

Institut für Klinische Neurobiologie

Genetische Untersuchungen zur Rolle von Cytochrom C und Stat3 bei der
Regulation des embryonalen Zelltods von Motoneuronen der Maus

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ulrich Schweizer
aus
Murrhardt

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Januar 1999 bis April 2002 am Institut für Klinische Neurobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Betreuung von Prof. Dr. Michael Sendtner durchgeführt.

Meiner Familie

“Ja, wir werden alles, alles noch einmal in Frage stellen. Und wir werden nicht mit Siebenmeilenstiefeln vorwärtsgehen, sondern im Schneckentempo. Und was wir heute finden, werden wir morgen von der Tafel streichen und erst wieder anschreiben, wenn wir es noch einmal gefunden haben. Und was wir zu finden wünschen, das werden wir, gefunden, mit besonderem Mißtrauen ansehen.” ... ”Sollte uns dann aber jede andere Annahme als diese unter den Händen zerronnen sein, dann keine Gnade mehr mit denen, die nicht geforscht haben und doch reden.”

Berthold Brecht: “Leben des Galilei”,
zitiert von M. Eigen in der Vorrede zur deutschen Ausgabe
von J. Monod “Zufall und Notwendigkeit”, Piper 1971

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Sendtner für die Überlassung der Themen, für viele interessante Diskussionen über das Nervensystem, seine Erkrankungen und die Denkweise, molekulare Mechanismen mit der Physiologie neurodegenerativer Erkrankungen zu verbinden, sowie ein wissenschaftliches Umfeld, in dem kein Experiment aus finanziellen Gründen unmöglich war. Auch gibt es bestimmt nicht viele Labors, wo ein so breit gefächertes Methodenspektrum existiert, mit der Möglichkeit, aus den vielfältigen Erfahrungen Anderer selbst so viel, quasi nebenher, zu lernen. Ich möchte mich auch besonders für die Ermöglichung mehrerer Kongreßreisen bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen für Hilfe und Unterstützung, vor allem zu Beginn der Arbeit. Hervorzuheben sind Dr. Stefan Wiese und Dr. Sibylle Jablonka. Frau Dr. Bettina Holtmann danke ich für die Zeit und Mühe mit meinen vielen Mauslinien und besonders für die schnelle Etablierung der Cytochrom C transgenen Linie aus meinen Stammzellen. Aber auch all den anderen, mit denen ich über die Jahre gute und auch frustrierende Zeiten erlebt habe, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken und für ungezählte wissenschaftliche und auch private Gespräche. Dazu gehören auch die mittlerweile etablierten Runden im "Salon" von Dr. Maria da Penha Berzaghi.

