unverändert im Vergleich zur Kontrolle (Überstand von nicht transfizierten HEK 293 Zellen). Im Gegensatz dazu kann man mit Überständen, die ein Gemisch aus den drei verschiedenen Rezeptorfusionsproteinen exprimieren, den Anteil der VIP-positiven Neuronen um fast 50% signifikant reduzieren ( $p < 0,001$ , Abb.22). Das Ergebnis zeigt, daß die produzierten Rezeptorfusionsproteine funktionell aktiv sind und auch in der Lage sind, die unbekannte Aktivität in HCM zu binden. Eine Blockierung mit homodimeren LIFR $\beta$ /LIFR $\beta$ -Rezeptorfusionsproteinen-enthaltenden Überständen wurde nicht durchgeführt, da bisher keine biologische Aktivität eines solchen Komplexes beschrieben worden ist und auch keine entsprechenden Rezeptoren beschrieben sind. Aus diesen Gründen wurden diese Klone auch nicht weiter kultiviert.



**Abb.22 Blockierung von HCM mit verschiedenen Rezeptorfusionsproteine-enthaltenden Überständen.** E7 sympathische Neuronen wurden in Kultur genommen und die VIP-Expression mit HCM stimuliert. Zur Blockierung der VIP-induzierenden Aktivität in HCM, wird diese mit Überstand behandelt, der ausschließlich gp130/gp130-Fc oder einer Mischung verschiedener Rezeptorfusionsproteine enthält., u.a. LIFR $\beta$ /gp130-Fc. Als Kontrolle dient Überstand aus nicht transfizierten HEK 293-Zellen.

Für die Produktion und Isolierung von heterodimeren LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteinen wurde Klon Nr.12 aufgrund der hohen Proteinexpression des heterodimeren LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteins ausgewählt und im größeren Maßstab kultiviert (3.19.4-7). Die erste Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Rezeptorfusionsproteine erfolgte zunächst über eine Protein A-Säule von Pharmacia (3.22.9). Im Westernblot lassen sich dann mit Antikörper gegen die humane Immunglobulinkette die produzierten Rezeptorfusionsproteine nachweisen (3.22.1-8). Diese wurden zur Identifizierung mit CNTFR $\alpha$ -Fc und gp130-Fc Untereinheiten verglichen (Abb.23).



**Abb.23 Protein A-Säule aufgereinigter K12-Überstand.**

Im Eluat (K12) lassen sich über Western-Blot Analyse eine ca. 180kDa (LIFR $\beta$ -Fc) und 140kDa (gp130-Fc) große Bande detektieren. In der Kontrolle ist ein heterodimeres Rezeptorfusionsprotein aus CNTFR $\alpha$ - (90kDa) /gp130-Fc aufgetragen.

In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurden die Immunglobuline aus dem K12-Zellüberstand über Ni<sup>2+</sup>-Säulen aufgereinigt (3.22.10), wodurch eine weitere Aufkonzentrierung und Aufreinigung der Rezeptorfusionsproteine erfolgt. Bei diesem Schritt wird das homodimere LIFR $\beta$ /LIFR $\beta$ -Rezeptorfusionsprotein von den restlichen Rezeptorfusionsproteinen und von Serumantikörpern abgetrennt. Das aufgereinigte Konzentrat enthält somit eine hohe Konzentration an heterodimerem LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein und das homodimere gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein.

### 4.5.5. Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen

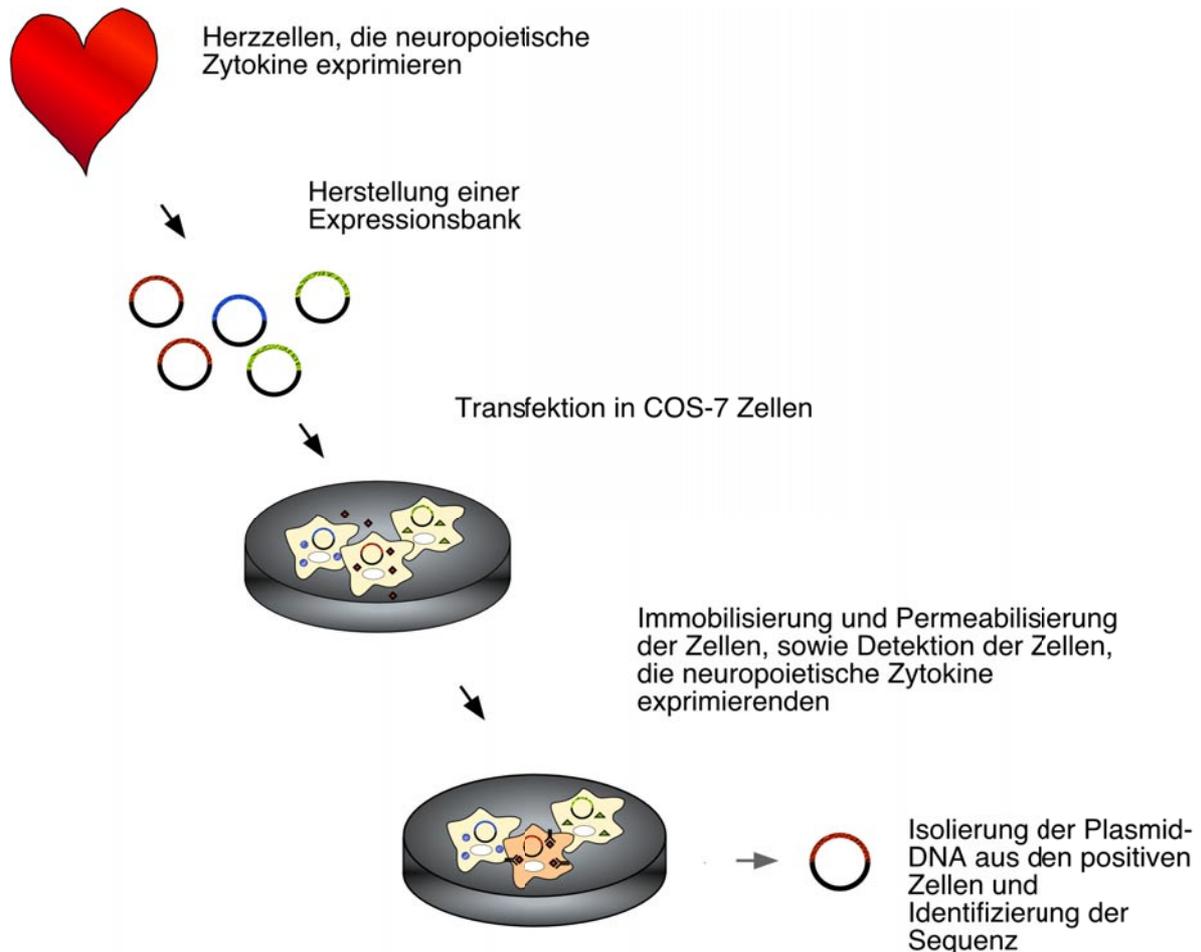
#### 4.5.5a. Vorarbeiten

Zur Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen ist Zielgewebe erforderlich, das eine VIP-induzierende Aktivität produziert. Eine solche Quelle sind kultivierte Herzzellen. Sie produzieren in Kultur einen oder mehrere sekretierte, VIP-induzierende Faktoren (HCM),

deren Aktivität sich weder durch einen CNTF-Antagonisten, noch durch CNTFR $\alpha$  antisense RNA blockieren lassen (Geissen, unveröffentlicht). Daraus folgt, daß diese VIP-induzierende Aktivität nicht das CNTF-verwandte Huhn-Zytokin GPA darstellt. Zur Herstellung einer HCM-Expressionsbank wurde von Markus Geißen Herzen von 7 Tagen alten Embryonen in Kultur genommen und das gewonnene, konditionierte Kultivierungsmedium auf seinen VIP-induzierenden Effekt hin getestet. Nach dem gewährleistet ist, daß die Herzzellen diese VIP-induzierenden Faktoren exprimieren, wurde die Gesamt-RNA aus diesen Zellen isoliert (Abb.24). Die weiteren Prozeduren, wie cDNA-Synthese, Subklonierung in den pcDNA3.1-Expressionsvektor und Qualitätskontrolle der mittleren Insertgrößen, die zur Herstellung der HCM-Expressionsbank notwendig waren, wurden von der Firma Scinet (Scinet Bioproducts GmbH, 2.4.1) ausgeführt.

Die HCM-Expressionsbank hat einen Primärtiter von  $3,8 \times 10^5$  cfu und eine mittlere Insertgröße von 1,58kb. Gene, die über den pcDNA3.1-Vektor exprimiert werden, müssen einen eigenen Translationsstartpunkt mitbringen und im richtigen Leserahmen vorliegen.

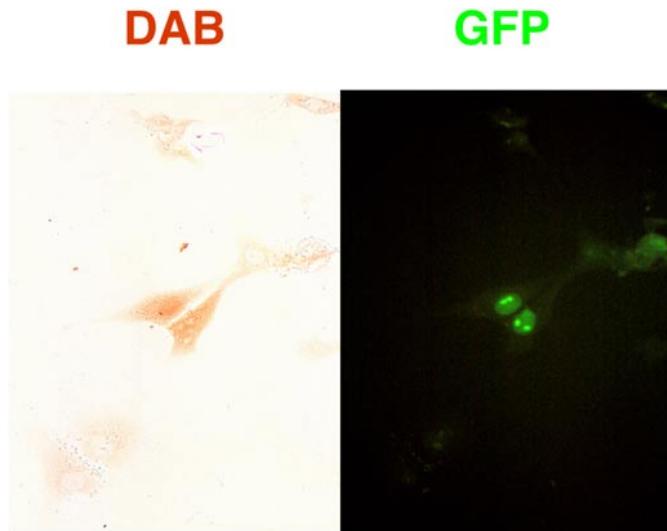
Die Durchsuchung der HCM-Expressionsbank sollte mit dem von Davis et al., (1996) etablierten „Secretion-Trap Expression Cloning“-Verfahren durchgeführt werden. Hierbei werden über dimere Rezeptor-Antikörper-Fusionsproteine (Rezeptorfusionsprotein) unbekannte Liganden in COS-7 Zellen detektiert, die zuvor mit einer Expressionsbank transfiziert worden sind (Abb.24). Besonderheit dieses Verfahrens ist die Möglichkeit, einen unbekanntem sekretierten Faktor noch während des Transports aus den Zellen zu detektieren. Zunächst war es erforderlich, die „Secretion-Trap Expression Cloning“-Methode (Davis et al., 1996) an Hand eines bekannten Zytokins zu etablieren. In Vorexperimenten, parallel zur Herstellung des LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteins, wurden Bedingungen definiert, um das Zytokin GPA in COS-7 Zellen mit dem GPA-spezifischen, aufgereinigten CNTFR $\alpha$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein zu detektieren. Hierzu wurde ein für GPA kodierendes Fragment in den eukaryontischen Expressionsvektor pCDNA 3.1 subkloniert, der für die Herzzellen der Bank verwendet wurde. Dieser Schritt war notwendig, um ein Expressionsniveau zu erhalten wie in der HCM-(pCDNA3.1) Expressionsbank.



**Abb.24 Modell des Expressions-Screens mit dem LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein.** Eine HCM-Expressionsbank in pcDNA3.1 wurde in COS-7 Zellen transfiziert. Nach drei Kultivierungstagen werden die Zellen fixiert. Die Detektion der Zellen, die neuropoietische Zytokine exprimieren, erfolgt mit Hilfe eines LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteins. Eine angeschlossene Immunfärbung mit HRP-gekoppelten Fc-Antikörpern macht die positiven Zellen sichtbar. Im letzten Schritt wird die Plasmidinformaton aus den positiven Zellen ermittelt.