Ich bedanke mich bei allen technischen Assistentinnen, die mir hin und wieder geholfen haben, besonders Jenny Kara und Michaela Pfister, sowie den "Stammzell-TAs" Susanne Klüpfel, Mira Schmid und Katharina Kalus. Die Präparation des Rückenmarks von Mäusen habe ich von Frau Helga Brünner gelernt, der ich nicht nur dafür an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Ich bedanke mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit mit Dr. Andrew Chan und Prof. Ralf Gold beim Cytochrom C Projekt.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
GENETISCHE INAKTIVIERUNG DES SOMATISCHEN CYTOCHROM C GENS DER MAUS.....	I
CHARAKTERISIERUNG DER NFL-CRE MAUS	I
DIE ROLLE VON STAT3 FÜR DAS ÜBERLEBEN VON MOTONEURONEN	II
GERICHTETE MUTAGENESE DES LIF-REZEPTOR GENS IN ES-ZELLEN	II
SUMMARY	III
GENETIC INACTIVATION OF THE SOMATIC CYTOCHROME C GENE IN MICE.....	III
CHARACTERIZATION OF THE CRE-TRANSGENIC NFL-CRE MOUSE	III
THE ROLE OF STAT3 FOR THE SURVIVAL OF MOTONEURONS.....	IV
SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF THE LIFR GENE IN EMBRYONIC STEM CELLS	IV
1.EINLEITUNG	1
1.1 NEURONALER ZELLTOD WÄHREND DER ENTWICKLUNG.....	1
1.2 ZELLTOD VON MOTONEURONEN BEI ERKRANKUNGEN DES NERVENSYSTEMS	1
1.3 DER BIOCHEMISCHE MECHANISMUS DER APOPTOSE	2
1.3.1 <i>Allgemeines</i>	2
1.3.2 <i>Induktion der Apoptose</i>	3
1.3.3 <i>Regulationsebenen der Apoptose</i>	4
1.4 NEUROTROPHE FAKTOREN, IHRE REZEPTOREN UND SIGNALTRANSDUKTION	5
1.4.1 <i>Neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren</i>	5
1.4.2 <i>Signalwege, die durch neurotrophe Faktoren aktiviert werden</i>	7
1.4.3 <i>Wie interferieren neurotrophe Faktoren mit dem Apoptosemechanismus ?</i>	8
1.5 DIE ROLLE DES LIF-REZEPTORS FÜR DAS ÜBERLEBEN VON MOTONEURONEN	9
1.6 DIE ROLLE VON CYTOCHROM C BEI DER NEURONALEN APOPTOSE.....	11
1.7 ZIELSETZUNGEN:	12
1.8 ABKÜRZUNGEN UND NOMENKLATUR:.....	12
2. MATERIALIEN UND METHODEN	14
2.1 CHEMIKALIEN.....	14
2.1.1 <i>Salze, Lösungen und Enzyme</i>	14
2.1.2 <i>DNA Oligonukleotide</i>	15
2.1.3 <i>Antikörper</i>	17
2.1.4 <i>Genomische DNA Bibliothek</i>	17
2.1.5 <i>“Kits” für die Molekularbiologie</i>	17
2.1.6 <i>Bakterienstämme, Mauslinien und Zelllinien</i>	17
2.2 METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	18
2.2.1 <i>PCR</i>	18

2.2.2 RNA Isolierung und Reverse Transkription.....	19
2.2.3 Semiquantitative RT-PCR.....	19
2.2.4 Southern Blot/Hybridisierung einer genomischen BAC-Library	20
2.2.5 Western Blot	21
2.2.6 Klonierungen.....	21
2.2.7 Plasmidpräparationen.....	22
2.2.8 I-Phagen Infektion und Präparation.....	22
2.2.9 Extraktion von genomischer DNA aus Gewebe	23
2.2.10 Ortsspezifische Mutagenese.....	23
2.2.11 DNA Sequenzierung nach der Didesoxymethode	24
2.3 ZELLKULTUR	24
2.3.1 Embryonale Stammzellen	24
2.3.2 Kultur von embryonalen Motoneuronen der Maus	25
2.4 HISTOLOGIE.....	26
2.4.1 Nissl-Färbung.....	26
2.4.2 Auszählen von Motoneuronen in histologischen Schnitten.....	26
2.4.3 In situ b-Galactosidase-Färbung.....	26
2.4.4 In situ Hybridisierung	27
2.4.5 Immunhistochemie	28
2.5 VERHALTENSTESTS	28
2.5.1 Rotarod	28
2.5.2 Motorperformance-Test	29
2.6 STATISTIK.....	29
2.6.1 Software	29
2.6.2 Student's t-Test	29
2.6.3 Mann-Whitney U-Test	29
2.6.4 ANOVA.....	29
3. ERGEBNISSE	30
3.1 INAKTIVIERUNG DES SOMATISCHEN CYTOCHROM C GENS DER MAUS	30
3.1.1 Zielsetzung und Zusammenfassung	30
3.1.2 Genetische Inaktivierung des Cytochrom C Gens.....	30
3.1.3 Analyse der Cytochrom C Knockout Maus.....	36
3.1.4 Analyse der Folgen der Reduktion der Cytochrom C Gendosis auf die Apoptose von Motoneuronen.....	38
3.1.5 Analyse der Folgen der Reduktion der Cytochrom C Gendosis auf die Apoptose von Thymozyten.....	40
3.1.6 Weitere Untersuchungen der Maus mit heterozygoter Inaktivierung des Cytochrom C Gens.....	43
3.2 ANALYSE DER NFL-CRE MAUS	44
3.2.1 Zielsetzung und Zusammenfassung	44
3.2.2 Etablierung der Linie NFL-Cre	44
3.2.3 Analyse der transgenen Cre Expression von NFL-Cre	45
3.3 DIE ROLLE VON STAT3 FÜR DAS ÜBERLEBEN VON MOTONEURONEN.....	52

3.3.1 Zielsetzung und Zusammenfassung	52
3.3.2 Inaktivierung von Stat3 in Motoneuronen	52
3.2.3 Stat3 ist nicht essentiell für spinale Motoneurone während der Zeit des embryonalen Zelltods	55
3.2.4 Mäuse mit neuronspezifischer Inaktivierung von Stat3 zeigen keine Neurodegeneration.....	56
3.2.5 Endogenes Stat3 ist für das Überleben von Motoneuronen nach Fazialisläsion notwendig	56
3.2.6 Motoneurone ohne funktionelles Stat3 können nach Läsion mit neurotrophen Faktoren gerettet werden	57
3.2.7 Die Expression von Reg-2 und Bcl-xL wird Stat3 abhängig in lädierten Motoneuronen induziert ...	58
3.2.8 Die Expression von Genen für IAPs wird nicht nach Läsion in Motoneuronen induziert	61
3.2.9 Mäuse mit Inaktivierung des Stat3 Gens in Neuronen erleiden größere Infarkte im Ischämiemodell als Mäuse mit funktionellem Stat3.....	62
3.2.10 Spielt Stat3 auch bei der genetisch bedingten Neurodegeneration eine Rolle ?	63
3.4 GERICHTETE MUTAGENESE DES LIF-REZEPTOR GENS IN ES-ZELLEN.....	65
3.4.1 Zielsetzung und Zusammenfassung	65
3.4.2 Einführung der Punktmutationen mit der Hit&Run Methode	65
3.4.3 Klonierung der Replacement-Vektoren	72
3.4.4 Herstellung von Punktmutanten der LIFR cDNA.....	73
3.4.5 Umklonierung der LIFR cDNA in bicistronische Expressionsvektoren	73
4. DISKUSSION	75
4.1 INAKTIVIERUNG DES SOMATISCHEN CYTOCHROM C GENS IN DER MAUS	75
4.1.1 Zur Zielsetzung der Arbeit.....	75
4.1.2 Genetische Inaktivierung in Mäusen zur Erforschung der Apoptose in Nervenzellen.....	76
4.1.3 Genetische Inaktivierung von Cytochrom C.....	77
4.2 ANALYSE DER EXPRESSION VON CRE IN DER NFL-CRE TRANSGENEN MAUS	80
4.2.1 NFL-Cre als Werkzeug für die Untersuchung von Genen im Gehirn von Mäusen	80
4.2.2 Zur Regulation des NFL-Cre Transgens	80
4.3 KONDITIONALE INAKTIVIERUNG VON STAT3 IN NEURONEN.....	82
4.3.1 Die Rolle von Stat3 beim neuronalen Überleben.....	82
4.3.2 Andere Signalwege für das Überleben von Motoneuronen	84
4.3.3 Die Rolle von Stat3 für das neuronale Überleben in anderen Modellen der Neurodegeneration.....	85
4.4 PUNKTMUTATIONEN IM LIFR DER MAUS	84
4.5 GEDANKEN ZUR KOOPERATIVITÄT UND SPEZIFITÄT IN DER SIGNALTRANSDUKTION.....	86
5. LITERATURLISTE.....	89
6. LEBENS LAUF UND EIGENE PUBLIKATIONEN.....	104