Die anschließende Transfektion von 4 $\mu$ g Plasmid-DNA mit 1 $\mu$ g GFP-Plasmid, soll eine hohe Kotransfektion von GFP-exprimierenden Zellen mit GPA-Plasmid gewährleisten. Die Transfektion der Plasmide erfolgt in einer 10 cm Schale mit ca.  $1 \times 10^7$ -Zellen. Nach zwei Kultivierungstagen wurde eine DAB-Färbung (3.22.11) durchgeführt, wobei das GPA-spezifische Rezeptorfusionsprotein zur Detektion GPA-exprimierender Zellen verwendet wurde. Eine Zählung zeigt, daß 72% der GFP-positiven Zellen zugleich DAB-positiv sind (Abb.25). Dies deutet darauf hin, daß es sich bei den meisten DAB-positiven Zellen um GPA-exprimierende Zellen handelt. Kontrolltransfektionen mit 1 $\mu$ g GFP-Plasmid zeigen hingegen, daß ca.12% der GFP-positiven Zellen als DAB-positiv gewertet werden. Auffällig ist, daß diese positiv gefärbten Zellen häufig abgerundet und lädiert erscheinen. Eine mögliche Erklärung ist, daß Antikörper sich in den toten, bzw. geschädigten Zellen ansammeln können

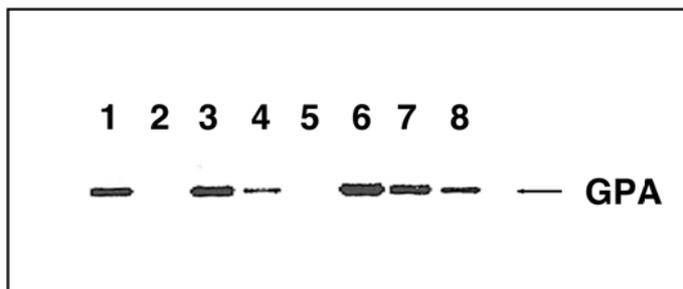
und später relativ schlecht wieder ausgewaschen werden. Daher wurden diese gefärbten, morphologisch erkennbar geschädigten Zellen in den folgenden Versuchen ignoriert



**Abb.25 Detektion von GPA- und GFP-exprimierenden COS-7-Zellen.**

COS-7-Zellen wurden mit einem GPA und GFP/NLS (nuclear localisation sequence)-Expressionsvektor (5:1) kotransfiziert und nach drei Kultivierungstagen über ein CNTFR $\alpha$ -gp130-Rezeptorfusionsprotein detektiert. Es finden sich stark braune, DAB-positive Zellen, die gleichzeitig ein kernlokalisiertes GFP exprimieren.

Um nun herauszufinden, ob bei der GFP/GPA-Kotransfektion die gefärbten Zellen zumindest ein GPA-Plasmid besitzen, wurden diese mit einem Zahnstocher mechanisch von der Schale abgekratzt und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 70%igem Ethanol überführt. Anschließend wurde nach Entfernung des Ethanols bei 95°C eine direkte PCR auf Zellen durchgeführt (3.16.2). Die Untersuchung dieser Zellen über direkte PCR mit GPA-spezifischen Primern (3.16.2) zeigt, daß 6 von 8 isolierten DAB-positiven Zellen eine GPA-spezifische Bande aufweisen (Abb.26). Die Subklonierung der PCR-Banden (3.16.3) und anschließende Sequenzanalyse bestätigen die Banden als GPA-Fragmente.



**Abb.26 Detektion von GPA in DAB-positiven Zellen.** DAB-gefärbte Zellen wurden isoliert, in 70% Ethanol aufgenommen und eingedampft. Die Anwesenheit von GPA-Plasmid wurde über direkte PCR mit GPA-spezifischen Primern nachgewiesen.

Die Tatsache, daß 75% (6 von 8) der isolierten DAB-positiven Zellen zumindest ein GPA-Plasmid enthält, spricht für den Erfolg dieser Methode. Gleichzeitig deutet das Resultat darauf hin, daß mit diesem Analyseverfahren mit einer minimalen Fehlerquote von 25% zu rechnen ist. Hierbei kann nicht unterschieden werden, ob die mechanische Isolierung der Zellen, die

weitere PCR-Amplifikation nach Zellaufschluß oder die Hintergrundfärbung die Hauptursache ist für die relativ hohe Anzahl an falsch-positiven Zellen.

Zur Abschätzung, ob die Transfektion mit der HCM-Expressionsbank einen Einfluß auf die Anzahl der falsch-positiven Klone, sowie die Identifizierung der Klone hat, wurde der GPA-Expressionsvektor mit der HCM-Expressionsbank (1:500) verdünnt. Gleichzeitig wurden verschiedene Verfahren zur Isolation und Analyse der DAB-positiven Zellen getestet, indem eine direkte PCR mit Insert-flankierenden Primern (3.16.2) auf DAB-positiven Zellen durchgeführt wurde. Als Resultat wurden neben der GPA-spezifischen Bande bis zu drei weitere Banden pro GPA-positiver isolierter Zelle gefunden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß während der Transfektionsprozedur entweder mehrere Plasmide in eine Zelle gelangen, oder durch die Zell-Isolierungsprozedur beim Ablösen der Zellen gleich mehrere transfizierte Zellen aufgenommen werden. Für die Kotransfektion mit mehreren Plasmiden sprechen vor allem die unterschiedlich starken Banden, die bei der direkten PCR auf GPA-transfizierte, DAB-positive Zellen auftreten (Abb.26).

Die Vorexperimente zeigten insgesamt, daß die Detektion von Zytokin-exprimierenden Zellen mit spezifischen Rezeptorfusionsproteinen möglich ist. Es muß jedoch mit einer hohen Fehlerquote beim Detektieren, Isolieren und Identifizieren der positiven Zellen von mind. 25% gerechnet werden. Des Weiteren ist eine Mehrfachtransfektion mit verschiedenen Plasmiden möglich, welche die Identifizierung der Klone über PCR-Amplifikation und direkter Sequenzierung verhindert. Aus diesem Grund wurde ein neuer Ansatz gewählt, um die positiven Klone zu identifizieren und um gleichzeitig die Anzahl falsch-positiver Klone zu verringern.

### 4.5.5b. Screen

Der erste Screen nach Zytokinen in der HCM-Expressionsbank wurde mit der aufgereinigten Rezeptorfusionsprotein-Mischung aus dem heterodimeren LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein und dem homodimeren gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein durchgeführt, wobei die Detektion von Zytokinen, die an einen homodimeren gp130/gp130 Rezeptorkomplex binden, als erwünscht in Kauf genommen wurde. Es wurden jeweils 1 $\mu$ g HCM-Expressionsbank pro 10 cm Schale (70% konfluent) mit ca.  $1 \times 10^7$ -Zellen transfiziert (3.19.7). Die Transfektion einer geringen DNA-Menge auf eine relativ hohe Zellzahl, sollte eine mögliche Kotransfektion mit mehreren Plasmiden vermeiden. (Sie wurde auch in dieser Form in der Originalarbeit durchgeführt, Davis et al., 1996).

Die HCM-Bank hat einen Primärtiter von  $3,8 \times 10^5$  cfu. Dies entspricht einer möglichen Komplexität von  $3,8 \times 10^5$  unabhängigen Klonen. In  $1 \mu\text{g}$  der HCM-Bank mit einer mittleren Insertgröße von  $1,6 \text{ kb}$  und einer Vektorgröße von ca.  $5,4 \text{ kb}$  sind etwa  $9 \times 10^{10}$  Plasmidmoleküle enthalten (ein  $7 \text{ kb}$  großes DNA-Fragment hat ein Molekulargewicht von ca.  $4,45 \times 10^6 \text{ Da}$ ). Somit ist die Expressionsbank  $2,4 \times 10^5$  fach in  $1 \mu\text{g}$  HCM-Bank enthalten. Geht man nun von einer mittleren Transfektionseffizienz von  $1:1 \times 10^6$  Molekülen aus (die Angaben für die Transfektionseffizienz wurden aus der Produktbeschreibung 2003 für das Effektene-Transfektionssystem von Qiagen abgeleitet), so müßte man insgesamt  $4 \mu\text{g}$  HCM-Bank transformieren, um die Expression aller vorhandenen Moleküle zu gewährleisten. Diese Rechnung gilt nur für den Fall, wenn das gesuchte Molekül nur einmal in der HCM-Bank vertreten ist. Da man davon ausgehen kann, daß das gesuchte Molekül mehrfach in der HCM-Bank vertreten ist, wurde die HCM-Bank für die erste Suchrunde nur einfach transformiert. (Für diese Vorgehensweise spricht vor allem das zeitraubende Suchen nach den DAB-positiven Zellen auf den  $10 \text{ cm}$  Schalen). Die mittels aufgereinigter Rezeptorfusionsproteine über Immunfärbung (3.22.11) detektierten DAB-positiven Zellen wurden zu Pools von 10 bis 15 Klonen vereinigt, die Plasmid-DNA isoliert (3.1.3), in den *E. coli* Stamm XL1-blue elektroporiert (3.13) und der gesamte Elektroporationsansatz in Flüssigkultur angezogen. Auf das Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf Agarplatten und Isolation einzelner Kolonien wurde verzichtet, da die transfizierten Bakterien generell langsam wuchsen (1,5-2 Tage) und die Unterscheidung von langsam wachsenden plasmidtragenden Kolonien und Satellitenkolonien ist nach diesem Zeitraum nicht möglich war. Die Analyse eines solchen Ansatzes hätte zu einer hohen Zahl nicht anwachsender Flüssigkulturen geführt.

Nach der Isolierung der Plasmid-DNA (3.1) wurde diese erneut in COS-7 Zellen transfiziert (3.14.7) und der Detektion mit den Rezeptorfusionsproteinen unterzogen. Dieser Schritt dient der Verifizierung positiver Klone, d.h. Pools die positive Klone enthalten sollten nach der zweiten Runde eine Anreicherung zeigen. Des Weiteren werden Mehrfachtransfektion mit unterschiedlichen Plasmiden reduzieren. Nach erneutem Poolen der DAB-positiven Zellen, Isolation der Plasmid-DNA (3.1), Retransformation in Bakterien und Isolation einzelner Bakterienklone, können die unterschiedlichen Expressionskonstrukte voneinander getrennt werden. Danach erfolgt eine grobe Unterscheidung einzelner Bakterienklone durch Linealisierung der Plasmid-DNA über eine plasmidinterne Restriktionsschnittstelle (*EcoRI*) (3.5) und Analyse im Agarosegel (3.9). Die anschließende Sequenzierung (3.17) dieser Klone läßt nun eine letztendliche Identifikation zu. Zur Überprüfung wurden die einzelnen Klone nochmals in COS-7 Zellen transformiert (3.19.7) und mittels Rezeptorfusionsprotein-

vermittelter DAB-Färbung detektiert (3.22.11). Das Resultat dieses ersten Screens sind 12 Klone, wovon einige bisher sequenziert werden konnten (Abb.27). Keines der gefundenen Gene hat jedoch eine Ähnlichkeit zu bisher bekannten neuropoetischen Zytokinen.

a) Popeye :	- wird in Skelettmuskel und Herzen exprimiert - tritt in verschiedenen Splice-Varianten auf
b) Cytochrom C Oxidase: (II. Untereinheit)	- katalytische Untereinheit der Cytochrom C-Oxidase
c) unbekanntes UBX-Protein:	- enthält Ubiquitinulierungs-Motiv

**Abb.28 Ergebnis des ersten Screens.** Kurze Beschreibung der gefundenen Gene.

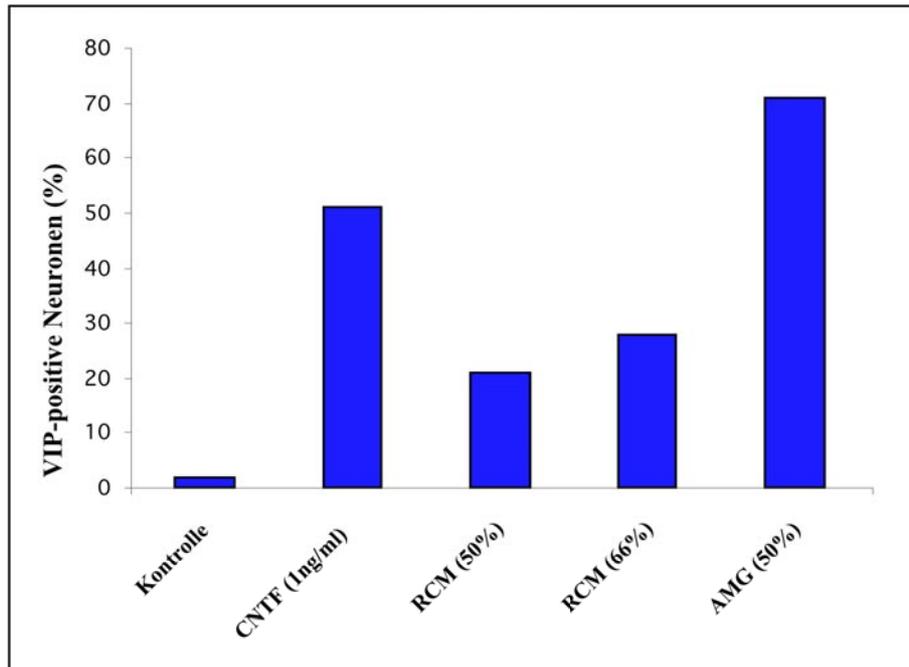
### **4.6 Suche nach weiteren Quellen für VIP-induzierende Aktivitäten**

HCM ist bisher die einzige bekannte und gut charakterisierte Quelle für ein, von GPA verschiedenes VIP-induzierendes neuropoetisches Zytokin im Huhn. Falls die Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen mit der „Secretion-Trap Expression Cloning“-Methode erfolgreich ist, so kann diese Methode dazu angewendet werden, weitere VIP-induzierende Aktivitäten zu identifizieren. Daher erscheint es sinnvoll, nach weiteren Quellen für VIP-induzierende Faktoren und damit potentielle cholinerge Differenzierungsfaktoren Ausschau zu halten und diese zu charakterisieren.