DANKSAGUNG

Zusammenfassung

Genetische Inaktivierung des somatischen Cytochrom C Gens der Maus

Cytochrom C wurde als ein Interaktionspartner im Apoptosom beschrieben. Ziel dieses Projektes war es, die Rolle von Cytochrom C bei der Apoptose von Nervenzellen in vivo durch genetische Inaktivierung in der Maus zu untersuchen. Die homozygote Deletion des Cytochrom C Gens führt jedoch zu einem sehr frühen Entwicklungsdefekt: Schon am 8. Embryontag findet man nur noch Embryonen ohne erkennbare Körperachse. Im weiteren wurden daher heterozygote Tiere untersucht, die in bestimmten Geweben, wie Gehirn und Rückenmark, eine Reduktion der Menge von Cytochrom C aufweisen. Am ersten Tag nach der Geburt konnten keine Unterschiede zwischen Tieren mit einem oder zwei Cytochrom C Genen in Bezug die Anzahl von Motoneuronen gefunden werden. Auch nach perinataler Fazialisläsion war die Rate des Zelltods bei Tieren mit heterozygoter Deletion des Cytochrom C Gens unverändert. In vitro zeigte sich jedoch eine erhöhte Resistenz von Motoneuronen gegenüber Fas-induzierter Apoptose. Bei der Analyse der Apoptose von Thymozyten zeigte sich ein Trend, der eine kleine, aber reproduzierbare Verzögerung einer späten Zelltodphase nach UV-induzierter Apoptose nahelegt. Erste Experimente deuten außerdem auf einen Effekt der Cytochrom C Gendosis auf den Verlauf einer Experimentellen Autoimmunencephalitis (EAE) hin.

Charakterisierung der NFL-Cre Maus

Die zelltypspezifische Genablation mit dem Cre/loxP System umgeht einige der größten Probleme der klassischen Methode der Geninaktivierung in Mäusen, indem nur in bestimmten Geweben oder Zelltypen, eventuell sogar nur ab einem bestimmten Zeitpunkt, ein Gen gezielt ausgeschaltet werden kann. Allerdings hängt das Cre/loxP System von der Verfügbarkeit von brauchbaren Cre-transgenen Mauslinien mit entsprechenden Expressionsmustern und – kinetiken ab. Wir haben eine transgene Mauslinie etabliert und analysiert, die die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Neurofilament-L Promotors exprimiert. Das Expressionsmuster von Cre wurde in mehreren Geweben mit RT-PCR und durch Kreuzung mit einer Reportergermaus untersucht. Im Gehirn wurden Cre exprimierende Zelltypen mit in-situ Hybridisierung, Immunhistochemie und wiederum mit Hilfe der Reportermaus identifiziert. Dabei zeigte sich eine spezifische Cre Expression in bestimmten Neuronpopulationen wie hippocampalen Pyramidenzellen und spinalen und cranialen Motoneuronen.

Unsere NFL-Cre Maus besitzt einige Eigenschaften, die bisher publizierte Cre-Linien nicht aufweisen, so z.B. eine starke Cre Expression in hippocampalen Pyramidenzellen, aber nicht in Körnerzellen des Gyrus dentatus; Expression in kortikalen Pyramidenzellen, aber keine Expression im Striatum; Expression in zerebellären Purkinje-, aber nicht Körnerzellen; sowie die Expression in spinalen und cranialen Motoneuronen, aber nicht in angrenzenden Interneuronen.

Die Rolle von Stat3 für das Überleben von Motoneuronen

Die Mitglieder der CNTF/LIF/Cardiotrophin Genfamilie sind potente Überlebensfaktoren für embryonale und lädierte Motoneurone sowohl in vitro als auch in vivo. Diese Faktoren binden an Rezeptorkomplexe, die gp130 und LIFR als signaltransduzierende Komponenten enthalten. Im Gegensatz zu den Rezeptoren für andere neurotrophe Faktoren, führt die Aktivierung von gp130 und LIFR zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3. Es war aber zu Beginn dieser Arbeiten unklar, ob die Aktivierung von Stat3 für den Überlebens-effekt der neuropoetischen Zytokine notwendig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde Stat3 in Motoneuronen mit Hilfe des Cre/loxP Systems konditional inaktiviert. Stat3 ist nicht für das Überleben embryonaler Motoneurone essentiell, obwohl man in vitro eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve für CNTF findet. In vivo hingegen kann kein erhöhter Zelltod von Motoneuronen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, kommt es bei adulten Tieren mit Inaktivierung von Stat3 in Motoneuronen zu einem erhöhten Zelltod nach Fazialisläsion. Diese Neurone können wiederum durch die Applikation neurotropher Faktoren, einschließlich CNTF, gerettet werden. Durch semiquantitative RT-PCR kann man zeigen, daß Stat3-regulierte Gene, deren Expression nach Nervenläsion induziert wird, in Neuronen mit Inaktivierung von Stat3 weniger stark exprimiert werden. Zu diesen Genen gehören Reg-2, ein Mitogen für Schwannzellen, das von regenerierenden Neuronen exprimiert wird, und Bcl-xL, ein Gen, welches direkt in die Apoptoseregulation eingreift. Diese Daten zeigen, daß Stat3 Aktivierung eine essentielle Rolle für das Überleben nach Läsion von postnatalen Motoneuronen spielt, aber nicht während der Embryonalentwicklung. Das bedeutet, daß die Signalwege ein und desselben neurotrophen Faktors sich während der Entwicklung und reifung des Organismus verändern können.

Gerichtete Mutagenese des LIF-Rezeptor Gens in ES-Zellen

Zielsetzung war es, durch gerichtete Mutagenese in der Keimbahn der Maus gezielt einzelne Signalwege, die am LIFR beginnen, auszuschalten, um ihre jeweilige Rolle für das Überleben und die Regeneration von Motoneuronen zu untersuchen. Durch Substitution von Tyrosin durch Phenylalanin sollte die Phosphorylierung von SH2-Bindestellen für SHP-2 (YIDV) und STAT3 (YQPQ, YKPK, YRPQ) im LIFR ausgeschaltet werden. Dazu wurde zuerst ein Bereich des Gens für den LIFR der Maus kloniert. Nach Einführung von gezielten Punktmutationen wurden Targeting-Vektoren für die Hit&Run Methode kloniert und elektroporiert. Die Integration (“Hit”) der entsprechenden Konstrukte verlief mit hoher Ausbeute. Leider wurden bei der anschließenden Reversion (“Run”) zwar viele Revertanten gefunden, diese hatten jedoch alle zum Wildtyp revertiert. An dieser Stelle war unklar, ob es sich um ein technisches Problem handelte oder ob die Mutanten in embryonalen Stammzellen einen dominant negativen Effekt hatten. Deshalb wurde ein alternativer “knock-in” Ansatz mit konventionellen Replacement-Vektoren verfolgt. Diese Vektoren wurden in embryonale Stammzellen elektroporiert. Das Screening auf die gewünschten Rekombinanten dauert noch an. Dieselben Mutationen wurden auch in die cDNA für den LIF-Rezeptor eingeführt und diese in verschiedene bicistronische Expressionsvektoren kloniert, um die Voraussetzung zu schaffen, bei Bedarf neurale Stammzellen von LIFR^{-/-} Embryonen zu transfizieren.

Summary

Genetic inactivation of the somatic cytochrome C gene in mice

Cytochrome C has been described as a component of the apoptosome. It was the aim of this project to analyze the role of cytochrome C in apoptosis of neurons in vivo by genetic inactivation in mice. Mice lacking cytochrome C, however, exhibit a very early embryonic phenotype: On embryonic day 8, only highly degenerated embryos can be found which even lack a body axis. Therefore, we subsequently analyzed heterozygous animals, as they showed a gene dose-dependent reduction of cytochrome C protein in several tissues, including brain and spinal cord. Testing motoneuron survival after development or after facial nerve lesion, we found no significant differences between heterozygous animals and their wildtype litter mates. In vitro, however, an increased resistance toward Fas-mediated apoptosis was observed in heterozygous motoneurons. When we analyzed induced apoptosis of thymocytes, we consistently found that a late phase of cell death was delayed in cytochrome C heterozygous cells.

Characterization of the Cre-transgenic NFL-Cre mouse

Cell type-specific gene ablation using the Cre/loxP technology can circumvent some of the greatest problems encountered with classical gene inactivation by selective inactivation of the gene of interest in a particular tissue or cell type, possibly at a specific time point. However, the Cre/loxP technology critically depends on the availability of suitable Cre-transgenic mouse lines. We have established and characterized a transgenic mouse line that expresses Cre recombinase under control of the human neurofilament-L promoter. Cre expression was studied by RT-PCR and cross-breeding with lacZ reporter mice. Our NFL-Cre mice exhibit some unique features not shared with other available Cre transgenic mouse lines: We find high Cre expression in hippocampal pyramidal neurons while granule cells in the dentate gyrus do not express Cre. In addition, we observed widespread Cre expression in cortical neurons, but none in striatal neurons. Finally, Cre is expressed in cranial and spinal motoneurons, but not in adjacent interneurons.