4.6.1 Identifizierung einer weiteren VIP-induzierenden Aktivität in Überständen von kultivierten Retina- und Müllergliazellen.

Reis et al. beschrieben 2002, daß undefinierte Faktoren in Überständen von kultivierten Retinazellen (RCM) und Müllergliazellen (AMG) das Überleben von sympathischen Neuronen stimulieren. Die Inhibition des Zytokin-vermittelten STAT-Signalweges führte zu einer Hemmung des Überlebenseffekts und legt nahe, daß es sich bei dem Faktor um ein Mitglied der IL-6-Zytokinfamilie handelt. GPA wurde jedoch als Bestandteil dieser Aktivität ausgeschlossen, da blockierende anti-CNTF-Antikörper den Überlebenseffekt nicht hemmen. Im Rahmen der Kooperation erhielten wir diese konditionierten Medienüberstände

von Retinazellen und Müllergliazellen. Beide Überstände induzieren dosisabhängig die VIP-Expression in sympathischen Neuronen (Abb.29). Bei einem Anteil von 50% am Kultivierungsmedium induzierte AMG in 71% der Zellen eine VIP-Expression, mit RCM hingegen nur in 21% der Zellen. Somit enthält AMG eine hohe Konzentration VIP-induzierender Faktoren. Im Vergleich dazu erhält man ca. 50% VIP-positiver Neuronen bei Induktion mit 1ng/ml CNTF und 0,5ng/ml GPA (Geissen et al., 1998).



**Abb.29 VIP-induzierender Effekt von RCM und AMG.** E7 sympathische Neuronen wurden in Kultur genommen und die VIP-Expression mit unterschiedlichen Konzentrationen an RCM (konditioniertes Retinazellmedium), AMG (konditioniertes Müllergliazellmedium) bzw. CNTF stimuliert.

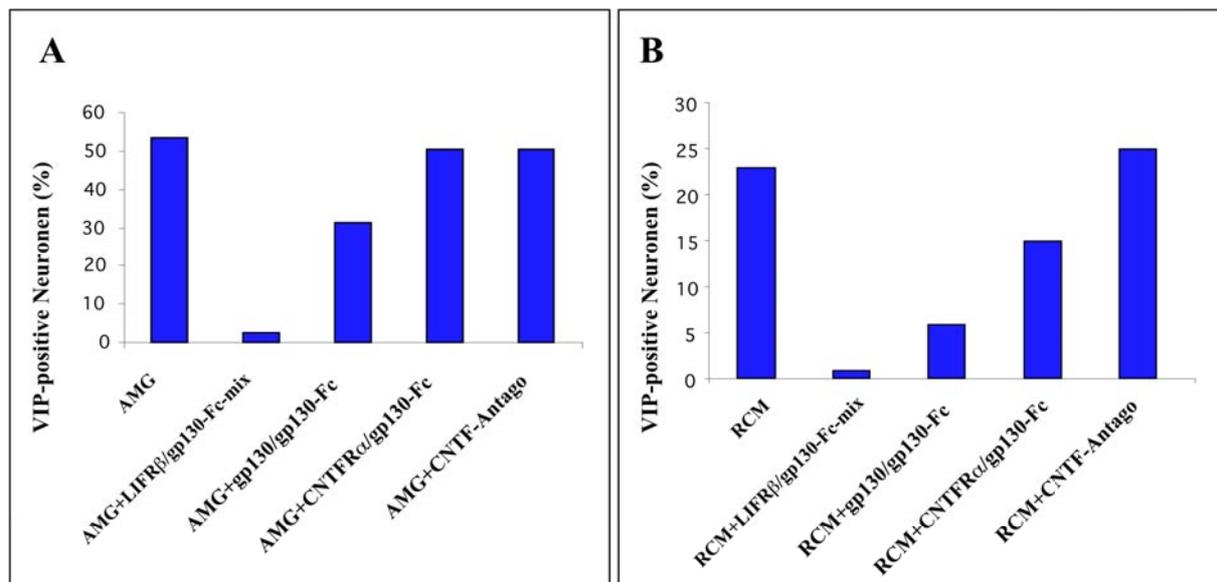
### 4.6.2 Charakterisierung der VIP-induzierenden Aktivität in AMG

Es wurde zunächst überprüft, ob GPA Bestandteil dieser VIP-induzierenden Aktivität ist. Sowohl die Blockierung mit aufgereinigten GPA-spezifischen heterodimeren CNTFR $\alpha$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein, als auch die Verwendung eines CNTF-Antagonisten hat keinen Einfluß auf die VIP-Induktion durch AMG. Dies schließt nun die Präsenz von GPA in AMG aus und steht im Einklang mit den vorangegangenen GPA-Blockierungsversuchen (Reis et al., 2002).

Des Weiteren sollte diese Aktivität über die unterschiedlichen Rezeptorfusionsproteine charakterisiert werden. Die Blockierung mit homodimeren gp130/gp130 Rezeptorfusionsprotein-enthaltenden Überständen führen zu einer Reduzierung des Anteil

## Ergebnisse

VIP-positiver Neuronen von ca. 52% auf 30%. Dies deutet darauf hin, daß in AMG Faktoren enthalten sind, die über einen homodimeren gp130/gp130 Rezeptorkomplex wirken. Die Zugabe einer Mischung aus allen dimeren Rezeptorfusionsproteinformen, bewirkte eine völlige Reduzierung des Anteils VIP-positiver Neuronen (Abb.30A). Dieses Resultat ist ein Indikator für die Anwesenheit eines weiteren Faktors in AMG, der an den heterodimeren Rezeptorkomplex aus LIFR $\beta$  und gp130 bindet. Nicht auszuschließen ist auch die Anwesenheit nur eines einzigen Zytokins, das mit unterschiedlicher Affinität an das homodimere gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein und das heterodimere LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein bindet. Untersuchungen an Maus-Retinazellen unterstreichen jedoch die Anwesenheit zweier Faktoren aus der IL-6-Zytokinfamilie (Reis, unveröffentlicht). Vorversuche mit RCM deuten auf einen ähnlichen Zusammenhang, wie bei AMG (Abb.30B). In diesem Fall läßt sich der VIP-induzierende Effekt mit homodimeren gp130/gp130-Rezeptorfusionsprotein-enthaltenden Überständen um 74% und mit einer Mischung aus allen dimeren Rezeptorfusionsprotein-Formen vollständig blockieren. Eine schwache Hemmung von 40% konnte auch mit dem heterodimeren CNTFR $\alpha$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein bewirkt werden, jedoch muß die Signifikanz dieser Resultate durch weitere Experimente bestätigt werden (bisher wurde der Versuch nur einmal durchgeführt, da der Vorrat an RCM limitiert war).



**Abb.30 Blockierung der VIP-induzierenden Faktoren in AMG (A) und RCM (B).** E7 sympathische Neuronen wurden mit AMG und RCM stimuliert. Diese VIP-induzierende Aktivität wurde dann mit unterschiedlichen GPA-blockierenden Antagonisten und Rezeptorfusionsproteine-enthaltenden Überständen blockiert.

## 5. Diskussion

### *5.1 Die Rolle von neuropoietischen Zytokinen bei der VIP-Induktion in cholinergen sympathischen Neuronen*

Cholinerge sympathische Neuronen gehen aus noradrenergen sympathischen Neuronen hervor. Im Laufe ihrer Entwicklung exprimieren sie zunächst noradrenerge Markergene, wie z.B. Tyrosinhydroxylase (TH), das Schrittmacherenzym der Catecholamin-Biosynthese. Die cholinerge Differenzierung verläuft im Huhn in zwei Schritten, dabei werden zunächst unabhängig vom Zielgebiet die cholinergen Markergene Cholin-Acetyltransferase (ChAT) und vesikulärer Acetylcholin-Transporter (VACht) induziert und später das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), das zur Familie der neuroaktiven Peptide zählt. VIP wird erst ab Embryonaltag 10 exprimiert, nach Innervierung der Zielgewebe. Der Kontakt zum Zielgewebe ist essentiell für die Ausbildung des reifen cholinergen Phänotyps, bzw. für die Expression von VIP. Man geht davon aus, daß das Zielgewebe einen Faktor sezerniert, der den Phänotypwechsel von noradrenerg zu cholinerg induziert. Bei Säugern und im Huhn sind zahlreiche neuroregulatorische Faktoren bekannt (neuropoietische Zytokine), die *in vitro* in der Lage sind, die cholinerge Differenzierung sympathischer Neuronen zu induzieren. Hierzu gehören die Faktoren Leukämie inhibierender Faktor (LIF), Ziliarneuronen-Überlebensfaktor (CNTF), Kardiotrophin-ähnliches Zytokin/Zytokin-ähnlicher Faktor-1 (CLC/CLF-1), Kardiotrophin-1 (CT-1), Oncostatin M (OSM) und Interleukin-6 (IL-6). Im Huhn wurde bislang nur *ein* einziges neuropoietisches Zytokin identifiziert, das als Wachstumsfördernde Aktivität (GPA) bezeichnet wird. Alle diese Faktoren haben eine ähnliche 3D-Proteinstruktur und einen ähnlichen Signaltransduktionsweg. Die Rezeptoren dieser Faktoren verwenden alle gp130 zur Signaltransduktion, und mit Ausnahme von OSM und IL-6, setzen sie LIFR $\beta$  als zweite signaltransduzierende Untereinheit ein. Alle bisher bekannten neuropoietischen Zytokine zeigen zwar induktive Aktivität *in vitro*, eine Beteiligung bei der cholinergen Differenzierung *in vivo* wurde jedoch für die einzelnen Faktoren, bei den untersuchten Säugermodellen, ausgeschlossen (Habecker et al., 1997). Jedoch wurde im Hühnerembryo bereits gezeigt, daß die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit gp130 essentiell für die VIP-Expression ist (Geissen et al., 1998). Diese Resultate lassen auf einen bisher noch unbekanntem gp130 Liganden schließen, der die cholinerge Differenzierung *in vivo* reguliert (Landis, 1996; Habecker et al, 1997; Geissen et al., 1998). Die Frage nach dem für die

cholinerge Differenzierung relevanten unbekanntem neuropoietischen Zytokin kann eingegrenzt werden, wenn bekannt ist, welche signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten neben gp130 bei diesem Prozeß involviert sind. *In vitro*-Studien sprechen für eine Beteiligung des LIFR $\beta$  bei diesem Prozeß (Habecker et al., 1997). *In vivo* konnten diese Resultate bisher noch nicht durch die Analyse LIFR $\beta$ -defizienter Tiere verifiziert werden, da homozygote Tiere noch vor dem Zeitpunkt, an dem die sympathischen Neuronen ihre Zielgebiete innervieren, sterben (Ware et al., 1995; Guidry und Landis, 1998). Diese Frage kann im Huhnssystem durch die räumlich begrenzte Hemmung der LIFR $\beta$ -Expression durch LIFR $\beta$  antisense mRNA geklärt werden.