The role of Stat3 for the survival of motoneurons

Members of the CNTF/LIF/Cardiotrophin gene family are potent survival factors for embryonic and lesioned motoneurons in vitro as well as in vivo. These factors act through receptor complexes containing gp130 and LIFR signal transducing subunits. A particular feature of these receptors is that their activation leads to phosphorylation and activation of the transcription factor Stat3, while neurotrophin receptors do not activate Stat3. It was the aim of this project to find out whether Stat3 activation in response to CNTF binding is required for its survival effect on motoneurons. Therefore, we conditionally inactivated Stat3 in motoneurons using our NFL-Cre transgenic mice. In NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} mice, we find that Stat3 is not essential for motoneuron survival during the the period of naturally occurring cell death, although motoneurons from these mice require higher doses of CNTF for their survival in vitro. In contrast, motoneuron survival is significantly reduced after facial nerve lesion in adult NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} mice. Stat3 proved essential for upregulation of Reg-2 and Bcl-xL expression in lesioned motoneurons. These data show that Stat3 activation plays an important role for motoneuron survival after nerve lesion in postnatal life but not during embryonic development, indicating that signaling requirements for motoneuron survival change during maturation.

Site-directed mutagenesis of the LIFR gene in embryonic stem cells

The aim of this project was to introduce precise mutations into the LIFR gene of mice to dissect the role of individual signaling pathways downstream of LIFR activation. To this end point mutations should be introduced changing tyrosine residues to phenylalanine thereby abolishing binding site for specific downstream effector molecules like SHP-2 and Stat3. Using the Hit&Run method, correctly targeted ES cell clones were recovered at high frequency. However, upon “reversion” the mutations were not retained in any of 44 clones analyzed. As the reason for this was unclear and technical problems could not be excluded, an alternative knock-in approach was pursued. G418 resistant clones have been screened by PCR and candidate clones are being verified by Southern Blot analysis. The same mutations have also been introduced into the mouse cDNA for LIFR and cloned into bicitronic expression vectors. They are available for introduction into LIFR^{-/-} neural stem cells.

1. Einleitung

1.1 Neuronaler Zelltod während der Entwicklung

Die Entdeckung, daß während der Embryonalentwicklung von höheren Wirbeltieren Nervenzellen zuerst im Überschuß gebildet werden und im weiteren Verlauf wieder untergehen, geht auf die Arbeiten von Viktor Hamburger zurück (Hamburger 1934, 1958, zusammengefaßt in Hamburger, 1992). Er hatte beobachtet, daß im lumbalen Rückenmark des Hühnchenembryos zwischen Embryonaltag 6 und 10 mehr als die Hälfte der Motoneurone degenerieren. Er hatte auch beobachtet, daß die Entfernung der Anlagen für Gliedmaßen zu einem Verlust der entsprechenden Motoneuronen führt. Umgekehrt führte die Transplantation einer zusätzlichen Anlage einer Gliedmaße zum Überleben zusätzlicher Motoneurone, die diese innervierten (Hollyday und Hamburger, 1976). Man leitete aus diesen Experimenten die "Neurotrophe Hypothese" ab, die besagt, daß es Faktoren in den Zielgeweben der Nervenzellen geben muß, die deren Überleben während einer kritischen Phase der Entwicklung regulieren, um die Anzahl der Nervenzellen auf die Größe ihres Zielgewebes abzustimmen (Purves 1988; zusammengefaßt in (Hamburger, 1992; Hamburger, 1993). Der Ersatz von Gliedmaßenanlagen durch Tumorgewebe zeigte, daß nur das jetzt entfernte, eigentliche Zielgewebe die notwendigen Faktoren produziert; gleichzeitig führten diese Experimente zur Entdeckung eines von einem Tumor produzierten Faktors, der das Überleben sympathischer und sensorischer Neurone stark erhöhte (Levi-Montalcini und Hamburger 1951; Levi-Montalcini et al., 1954). Dieser Faktor wurde deshalb "Nervenwachstums-Faktor" (NGF) genannt (siehe unten).