Die Vorarbeit dieser Untersuchung erforderte zunächst die Klonierung des LIFR $\beta$ -Homologs aus Huhn. Die klonierte cDNA Sequenz ist hoch konserviert im Vergleich zu den bekannten LIFR $\beta$ -Homologen (Gearing et al., 1991; Tomida, 1995). Die Proteinsequenz ist zu 51% identisch mit der humanen Sequenz und zu 49% identisch mit der Maus LIFR $\beta$ -Sequenz. Das geklonte Huhn-Gen zeigt auch eine geringe Homologie zu OSMR $\beta$  (Human 32%, (Mosley et al., 1996); Maus 31%, (Tanaka et al., 1999). Die Anzahl der WSXWS-Motive, sowie die hoch konservierte cytoplasmatische Region sind charakteristisch für den LIFR $\beta$  (Bazan, 1990), aber nicht für den OSMR $\beta$ . Daher kann von einer erfolgreichen Klonierung des Huhn LIFR $\beta$  ausgegangen werden.

Ein erster Anhaltspunkt für eine mögliche Funktion des LIFR $\beta$  bei der Differenzierung sympathischer Neuronen ist die Präsenz des Rezeptors in den entsprechenden Geweben zum Zeitpunkt des cholinergen Phänotypwechsels. Die ersten VIP-positiven sympathischen Neuronen sind im Hühnerembryo am Embryonaltag 10 unter Verwendung von immunohistochemischen Methoden nachweisbar (New und Mudge, 1986, Ernsberger et al., 1997). Bereits an E7 wird der LIFR $\beta$  und gp130 in den sich entwickelnden sympathischen Neuronen exprimiert (Ernsberger, unveröffentlicht, Duong, 1999, Geissen et al., 1998). Für die Anwesenheit eines funktionellen LIFR $\beta$  in den frühen Entwicklungsstadien sympathischer Neuronen spricht auch die Tatsache, daß die VIP-Expression in E7 sympathischen Neuronen durch Applikation von CNTF bzw. GPA induziert werden kann (Ernsberger et al., 1989; Heller et al., 1995; Geissen et al., 1998). Diese Reaktion auf GPA/CNTF setzt das Vorkommen von LIFR $\beta$  als signaltransduzierende Untereinheit voraus. Die Beteiligung von gp130 bei der Induktion von VIP, die Expression von LIFR $\beta$  in sympathischen Ganglien und die Funktionsfähigkeit des LIFR $\beta$  *in vitro* lassen den Rückschluß zu, daß der LIFR $\beta$  zum Zeitpunkt der VIP-Induktion in sympathischen Neuronen präsent ist und an deren Differenzierung beteiligt sein kann. Da die *in vivo*-Relevanz von LIFR $\beta$  bei der

## Diskussion

---

Differenzierung cholinergischer sympathischer Neuronen in LIFR $\beta$ -defizienten Tieren nicht geklärt werden konnte, war es sinnvoll mit der Expression von LIFR $\beta$  *in vivo*, lokal begrenzt zu interferieren. Die „Antisense-Technik“ hat sich schon in ähnlichen Fragestellungen im Hühnermodell bewährt, in denen gezielt die Signaltransduktion bestimmter Rezeptoruntereinheiten *in vitro* und *in vivo* blockiert wurde (Heller et al., 1995; Geissen et al., 1998). Antisense RNA ist Bestandteil der normalen Genregulation (Vanhee-Brossollet und Vaquero, 1998). Mindestens 2% von 12.897 humanen mRNAs in der RefSeq-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/refseq.html>) haben einen antisense Partner. Daraus wurde extrapoliert, daß für das humane Genom mit ca. 40.000 kodierenden Genen etwa 800 natürliche antisense Transkripte existieren (Lehner et al., 2002).

Experimentelle Studien haben gezeigt, daß natürliche antisense RNA über diverse Mechanismen wirkt, z.B. Degradierung der Ziel-mRNA, Regulation des Splicing-Prozesses der Pre-mRNA oder der Kontrolle der Translation. Zudem können längere RNA Moleküle einen stabilen RNA/RNA Duplex ausbilden, der die Elongation blockiert (Übersicht in Vanhee-Brossollet und Vaquero, 1998; Dagle und Weeks, 2001). Ebenfalls ist durch den stabilen RNA/RNA Duplex ein Wirkungsmechanismus über die RNA-Interferenz-(RNAi) Mechanismen denkbar (Zamore, 2001, Martinez et al., 2002). Unter RNAi versteht man das Phänomen, daß doppelsträngige RNA in der Lage ist die endogene Genexpression spezifisch zu reprimieren (Sharp, 1999). Längere und kurze (si, small interfering) doppelsträngige RNAi wird erst seit kurzem im Huhn als effektives Tool für Geninaktivierungen verwendet (Hu et al., 2002; Pekarik et al., 2002). Die vektorvermittelte Expression von antisense RNA *in vivo* macht sich diese Mechanismen zu Nutze, um gezielt Genexpression zu reprimieren. Da die antisense RNA von den Zellen selbst synthetisiert wird, sind keine unspezifischen Nebenreaktionen zu erwarten, wie sie häufig beim Einsatz von chemisch modifizierten antisense Oligonukleotiden auftreten können. Diese Modifikationen stabilisieren die Oligonukleotide und schützen sie vor Abbau durch RNasen. (Übersicht in Stein und Krieg, 1994). Für die *in ovo*-Untersuchung der späteren cholinergen Differenzierung erscheinen modifizierte Oligonukleotide, sowie synthetische „small interfering RNA“ (siRNA) jedoch ungeeignet. Ein Zugriff auf die sympathischen Vorläuferzellen wäre etwa an E2 möglich, indem z.B. siRNA durch Elektroporation in die Neuralleistenzellen eingebracht wird (Hu et al., 2002). Der Effekt von siRNA wäre jedoch zum einen räumlich, etwa durch den Elektroporationsbereich, und zeitlich 2-4 Tage nach Elektroporation sehr eingeschränkt (Hu et al., 2002). Eine mehrmalige Applikationen der siRNA wäre in jedem Falle erforderlich, um die Expression des LIFR $\beta$  in der Phase der Zielgebietsinnervation zu blockieren (ab E8). Das

wird jedoch aufgrund der Unzugänglichkeit der sympathischen Ketten in älteren Embryonen verhindert. Die genannten Schwierigkeiten können im Hühnerembryo durch Einsatz eines replizierenden retroviralen RCASB-Virus (Morhan und Fekete, 1996) umgangen werden. Nach einmaligem Einbringen des Virus in den Embryo, breitet sich dieser mit der Zeit selbständig aus und führt zu Infektion eines großen Teils der Zellen in der Umgebung der Implantationsstelle. Vor allem jedoch integriert der Virus in das Genom seiner Wirtszelle und induziert die Transkription seiner eingebrachten Gene. Die „Antisense-Technik“ hat jedoch auch gewisse Nachteile. Oft zeigen antisense RNA-Konstrukte keine Effekte, bzw. das entsprechende sense RNA-Konstrukt ebenfalls inhibierende Effekte. Aus diesen Gründen ist es sinnvoll, diese RNA-Konstrukte in einem *in vitro*-Assay zu testen. Dies hat den Vorteil, daß die Versuchsbedingungen in einem kontrollierten Rahmen stattfinden. Des Weiteren lassen sich theoretisch mit einem geringem Arbeitsaufwand viele antisense RNA-Konstrukte in kurzer Zeit auf ihre Eignung hin überprüfen.

*In vitro*-Untersuchungen an fünf verschiedenen LIFR $\beta$ -RNA-Konstrukten zeigten, daß lediglich ein RNA-Konstrukt in der Lage ist, mit der CNTF-induzierten VIP-Expression in kultivierten sympathischen Neuronen zu interferieren. Der Effekt von LIFR $\beta$  antisense RNA *in vitro* ist eine zwar relativ geringe, jedoch signifikante Reduktion der VIP-Expression im Vergleich zur LIFR $\beta$  sense RNA und zur Kontrolle ( $p < 0,001$ , zweiseitiger T-Test). Eine mögliche Begründung für den relativ geringen Effekt ist, daß in dem kurzen Zeitintervall des Zellkulturversuches eine vollständige Reduktion der VIP-Induktion mit LIFR $\beta$  antisense RNA nicht möglich ist, da lediglich die Neusynthese von Rezeptoren durch LIFR $\beta$  antisense RNA verhindert werden kann. Rezeptoren, die sich in der Plasmamembran, im endoplasmatischen Reticulum oder/und im Golgi befinden, werden durch LIFR $\beta$  antisense RNA nicht beeinflusst. Die beobachtete Reduktion liegt jedoch im Rahmen von vorangegangenen antisense RNA-Experimenten mit diesem Kultursystem (Heller et al., 1995; Geissen et al., 1998).

Aus diesen Gründen war das entsprechende RNA-Konstrukt für die *in vivo* Applikation geeignet und wurde in sense und antisense Orientierung, unter Verwendung des RCAS(B)-Virusvektors, exprimiert. Die Implantation von Virus-infizierten DF1-Zellen in den Migrationsweg der wandernden Neuralleistenzellen führte bis E13/14 zu einer großräumigen Infektion des Hühnerembryos, einschließlich der sympathischen Ganglien. Nur in seltenen Fällen wurden die DRGs infiziert, während das Rückenmark nie infiziert wurde. Daher konnten diese Gewebe zum Teil als internes Kontrollgewebe verwendet werden.

## Diskussion

---

Ein erstes Indiz für die Wirksamkeit der LIFR $\beta$  antisense RNA ist, daß in antisense-infizierten sympathischen Ganglien die LIFR $\beta$ -Expression reduziert ist, im Gegensatz zu den nicht infizierten sympathischen Ganglien und DRGs.

Da der LIFR $\beta$  in der Mehrzahl, wenn nicht in allen peripheren sympathischen Neuronen durch *In situ*-Hybridisierung detektierbar war (Duong, 1999; Ernsberger, unveröffentlicht), stellt sich die Frage, ob die Expression von LIFR $\beta$ -antisense RNA im sympathischen Ganglion einen Einfluß auf die generelle und speziell die neuronale Differenzierung hat.

Gegen eine generelle Störung der Zelldifferenzierung oder einen massiven apoptotischen Effekt der LIFR $\beta$ -antisense RNA spricht die Tatsache, daß keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen, insbesondere des sich entwickelnden Nervensystems in antisense LIFR $\beta$  Embryonen zu beobachten war. Dies wurde durch Analyse des panneuronalen Markergens SCG10 in sympathischen Ganglien, DRG und Rückenmark bestätigt. Die Quantifizierung der Größe des sympathischen Ganglions an Hand der SCG10-Expression erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen LIFR $\beta$  antisense- und LIFR $\beta$  sense Embryonen. Die beobachtete Streuung der Ganglienflächen ist auf die Form der sympathischen Ganglien zurückzuführen. Die Ganglien stellen keine röhrenförmige Struktur gleichbleibenden Durchmessers dar, sondern liegen, ähnlich einer Perlenkette, ventrolateral neben der Wirbelsäule. Veränderungen in der Schnittebene erhöhen ebenfalls die Streuung der Meßwerte. Diese Einflüsse spiegeln sich dann in einer höheren Standardabweichungen wider. In vorangegangenen Studien, in denen der gp130 „knock down“ (Geissen et al., 1998) und LIFR $\beta$ -defiziente Mäuse (Stanke et al., 2000) untersucht wurden, wurde ebenfalls kein Effekt auf die Größe des sympathischen Ganglions beobachtet.

Im Gegensatz zu der normalen allgemeinen Entwicklung des sympathischen Ganglions, zeigt die cholinerge Neuronenpopulation eine starke Abnahme an VIP-exprimierenden Zellen, wohingegen die Anzahl ChAT positiver Zellen unverändert bleibt. VIP wird in cholinergen sympathischen Neuronen während der normalen embryonalen Entwicklung exprimiert, die gleichzeitig ChAT und VAcHT koexprimieren (Geissen et al., 1998; Ernsberger und Rohrer, 1999). Die reduzierte Anzahl VIP-exprimierender Zellen läßt sich daher nicht durch ein Absterben von VIP-positiven Neuronen erklären. Einen solchen Verlust von im Durchschnitt 100 Neuronen/mm<sup>2</sup> hätte sich in der Quantifizierung ChAT-positiver Neuronen wiedergespiegelt. Vielmehr deutet die unveränderte Anzahl ChAT-positiver Zellen in antisense LIFR $\beta$  Embryonen darauf hin, daß cholinerge Neuronen, die normalerweise VIP-exprimieren, noch vorhanden sind, aber aufgrund des Fehlens von LIFR $\beta$  kein VIP exprimieren.

## Diskussion

---

An E13/14 werden im sympathischen Ganglion im Durchschnitt eine geringere Anzahl VIP-positiver ( $160 \text{ Neuronen/mm}^2$ ), als ChAT-positiver Neuronen ( $340 \text{ Neuronen/mm}^2$ ) gefunden. Doppel-*In situ*-Hybridisierungen für VIP und ChAT an cervikalen und thorakalen Schnitten von E18 Kontrolltieren zeigen eine vollständige Koexpression von VIP und ChAT im cervikalen, als auch im thorakalen Bereich der sympathischen Ganglien. Daraus folgt, daß die im Vergleich zur ChAT-Expression geringere Anzahl VIP-exprimierender Neuronen an E13/14 auf eine kontinuierliche Zunahme der VIP-Expression, oder eine Abnahme der ChAT-Expression zwischen E13 und E18 zurückzuführen ist. Diese Resultate werden unterstützt von der Vorstellung eines zwei Schritte-Modells der cholinergen Differenzierung sympathischer Neuronen, das durch ein zeitlich versetztes Auftreten von ChAT/VACht und VIP während der embryonalen Entwicklung (Ernsberger et al., 1997; Ernsberger und Rohrer, 1999) impliziert wird.

Der Effekt der LIFR $\beta$  antisense Behandlung *in vivo* ist stärker als zuvor im Kulturexperiment. Dies ist vermutlich auf eine kontinuierliche Expression der antisense RNA in den infizierten Zellen zurückzuführen, die schon an E2 beginnen kann und sich letztendlich bis zur Analyse der Embryonen an E13/14 fortsetzt, was zu einer starken Reduzierung der LIFR $\beta$ -Expression führt. Die restlichen VIP-positiven Zellen in antisense LIFR $\beta$  Embryonen sind höchstwahrscheinlich auf nicht infizierte sympathische Neuronen zurückzuführen. Dies ist möglich, da die ersten sympathischen Vorläuferzellen zwischen E2 und E3 aus dem Zellzyklus austreten (Rothmann et al., 1978) und somit nicht vom Virus infiziert werden können. Des Weiteren kann die Virusinfektion zu spät erfolgen, so daß die LIFR $\beta$ -Expression in den entsprechenden Zellen nicht ausreichend gehemmt wird. Eine weitere, nicht auszuschließende alternative Möglichkeit wäre, daß in einer kleinen Minderheit von cholinergen sympathischen Neuronen die VIP-Expression durch andere Faktoren induziert wird, die nicht über gp130 und LIFR $\beta$  vermittelt wird.

Die Expression des frühen cholinergen Markergens ChAT in Abwesenheit der Rezeptoruntereinheiten LIFR $\beta$  und gp130 (Geissen et al., 1998) legt die Vermutung nahe, daß diese frühe cholinerge Induktion nicht durch neuropoietische Zytokine erfolgt. Es geht aus beiden Studien jedoch nicht hervor, ob zum Zeitpunkt der ChAT-Induktion die Signaltransduktion über die Rezeptoruntereinheiten ausreichend unterbunden werden konnte. Einer *in vivo* noch unbestätigte Kulturstudie zufolge ist Activin A, ein Mitglied der TGF $\beta$  Superfamilie, in der Lage, die Expression von ChAT, aber nicht von VIP in cholinergen sympathischen Neuronen zu induzieren (Fann und Patterson, 1994).

Andere Studien zeigen, daß c-Ret, die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit für GDNF, Neurturin (NTN), Artemin und Persephin, sowie der NT3 Rezeptor trkC in cholinergen sympathischen Neuronen zu einem Zeitpunkt exprimiert werden, an dem die unterschiedlichen noradrenergen und cholinergen Subpopulationen schon klar unterscheidbar sind (Ernsberger et al., 2000; Brodski et al., 2000). Somit können diese Faktoren an der cholinergen Differenzierung sympathischer Neuronen beteiligt sein. Auch wenn bereits bekannt ist, daß NT3 (Brodski et al., 2000), sowie GDNF und NTN (Brodski et al., 2002) in der Lage sind die ChAT-Expression in Explantkulturen von E12 sympathischen Ganglien zu induzieren, ist noch ungewiß, ob dieser Effekt auch an E7 zu beobachten ist, zum Zeitpunkt der embryonalen ChAT-Expression. Diese *in vitro* Daten lassen vermuten, daß die Induktion oder Erhaltung von cholinergen Eigenschaften durch mehrere neurotrophe Faktoren vermittelt wird (Brodski et al., 2002). Eine Bestätigung dieser Vermutung durch „gain of function“ bzw. „loss of function“ Experimente *in vivo* steht jedoch noch aus.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Expression von LIFR $\beta$  für die Induktion der VIP-Expression in sympathischen Neuronen des Huhnes notwendig ist. Der für die VIP-Induktion notwendige Rezeptorkomplex besteht somit zumindest aus LIFR $\beta$  und gp130 (Geissen et al., 1998). Die Untersuchungen legen weiterhin nahe, daß die Induktion von ChAT in sympathischen Neuronen unabhängig von der VIP-Expression über einen alternativen Signaltransduktionsweg erfolgen könnte.

### ***5.2 Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen***

Die Aussage, daß die VIP-Induktion *in vivo* über einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus gp130 und LIFR $\beta$  erfolgt, liefert die Grundlage für die Expressionsklonierung von VIP-induzierenden Zytokinen. Das hierbei verwendete Verfahren wird als „Secretion-Trap Expression Cloning“ bezeichnet und wurde zum ersten mal von Davis et al., (1996) angewandt. Mit dieser Methode konnte unter Zuhilfenahme eines Rezeptor-Antikörper-Fusionsproteins (Rezeptorfusionsprotein) und Durchsuchen einer Expressionsbank, Angiopoietin als der sekretierte Ligand für den TIE2 Rezeptor detektiert werden. Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit der Detektion eines unbekanntem sekretierten Faktors noch während des Transports aus den Zellen. Für diesen Zweck wurden dimere Rezeptorfusionsproteine (LIFR $\beta$ -Fc, gp130-Fc) hergestellt. Dies erfolgte durch Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors, bei dem die ligandenbindene Domäne des LIFR $\beta$  mit

dem Fc-Bereich des humanen IgG fusioniert wurde. Der entsprechende gp130-Fc-Expressionsvektor mit zusätzlicher Histidin-Markierung zur Aufreinigung wurde von Dirk Junghans hergestellt. Zusätzlich wurden beide Fusionsproteine mit der humanen Sekretionssequenz von CNTFR $\alpha$  ausgestattet, damit gewährleistet ist, daß die synthetisierten Rezeptorfusionsproteine aus humanen HEK 293 Zellen sekretiert werden.

Nach stabiler Transfektion von HEK 293 Zellen mit beiden Expressionsvektoren wurden diese auf ihr Expressionsniveau für das heterodimere LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein hin analysiert. Lediglich 16% (7 von 44) der untersuchten Klone exprimieren eine Mischung der Rezeptorfusionsproteine. Dies erscheint nicht verwunderlich, da die Zellen einerseits zwei verschiedene Plasmide aufnehmen und andererseits beide Plasmide stabil in das Genom integrieren werden müssen. Die Wahrscheinlichkeit, daß die Zellen nur homodimere Rezeptorfusionsproteine exprimieren, ist hoch, da in diesen Fällen nur ein Plasmid stabil integrieren muß, bzw. mehrere von der gleichen Art. Ein geeigneter Zellklon mit starker Expression des heterodimeren LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsproteins wurde ausgewählt und zur Produktion von Rezeptorfusionsproteinen eingesetzt.

Als Quelle für die Expressionsklonierung von neuropoetischen Zytokinen bieten sich kultivierte Herzzellen an, da sie einen oder mehrere unbekannte VIP-induzierende Faktoren (HCM) produzieren. GPA wurde als Bestandteil dieser Aktivität ausgeschlossen (Geissen, unveröffentlicht). Überstände aus LIFR $\beta$ /gp130-Fc doppeltransfizierten Zellen sind in der Lage, diese VIP-induzierenden Aktivitäten in HCM zu blockieren, während Überstände, die nur homodimere gp130/gp130-Rezeptorfusionsproteine enthalten, dazu nicht in der Lage sind. Dieses Resultat zeigt, daß das heterodimere LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein weitere VIP-induzierende Faktoren binden kann und damit geeignet ist Zellklone der Expressionsbank zu identifizieren, die neuropoetische Zytokine exprimieren. Analog zur „Secretion-Trap Expression Cloning“-Methode (Davis et al., 1996) wurde ein Screening-Verfahren etabliert. In Vorexperimenten wurde zunächst gezeigt, daß ein CNTFR $\alpha$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein (GPA-spezifisch) in der Lage ist, GPA-exprimierende COS-7 Zellen zu detektieren. Hierbei dient zunächst das Rezeptorfusionsprotein zur Detektion des Liganden, ein Horse Raddish Peroxidase-gekoppelter anti-Fc-Antikörper macht die GPA-exprimierenden Zellen über eine DAB-Substratumsetzung sichtbar. Die gefärbten Zellen wurden als GPA-exprimierende Zellen über PCR und Sequenzierungen verifiziert. 6 von 8 isolierten, DAB-positiven Zellen enthielten ein GPA-Fragment. Daraus folgt, daß beim Auflösen der DAB-positiven Klone von der Schale bis zu 25% der Zellen verloren gehen, oder aber daß 25% der DAB-positiven Zellen falsch-positive gefärbte Zellen darstellen.

## Diskussion

---

Alternative Isolationsvarianten mit Metall- und Kunststoffspateln wurden erprobt, jedoch blieben die Zellen an den glatten Oberflächen nicht haften. Lediglich Zahnstocher erwiesen sich durch die raue Oberfläche als geeignet. Ein großer Nachteil dieser Isolierungsmethode ist, daß neben der DAB-positiven Zelle auch bis zu 10-20 benachbarte Zellen mit überführt werden. Dies ist, neben der Kotransfektionshäufigkeit ein Grund, warum bei der PCR-Analyse (mit Insert-flankierenden Primern) von HCM-Bank/GPA-Plasmid (1:500) kotransfizierten COS-7 Zellen bis zur vier unterschiedliche Fragmente bei einem isolierten, DAB-positiven Klon auftraten. Aufgrund dieser hohen Fehlerquote wurde darauf verzichtet, die isolierten DAB-positiven Zellen direkt über PCR mit Insert-flankierenden Primern zu identifizieren. Im Gegensatz dazu wurden die DAB-positiven Zellen zu Pools von je 10 bis 15 Klonen vereinigt, die Plasmid-DNA isoliert und durch Retransformation in Bakterien vermehrt. Erneute Transfektion in COS-7 Zellen und die Detektion mit den Rezeptorfusionsproteinen ermöglicht zum einen die Reduzierung der falsch-positiven Zellen und zum anderen die Verifizierung und Anreicherung der DAB-positiven Zellen (d.h. Pools, die positive Klone enthalten, sollten in der zweite Suchrunde eine erhöhte Anzahl DAB-positiver Zellen aufweisen). Nach Isolierung der Plasmid-DNA, Retransformation in Bakterien und Isolierung einzelner Bakterienklone, können die unterschiedlichen Expressionskonstrukte voneinander getrennt werden. Die anschließende Linearisierung und Sequenzierung dieser Klone läßt nun eine Identifizierung zu.

Erste Suchzyklen in einer HCM-Expressionsbank mit aufgereinigten LIFR $\beta$ /gp130- und gp130/gp130-Rezeptorfusionsproteinen ergaben DAB-gefärbte Zellen, deren Plasmidsequenzen jedoch keine Ähnlichkeiten zu bisher bekannten neuropoietischen Zytokinen aufweisen. Die Tatsache, daß alle bisher gefundenen Gene (wovon einige noch nicht sequenziert werden konnten) nicht zur Familie der IL-6-Zytokinfamilie gehören, deutet auf die hohe Fehlerquote dieses Screeningverfahrens hin. Mögliche Erklärungen sind, neben den bereits oben erwähnten unspezifischen Bindungen der Rezeptorfusionsproteine, eine zu geringe Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens über Antikörper und DAB-Färbung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß erst eine Transfektion mit mehreren Plasmiden notwendig ist, um ein nachweisbares Expressionslevel zu erhalten. Diese Vermutung wird durch die unterschiedlich starken PCR-Banden unterstützt, die bei der PCR-Analyse auf DAB-gefärbte, GPA-transfizierte Zellen auftraten (Abb. 26). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die Detektion von GPA-exprimierenden Zellen mit GPA-spezifischem Rezeptorfusionsprotein nur möglich war, weil mehrere Kopien des gleichen Gens in ein und der selben Zelle eingebracht worden sind.

## Diskussion

---

Somit muß davon ausgegangen werden, daß selbst wenn neuropoietische Zytokin-exprimierende Zellen in den DAB-positiven Zellen enthalten sind, diese nur sehr mühsam von den falsch-positiven Klonen getrennt werden können. Für zukünftige Arbeiten ist es daher ratsam, die Zahl dieser falsch-positiven Zellen zu reduzieren und die Spezifität der Signale zu erhöhen, indem z.B. nur das LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein bei der Screeningprozedur verwendet wird.

Falls sich das Verfahren letztendlich als erfolgreich herausstellen sollte, so können die hergestellten Rezeptorfusionsproteine dazu angewendet werden, weitere VIP-induzierende Faktoren zu identifizieren. Solche VIP-induzierenden Faktoren wurden im Rahmen der eigenen Untersuchungen in Zellüberständen von kultivierten Retinazellen (RMG) und Müller-Gliazellen (AMG) gefunden. Die VIP-induzierenden Faktoren in AMG konnten weder mit einem CNTF-Antagonisten, noch mit einem GPA-spezifischen CNTFR $\alpha$ -/gp130 Rezeptorfusionsprotein blockiert werden. Die Erkenntnis, daß GPA kein Bestandteil der VIP-induzierenden Aktivität in AMG ist, wird durch die Beobachtung gestützt, daß der Überlebens-effekt von AMG auf sympathische Neuronen nicht mit Antikörpern gegen CNTFR $\alpha$  (Reis et al., 2002) blockierbar ist. Vielmehr deuten die Blockierungsversuche mit Rezeptorfusionsproteine-enthaltenden Überständen darauf hin, daß in AMG mindestens ein, von GPA unterschiedliches, neuropoietisches Zytokin enthalten ist, das an dimere Rezeptorkomplexe aus LIFR $\beta$ /gp130 bzw. gp130/gp130 bindet. Untersuchungen an Maus-Retinazellen bestätigen die Präsenz zweier Faktoren aus der IL-6-Familie in AMG (Reis, unveröffentlicht). Die Identität der Faktoren in RCM sind mit denen in AMG vergleichbar. Dies ist nicht überraschend, da Müllergliazellen dadurch gewonnen werden, indem die neuronalen Zellen einer Retinazellkultur abgetötet werden (Reis et al., 2002).

Als weitere mögliche Quelle für eine VIP-induzierende Aktivität bietet sich vermutlich die glatte Muskulatur der Arterien an, die durch cholinerge sympathische Fasern innerviert wird (Zechbauer, unveröffentlicht).

### **5.2 *Schlußfolgerung***

Im Rahmen der Dissertation wurde nachgewiesen, daß die *in vivo*-Induktion von VIP in sympathischen Neuronen über einen Rezeptorkomplex aus gp130 und LIFR $\beta$  bewirkt wird. Im Gegensatz dazu ist die Expression des cholinergen Markergens ChAT nicht betroffen. Zur Identifizierung von Zytokinen, die an einen Komplex von LIFR $\beta$  und gp130 binden, wurde eine Expressionsklonierung durchgeführt. Hierzu konnte ein funktionelles LIFR $\beta$ /gp130-Rezeptorfusionsprotein hergestellt werden, das in der Lage ist, VIP-induzierende Faktoren in HCM, RCM und AMG zu blockieren. Über Kontrollexperimente wurde ein Expressionsklonierungs-Protokoll erarbeitet, das geeignet ist, auf Einzelzell-Ebene Zytokin-exprimierende Zellen zu detektieren und aus diesen die Plasmid-Information zu ermitteln. Somit wird das Verfahren als prinzipiell durchführbar erachtet. In der bisher durchgeführten Suchrunde gelang es jedoch nicht, neue neuropoietische Zytokine zu identifizieren.

### 6. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung von Faktoren, die eine physiologische Funktion bei der VIP-Induktion cholinerg sympathischer Neuronen des Huhns besitzen. Die essentielle Bedeutung von neuropoietischen Zytokinen bei diesem Differenzierungsprozess wurde bereits durch Geissen et al. (1998) gezeigt. Eine weitere Eingrenzung der *in vivo* beteiligten Mitglieder dieser Zytokinfamilie sollte nun durch Klärung des beteiligten Rezeptorkomplexes vorgenommen werden.

Hierzu wurde zunächst die Klonierung des 5'-Bereiches der Huhn-LIFR $\beta$ -cDNA unter Verwendung der 5'-RACE-Technik abgeschlossen. Anschließend wurde ein antisense Ansatz etabliert, der es ermöglicht, *in vivo* die Signaltransduktion über die Rezeptoruntereinheit LIFR $\beta$  zu blockieren.

Unter Verwendung eines retroviralen Expressionsvektors RCAS(B) wurde LIFR $\beta$  antisense RNA im sich entwickelnden Hühnerembryo exprimiert. Dies bewirkte eine spezifische Reduzierung der endogenen LIFR $\beta$ -Expression in den infizierten Geweben, die über *In situ*-Hybridisierung und Immunfärbungen nachweisbar war.

Die Reduktion der LIFR $\beta$  hatte keinen Einfluß auf die allgemeine Entwicklung des sympathischen Ganglions. Sie führte jedoch zu einer selektiven Reduktion der VIP-Expression, wohingegen die frühe cholinerge (ChAT), noradrenerge (TH) und panneuronale (SCG10) Genexpression unbeeinflusst bleibt. Damit ist eindeutig gezeigt, daß neuropoietische Zytokine, die über LIFR $\beta$  wirken, essentiell sind für bestimmte Aspekte der terminalen Differenzierung (VIP-Expression) cholinerg sympathischer Neuronen.

In Anlehnung an die vorangegangene Studie sollten unbekannte Zytokine, die an den Komplex aus LIFR $\beta$ - und gp130-Rezeptoruntereinheiten binden, über eine Expressionsklonierung identifiziert werden. Hierzu konnten funktionelle LIFR $\beta$ -Fc/gp130-Fc Rezeptorfusionsproteine hergestellt werden, die in der Lage sind, VIP-induzierende Faktoren in HCM, RCM und AMG zu blockieren. Über Kontrollexperimente wurde ein Expressionsklonierungsprotokoll erarbeitet, das geeignet ist auf Einzelzellebene Zytokin-exprimierende Zellen zu detektieren und aus diesen die Plasmid-Information zu ermitteln. Somit wird das Verfahren als prinzipiell durchführbar erachtet. In der bisher durchgeführten Suchrunde in einer HCM-Bank gelang es jedoch nicht, neuropoietische Zytokine zu identifizieren.

## 7. Literatur

- Anderson, R. L.; Gibbins, I. L.; Morris J. L. (1996). Non-noradrenergic sympathetic neurons project to extramuscular feed arteries and proximal intramuscular arteries of skeletal muscles in guinea-pig hindlimbs. *J. Auton. Nerv. Syst.* **61**, 51-60.
- Aaronson, D. S. und Horvath, C. H. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653-1655.
- Asmus, S. E.; Parsons, S.; Landis, S. C. (2000). Developmental changes in the transmitter properties of sympathetic neurons that innervate the periosteum. *J. Neurosci.* **20**, 1495-14504.
- Asmus, S. E., Tian, H.; Landis, S. C. (2001). Induction of cholinergic function in cultured sympathetic neurons by periosteal cells: cellular mechanisms. *Dev. Biol.* **235**, 1-11.
- Barbin, G.; Manthorpe, M.; Varon, S. (1984). Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor. *J. Neurochem.* **43**, 1468-1478.
- Bartoe, J. L.; Nathanson, N. M. (2002). Independent roles of SOCS-3 and SHP-2 in the regulation of neuronal gene expression by leukemia inhibitory factor. *Mol. Brain Res.* 2002 **107**, 108-119.
- Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6934-6938.
- Bazan, J. F. (1991). Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* **7**, 197-208.
- Blecher, S. R.; Kapalanga, J.; Lanlonde, D. (1986). Induction of sweat glands by epidermal growth factor in murine X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Nature* **345**, 542-544.
- Bonni, A.; Frank, D. A.; Schindler, C.; Greenberg, M. E. (1993). Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science* **202**, 1575-1579.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive methode for the quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brawermann, G.; Mendecki, J.; Lee, S. Y. (1972). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids res.* **7**, 1513-1524.
- Briscoe, J.; Guschin, D.; Müller, M. (1994). Just another signalling pathway. *Current Biologie* **4**, 1033-1035.
- Brodski, C.; Schnürch, H.; Dechant, G. (2000). Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9683-9688.
- Brodski, C.; Schraumar, A.; Dechant, G. (2002). Opposing functions of GDNF and NGF in the development of cholinergic and noradrenergic sympathetic neurons. *Mol. Cell. Neurisci* **19**, 528-538.

Crowley, C.; Spencer, S. D.; Nishimura, M. C.; Chen, K. S.; Pitts-Meek, S.; Armanini, M. P.; Ling, L. H.; McMahon, S. B.; Shelton, D. L.; Levinson, A. D.; Philipps, H. S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76**, 1001-1011.

Dagle, J. M. und Weeks, D. L. (2001). Oligonukleotide-based strategies to reduce gene expression. *Differentiation* **69**, 75-82.

Darnell, J. J. (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635.

Davis, S.; Aldrich, T. H.; Valenzuela, D. N.; Wong, V.; Furth, M. E.; Squinto, S. P.; Yancopoulos, G. D. (1991). The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* **253**, 59-63.

Davis, S.; Aldrich, T. H.; Jones, P. F.; Acheson, A.; Compton, D. L.; Jain, V.; Ryan, T. E.; Bruno, J.; Radziejewski, C.; Maisonpierre, P. C.; Yancopoulos, G. D. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169.

De Chiara, T. M.; Vejsada, R.; Poueymirou, W. T.; Acheson, A.; Suri, C.; Conover, J. C.; Friedmann, B.; Mc Clain, J.; Pan, L.; Stahl, N. (1995). Mice lacking the CNTFR, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* **83**, 313-322.

Dorsky, R. I.; Moon, R. T.; Raible, D. W. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* **396**, 370-373.

Duong, C. V. (1999). Klonierung der Zytokinuntereinheit LIFR $\beta$  des Haushuhns (*G. domesticus*). Diplomarbeit, Frankfurt.

Eckenstein, F. P.; Esch, F.; Holbert, T.; Blacher, R. W.; Nishi, R. (1990). Purification and characterization of a trophic factor for embryonal peripheral neurons: comparison with fibroblast growth factors. *Neuron* **4**, 623-631.

Elson, G. C.; Graber, P.; Losberger, C.; Herren, S.; Gretener, D.; Menoud, L. N.; Wells, T. N.; Kosco-Vilbois, M. H.; Gauchat, J. F. (1998). Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol.* **161**, 1371-1379.

Elson, G. C.; Lelievre, E.; Guillet, C.; Chevalier, S.; Plun-Favreau, H.; Froger, J.; Suard, I.; de Coignac, A. B.; Delneste, Y.; Bonnefoy, J. Y.; Gauchat, J. F.; Gascan, H. (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat. Neurosci.* **3**, 867-872.

Ernsberger, U.; Sendtner, M.; Rohrer, H. (1989). Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: Effects of ciliary neurotrophic factor. *Neuron* **2**, 1275-1284.

Ernsberger, U.; Patzke, H.; Tissier-Seta, J.P.; Reh, T.; Golidis, C., Rohrer, H. (1995). The expression of tyrosine hydroxylase and the transcription factors cPhox-2 and Cash-1: evidence for distinct inductive steps in the differentiation of chick sympathetic precursor cells. *Mech. Dev.* **52**, 125-136.

- Ernsberger, U.; Patzke, H.; Rohrer, H. (1997). The developmental expression of choline acetyltransferase (ChAT) and the neuropeptide VIP in chick sympathetic neurons: evidence for different regulatory events in cholinergic differentiation. *Mech. Dev.* **68**, 115-126.
- Ernsberger, U. und Rohrer, H. (1999). Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Cell. Tissue Res.* **297**, 339-361.
- Ernsberger, U.; Reissmann, E.; Mason, I.; Rohrer, H. (2000). The expression of dopamine b-hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and Phox2 transcription factors in sympathetic neurons: evidence for common regulation during noradrenergic induction and diverging regulation later in development. *Mech. Dev.* **92**, 169-177.
- Falconer, D. S. (1952). A total sex-linked gene in the house mouse. *Nature* **169**, 664-665.
- Fann, M. und Patterson, P. H. (1994). Neuropoietic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. *Neurobiol.* **91**, 43-47.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fiedler, S. und Wirth, R. (1988). Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* **170**, 38-44.
- Fiset, P.-O. und Gounni, A. S. (2001). Antisense Oligonucleotides: problems with the use and solutions. *Rev. Biol. Biotech.* **1**, 27-33.
- Forger, N. G.; Bartlett, P.; Prevette, D.; Oppenheim, R. W. (2002). Mice lacking cytokine-like factor 1 (CLF/NR6) exhibit a reduction in lumbar motoneurons at birth. Programm No. 631.6.2002 Abstract Viewer/Itinerary Planer. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2002.CD-ROM.
- Francis, N. J.; Asmus, S. E.; Landis, S. C. (1997). CNTF and LIF are not required for the target-directed acquisition of cholinergic and peptidergic properties by sympathetic neurons in vivo. *Dev. Biol.* **182**, 76-87.
- Francis, N. J. and Landis, S. C. (1999). Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 541-566.
- Francis, N.; Farinas, I.; Brennan, C.; Rivas-Plata, K.; Backus, C.; Reichardt, L.; Landis, S. (1999). NT-3, like NGF, is required for survival of sympathetic neurons, but not their precursors. *Dev. Biol.* **210**, 411-427.
- Frank, D. A.; Greenberg, M. E. (1996). Signal transduction pathways activated by ciliary neurotrophic factor and related cytokines. *Perspectives on Dev. Neurobiol.* **4**, 3-18.
- Gabriel, O. (1971). Analytical disc gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* **22**, 565-578.
- Gearing, D. P.; Gough, N. M.; King, J. A.; Hilton, D. J.; Nicola, N. A.; Simpson, R. J.; Nice, E. C.; Kelso, A.; Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* **6**, 3995-4002.

Gearing, D. P.; Thut, C. J.; VandenBos, T.; Gimple, S. D.; Delany, P. B.; King, J.; Price, V.; Cosman, D.; Beckmann, M. P. (1991). Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* **10**, 2839-2848.

Geissen, M.; Heller, S.; Pennica, D.; Ernsberger, U.; Rohrer, H. (1998). The specification of sympathetic neurotransmitter phenotype depends on gp130 cytokine receptor signaling. *Development* **125**, 4791-4801.

Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*, sixth Edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

Grant, M. P.; Francis, N. J.; Landis, S. C. (1995). The role of acetylcholin in regulating secretory responsiveness in rat sweat glands. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**, 32-42.

Groves, A. K.; George, K. M.; Tissier-Seta, J.-P.; Engel, J. D.; Brunet, J.-F.; Anderson, D. J. (1995). Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons. *Development* **121**, 887-901.

Gruneberg, H. (1971). The tabby syndrome in the mouse. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* **179**, 139-156.

Guidry, G. and Landis, S. C. (1998). Target-dependent development of the vesicular acetylcholine transporter in rodent sweat gland innervation. *Dev. Biol.* **199**, 175-184.

Habecker, B. A. und Landis, S. C. (1994). Noradrenergic regulation of cholinergic differentiation. *Science* **264**, 1602-1604.

Habecker, B. A.; Tresser, S. J.; Rao, M. S.; Landis, S. C. (1995). Produktion of sweat gland cholinergic differentiation factor depends on innervation. *Dev. Biol.* **167**, 307-316.

Habecker, B. A.; Symes, A. J.; Stahl, N.; Francis, N. J.; Economides A.; Fink, J. S.; Yancopoulos, G. D.; Landis, S. C. (1997). A sweat gland-derived differentiation activity through known cytokine signalling pathways. *J. Biol. Chem.* **272**, 30421-30428.

Harlow, E. und Lane., D. (1988). *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Muller-Newen, G.; Schaper, F.; Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* **334**, 297-314.

Heller, S.; Finn, T. P.; Huber, J.; Nishi, R.; Geißen, M.; Püschel, A. W.; Rohrer, H. (1995). Analysis of functional and expression of the chick GPA receptor (GPAR $\alpha$ ) suggests multiple roles in neuronal development. *Development* **121**, 2681-2689).

Hamburger, V. und Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92.

Hohmann, E. L.; Elde, R. P.; Rysavy, J. A.; Einzig, S.; Gebhard, R. L. (1986). Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science* **232**, 868-871.

- Honma, Y.; Araki, T.; Gianino, S.; Bruce, A.; Heuckeroth, R. O.; Johnson, E. M.; Johnson Jr., E. M.; Milbrandt, J. (2002). Artemin is a vascular-derived neurotrophic factor for Developing sympathetic neurons. *Neuron* **35**, 267-282.
- Hu, W. Y.; Myers, C. P.; Kilzer, J. M.; Pfaff, S. L.; Bushman, F. D. (2002). Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr. Biol.* **12**, 1301-1311.
- Ihle, J. N. (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature* **377**, 591-594.
- Ihle, J. N. (1996). STATs: Signaling transducers and activators of transcription. *Cell* **84**, 331-334.
- Ito, Y.; Yamamoto, M.; Li, M.; Doyu, M.; Tanaka, F.; Mutch, T.; Mitsuma, T.; Sobue, G. (1998). Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$ , IL-6R $\alpha$  and gp130) in injured peripheral nerves. *Brain Res.* **793**, 321-327.
- Ito, Y.; Yamamoto, M.; Li, M.; Mitsuma, N.; Tanaka, F.; Doyu, M.; Suzumura, A.; Mitsuma, T.; Sobue, G. (2000). Temporal expression of mRNAs for neurotrophic cytokines, interleukin-11 (IL-11), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1) and their receptors (IL-11Ra and OSMRb) in peripheral nerve injury. *Neurochem. Res.* **25**, 1113-1118.
- Kirby, M. L.; Diab, I. F.; Mattio, P. G. (1978). Development of adrenergic innervation of the iris and fluorescent ganglion cells in the choroid of the chick eye. *Anat. Rec.* **191**, 311-320.
- Kirby, M. L.; McKenzie, J. W.; Weidmann, T. A. (1980). Developing innervation of the chick heart: a histofluorescence and light microscopy study of sympathetic innervation. *Ana. Rec.* **196**, 333-340.
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685).
- Landis, S. C.; Keefe, D. (1983). Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo: Developmental changes in properties of cholinergic sympathetic neurons. *Dev. Biol.* **98**, 349-372.
- Landis, S. C.; Siegel, R. E.; Schwab, M. (1988). Evidence for neurotransmitter plasticity in vitro: II. Immunocytochemical studies of rat sweat gland innervation during development. *Dev. Biol.* **126**, 129-140.
- Landis, S. C. (1996). The development of cholinergic sympathetic neurons: a role for neurotrophic cytokines? *Perspect. Dev. Neurobiol.* **4**, 53-63.
- Leblanc, G. und Landis, S. (1986). Development of Cholin Acetyltransferase (CAT) in the sympathetic innervation of rat sweat glands. *J. Neurosci.* **6**, 260-265.

- Ledda, F.; Paratcha, G., Ibanez, C. F. (2002). Target-derived GFRa1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via activation of Cdk5. *Neuron* **36**, 387-401.
- Le Douarin, N. M. und Kalcheim, C. (1999). *The neural crest*. Cambridge University Press, Second Edition.
- Lee, F.; Yokata, T.; Chiu, C. P.; De Vries, J.; Banchereau, J.; Arai, N.; Coffmann, R.; Rennick, D.; Arai, K. (1988). The molecular cloning of interleukins 4, 5 and 6: multifunctional hemopoietic growth factors. *Behring Inst. Mitt.* **83**, 8-14.
- Lehner, B.; Williams, G.; Campbell, R. D.; Sanderson, C. M. (2002). Antisense transcripts in the human genome. *Trends in Genetics* **18**, 63-65.
- Levi-Montalcini, R. und Booker, B. (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 384-390.
- Leung, D. W.; Parent, A. S.; Cachianes, G.; Esch, F.; Coulombe, J. N.; Nicolics, K.; Eckstein, F. P.; Nishi, R. (1992). Cloning, expression during development, and evidence for release of trophic factor for ciliary ganglion neurons. *Neuron* **8**, 1045-1053.
- Lin, L.-F.; Mismar, D.; Lile, J. D.; Armes, L. G.; Butler, E. B.; Vannice, J. L.; Collins, F. (1989). Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* **246**, 1023-1025.
- Lo, L.; Tiveron, M. C.; Anderson D. J. (1998). MASH1 activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* **125**, 609-620.
- Lowry, O. et al. (1956). *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- Malik, N.; Kallestad, J. C.; Gunderson, N. L.; Austin, S. D.; Neubauer, N. G.; Ochs, V.; Marquardt, H.; Zarling, J. M.; Shoyab, M.; Wei, C. M. (1989). Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of novel growth regulatory, oncostatin M. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2847-2853.
- Martinez, J; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Luhrmann, R.; Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* **110**, 563-574.
- Masu, Y.; Wolf, E.; Holtmann, B.; Sendtner, M.; Brem, G.; Thoenen, H. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* **365**, 27-32.
- Matsukawa, K.; Shirai, M.; Murata, J.; Tsuchimochi, H.; Komine, H.; Ninomiya, I.; Shimizu, K. (2002). Sympathetic cholinergic vasodilation of skeletal muscle small arteries. *Jpn J. Pharmacol.* **88**, 14-18.
- Mehler, M. F.; Rozental, R.; Dougherty, M.; Spray, D. C.; Kessler, J. A. (1993). Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature*, **362**, 62-65.

- Merril, C. R.; Goldmann, D.; Sedman, S. A.; Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gel shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**, 1437-1438.
- Meyers, J.; Sanchez, D.; Elwell, L.; Falkow, S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **127**, 1529-1537.
- Misawa, H.; Takahashi, R.; Deguchi, T. (1993). Transcriptional regulation of choline acetyltransferase gene by cyclic AMP. *J. Neurochem.* **60**, 1383-1387.
- Morgan, B. A.; Fekete D. M. (1996). Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell. Biol.* **51**, 185-218.
- Mosley, B.; Imus, C. D.; Friend, D.; Boiani, N.; Thoma, B.; Park, L. S.; Cosman, D. (1996). Dual oncostatin M (OSM) receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 32635-32643.
- Murakami, M.; Hibi, M.; Nakagawa, N.; Nagakawa, T.; Yasukawa, K.; Yamanishi, K.; Taga, T.; Kishimoto, T. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* **260**, 1808-1810.
- Murphy, M.; Durrone, R.; Koblar, S.; Cheema, S.; Bartlett, P. (1997). Cytokines which signal through the LIF receptor and their Actions in the nervous system. *Prog. in Neurobiol.* **52**, 355-378.
- New, H. V.; Mudge, A. V. (1986). Distribution and ontogeny of SP, CGRP, SOM and VIP in chick sensory and sympathetic ganglia. *Dev. Biol.* **116**, 337-346.
- O'Shea, J. J.; Gadina, M.; Schreiber, D. (2002). Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/STAT pathway. *Cell* **109**, 121-131.
- Patterson, P. H. (1992). The emerging neuropoietic cytokine family: first CDF/LIF, CNTF and IL-6; next ONC, MGF, GCSF? *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 94-97.
- Pekarik, V.; Bourikas, D.; Miglino, N.; Joset, P.; Preiswerk, S.; Stoeckli, E. T. (2002). Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat. Biotechnol.* **21**, 93-96.
- Pellegrini, S.; Dusanter-Fourt, I. (1997). The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur. J. Biochem.* **248**, 615-633.
- Pennica, D.; King, K. L.; Shaw, K. J.; Luis, E.; Rullamas, J.; Luoh, S. M.; Darbonne, W. C.; Knutzon, D. S.; Yen, R.; Chien, K. R.; (1995). Expression cloning of cardiotrophin-1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1142-1146.
- Rajan, P.; Symes, A. J.; Fink, J. S. (1996). STAT proteins are activated by ciliary neurotrophic factor in cells of central nervous system origin. *J. Neurosci. Res.* **43**, 403-411.

- Rao, M. S. and Landis, S. C. (1990). Characterisation of a target-derived neuronal cholinergic differentiation factor. *Neuron* **5**, 899-910.
- Rao, M. S.; Patterson, P. H.; Landis, S. C. (1992). Multiple cholinergic differentiation factors are present in footpad extracts: comparison with known cholinergic factors. *Development* **116**, 731-744.
- Rao, M. S.; Sun, Y.; Escary, J. L.; Perreau, J.; Tresser, S.; Patterson, P. H.; Zigmond, R. E.; Brulet, P.; Landis, S. C. (1993). Leukemia inhibitory factor mediates an injury response but not a target-directed developmental transmitter switch in sympathetic Neurons. *Neuron* **11**, 1175-1185.
- Rao, M. S.; Jaszczak, E.; Landis, S. C.; (1994). Innervation of footpads of normal and mutant mice lacking sweat glands. *J. Comp. Neurol.* **346**, 613-625.
- Reissmann, E.; Ernsberger, U.; Francis-West, P. H.; Rueger, D.; Brickell, P. M.; Rohrer, H. (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* **122**, 2079-2088.
- Richardson, C. C. (1965). Phosphorylation of nucleic acid by an enzyme from T4 bacteriophage-infected *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 158-165.
- Rohrer, H.; Thoenen, H. (1987). Relationship between differentiation and terminal mitosis: chick sensory and ciliary neurons differentiate after terminal mitosis, whereas sympathetic neurons continue to divide after differentiation. *J. Neurosci.* **7**, 3739-3748.
- Rothman, T. P.; Gershon, M. D.; Holtzer, H. (1978). The relationship of cell division to the acquisition of adrenergic characteristics by developing sympathetic ganglion cell precursors. *Dev. Biol.* **65**, 321-341.
- Rush, R. A.; Abrahamson, I. K.; Murdoch, S. Y.; Rention, F. J.; Wilson, P. A. (1986). Increase in neuronotrophic activity during the period of smooth muscle innervation. *Int. J. Dev. Neurosci.* **4**, 483-492.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. (1988). Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual* (2<sup>nd</sup> Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schafer, M. K.; Eiden, L. E.; Weihe, E. (1998). Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience*. **84**, 361-376.
- Schneider, C.; Wicht, H.; Enderich, J.; Wegner, M.; Rohrer, H. (1999). Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* **24**, 861-870.

Schotzinger, R. J. und Landis, S. C. (1988). Cholinergic phenotype developed by noradrenergic sympathetic neurons after innervation of a novel cholinergic target in vivo. *Nature* **335**, 637-639.

Schotzinger, R. J. und Landis, S. C. (1990). Acquisition of cholinergic and peptidergic properties by sympathetic innervation of rat sweat glands requires interaction with normal target. *Neuron* **5**, 91-100.

Shah, N. M.; Groves, A. K.; Anderson, D. J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGF $\beta$  superfamily members. *Cell* **86**, 331-343.

Shapiro, D. J. (1981). Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* **110**, 229-231.

Sharp, P. A. (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.* **13**, 139-141.

Shi, Y.; Wang, W.; Yourey, P. A.; Gohari, S.; Zukauskas, D.; Zhang, J.; Ruben, S.; Alderson, R. F. (1999). Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 132-138.

Sisask, G.; Bjurholm, A.; Ahmed, M.; Kreicbergs, A. (1996) The development of autonomic innervation in bone and joints of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* **59**, 27-33.

Smeyne, R. J.; Klein, R.; Schnapp, A. Long, L. K.; Bryant, S.; Lewin, A.; Lira, S. A.; Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**, 246-248.

Stahl, N.; Boulton, T. G.; Farruggella, T.; Ip, N. Y.; Davis, S.; Witthuhn, B. A.; Quelle, F. W.; Silvennoinen, O; Barbieri, G.; Pellegrini, S.; Yancopoulos, G. D. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6  $\beta$  receptor components. *Science* **263**, 92-95.

Stanke, M.; Junghans, D.; Geissen, M.; Goridis, C.; Ernsberger, U.; Rohrer, H. (1999) The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons. *Development* **126**, 4087-4094.

Stanke, M.; Geissen, M.; Götz, R.; Ernsberger, U; Rohrer, H. (2000). The early expression of VAcHT and VIP in mouse sympathetic ganglia is not induced by cytokines acting through LIFR $\beta$  or CNTFR $\alpha$ . *Mech. Dev.* **91**, 91-96.

Stein, C. A. und Krieg, A. M. (1994). Problems in interpretation of data derived from in vitro and in vivo use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res. Dev.* **4**, 67-69.

Stemple, D. L.; Mahanthappa, N.K., Anderson, D. J. (1988). Basic FGF induces neuronal proliferation, cell division, and NGF dependence in chromaffine cells: A sequence of events in sympathetic development. *Neuron* **1**, 517-525.

Stevens, L. M. und Landis, S. C. (1987). Development and properties of the sensory response in rat sweat glands: Relationship to the introduction of cholinergic function in sweat gland innervation. *Dev. Biol.* **123**, 179-190.

- Stöckli, K. A.; Lottspeich, F.; Sendtner, M.; Masiakowski, P.; Carroll, P.; Götz, R.; Lindholm, D.; Thoenen, H. (1989). Molecular cloning, expression and regional distributing of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* **342**, 920-923.
- Symes, A. J.; Corpus, L.; Fink, J. S. (1995). Differences in nuclear signaling by leukemia inhibitory factor and interferon  $\gamma$ : The role of STATs proteins in regulation vasoactive intestinal polypeptide gene expression. *J. Neurochem.* **65**, 1926-1933.
- Symes, A. J.; Gearan, T.; Eby, J.; Fink, S. (1997). Integration of Jak-STAT and AP-1 signaling pathways at the vasoactive intestinal peptide cytokine response element regulates ciliary neurotrophic factor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **272**, 9648-9654.
- Tafari, A. T.; Thomas, S. A.; Palmiter, R. D. (1997) Norepinephrine facilitates the development of the murine sweat response but is not essential. *J Neurosci.* **17**, 4275-4281.
- Tanaka, B. M.; Hara, T.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Miyajima, A. (1999). Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) Receptor: Molecular cloning of the mouse OSM receptor  $\beta$  subunit. *Blood* **93**, 804-815.
- Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka Jr., F. C. (1996). In vitro delivery by degraded polymidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chem.* **7**, 703-714.
- Terenghi, G. (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* **194**, 1-14.
- Tian, H.; Habecker, B.; Guidry, G.; Gurtan, A.; Rios, M.; Roffler-Tarlov, S.; Landis, S. C. (2000). Catecholamines are required for the acquisition of secretory responsiveness by sweat glands. *J Neurosci.* **20**, 7362-7369.
- Tomida, M. (1995). Molecular cloning and functional expression of mouse cDNAs encoding the membrane receptor and the soluble receptor for D-factor/LIF. *Ann. New York Acad. Sci.* **762**, 480-481.
- Uvnas, B. (1996). Cholinergic vasodilator nerves. *Fed. Proc.* **25**, 1618-22.
- Vanhee-Brossollet, C.; und Vaquero, C. (1998). Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene* **211**, 1-9.
- Varley J. E., and Maxwell, R. G. (1996). BMP-2 and BMP-4, but not BMP-6, increase the number of adrenergic cells which develop in quail neural crest cultures. *Exp. Neurol.* **140**, 84-94.
- Ware, C. B.; Horowitz, M. C.; Renshaw, B. R.; Hunt, J. S.; Liggitt, D.; Koblar, S. A.; Gliniak, B. C.; McKenna, H. J.; Papayannopoulou, T.; Thoma, B.; Cheng, L.; Donovan, P. J.; Peschon, J. J.; Bartlett, P. F.; Willis, C. R.; Wright, B. D.; Carpenter, M. K.; Davison, B. L.; Gearing, D. P. (1995). Target disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neuronal and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* **121**, 1283-1299.
- Weihe, E.; Tao-Cheng, J. H.; Schafer, M. K.; Erickson, J. D.; Eiden, L. E. (1996). Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its

targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3547-3552.

Wyatt, S.; Pinon, L. G.; Ernfors, P.; Davies, A. M. (1997). Sympathetic neuron survival and TrkA expression in NT3-deficient mouse embryos. *EMBO J.* **16**, 3115-3123.

Yamamori, T.; Fukada, K.; Aebersold, R.; Korsching, S.; Fann, M.-J.; Patterson, P. H. (1989). The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* **246**, 1412-1416.

Zamore, P. D. (2001). Listen to the sound of silence. *Nature Struct. Biol.* **8**, 746-750.

Zarling, J. M.; Shoyab, M.; Marquardt, H.; Hanson, M. B.; Lioubin, M. N.; Todaro, G. J. (1986). Oncostatin M; a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9739-9743.

Zechbauer, U. (1995). Entwicklungsabhängige cholinerge Differenzierung sympathischer Nervenzellen des Huhnembryos: Zeitliche Korrelation mit der Innervation eripherer Zielgebiete und der Expression cholinergischer Differenzierungsfaktoren. Diplomarbeit, Frankfurt.

# Tabellarischer Lebenslauf

## 1. Angaben zur Person:

Name: Duong, Chi Vinh  
Geburtsdatum: 03.07.72 in  
Nghia Binh (Südvietnam)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand ledig  
Eltern: Thieu Hung Duong  
Diep Thi Lai Duong  
Geschwister 4 Brüder

## 2. Schulausbildung:

1978-1979 Besuch der Grundschule in Südvietnam  
1979 Emigration nach Deutschland  
1980-1984 Besuch der Uhland-Grundschule  
in Frankfurt am Main  
1984-1986 Besuch der Gerhardt Hauptmann-  
Realschule in Frankfurt am Main  
1986-1993 Besuch des Helmholtz-Gymnasium  
in Frankfurt am Main

## 3. Berufsausbildung:

seit Oktober Studium der Biologie an der  
1993 Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main  
1995 Vordiplom im Fachbereich Biologie  
1997 Einbürgerung in die BRD  
1999 Diplom im Fachbereich Biologie  
seit Juli Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof.  
1999 Dr. Rohrer am MPI für Hirnforschung  
in Frankfurt am Main

Die Implantation der Fibroblastenaggregate wurden von H. Rohrer und M. Geissen vorgenommen. Des Weiteren war M. Geissen maßgeblich an der Herstellung der HCM-Bank, sowie der Klonierung des Huhn-LIFR $\beta$  beteiligt. Dirk Junghans stellte den gp130-Fc-Expressionsvektor, sowie das CNTFR $\alpha$ -/gp130 Rezeptorfusionsprotein zur Verfügung.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, den 29.04.03