1.2 Zelltod von Motoneuronen bei Erkrankungen des Nervensystems

Im Verlauf bestimmter degenerativer Erkrankungen kommt es ebenfalls zum Verlust von Motoneuronen. Beispiele hierfür sind Krankheiten wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die X-chromosomal gekoppelte spinale Muskelatrophie des Erwachsenenalters (Kennedy's Krankheit) und die Spinale Muskelatrophie (SMA). Bei der ALS sind sowohl das zweite spinale Motoneuron als auch das erste kortikale Motoneuron betroffen. Bei den meisten Patienten bricht die Krankheit in der zweiten Lebenshälfte aus und führt innerhalb weniger Jahre zum Tod. Nur etwa zehn Prozent der Fälle erscheinen erblich, wobei davon nur bei einem kleinen Teil der Patienten Mutationen bekannt sind, die mit der Erkrankung assoziiert sind. So wurden Mutationen in der Cu-Zn Superoxid-Dismutase (SOD1) identifiziert (Rosen et al., 1993), die zur Überproduktion von Peroxynitrit führen sollen, von dem man annimmt,

daß es die Motoneurone schädigt (Estevez et al., 1998; Estevez et al., 1999). Später wurde ein weiteres Gen, *Alsin* identifiziert (Yang et al., 2001). Trotzdem sind die Gründe für eine Degeneration von Motoneuronen bei ALS in der Mehrzahl der Fälle noch völlig unklar. Eine andere Form der Motoneuronerkrankung ist die X-chromosomal gekoppelte spinale Muskelatrophie, bei der es im Gen für den Androgenrezeptor zu einer Polyglutaminexpansion kommt, welche für den Untergang der Motoneurone verantwortlich gemacht wird (La Spada et al., 1991). Die männlichen Patienten erkranken erst nach der Pubertät und der sehr variable Verlauf kann nicht alleine durch die Länge der Polyglutaminexpansion erklärt werden (Brooks and Fischbeck, 1995). Bei der Spinalen Muskelatrophie kommt es schon im Kindesalter zum Verlust von Motoneuronen, der in den meisten Fällen zum Tod der Kinder führt. Es sind bisher zwei Kandidatengene bekannt, die in SMA mutiert sind: *SMN* (Lefebvre et al., 1995) und *IGHMBP2* (Grohmann et al., 2001). Sowohl bei diesen wie auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington gibt es keine wirksame medikamentöse Therapie. Das mag zum Teil daran liegen, daß man über die Mechanismen, die zur Degeneration der Nervenzellen führen, praktisch nichts weiß, selbst wenn bei Erbkrankheiten das entsprechende Gen bekannt ist. Man hofft daher, daß Fortschritte im Verständnis des embryonalen Zelltods und seiner Regulation durch neurotrophe Faktoren neue Wege für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen eröffnen (Sendtner 1999).

1.3 Der biochemische Mechanismus der Apoptose

1.3.1 Allgemeines

Würden sterbende Nervenzellen sich schlicht auflösen, wäre eine Entzündung die unmittelbare Folge. Man findet jedoch weder beim embryonalen Zelltod noch bei Patienten mit ALS inflammatorische Zellen in der Nähe der untergehenden Neurone. Die sterbenden Zellen durchlaufen viel eher einen Schrumpfungsprozess, in dessen Verlauf sie Vesikel mit Zellinhalt abschnüren, die von naheliegenden Zellen phagozytiert werden. Der Zellkern der sterbenden Zelle zeigt charakteristische Veränderungen, bei denen das Chromatin kondensiert und der Kern selbst schließlich fragmentiert. Der Prozess, der zu diesen morphologischen Veränderungen führt, wurde Apoptose genannt (Kerr et al., 1972). Lange Zeit war der Prozess der Apoptose biochemisch nur schwer faßbar und es bedurfte genetischer Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, bis man einem molekularen Verständnis näher kam. In *C. elegans* kommt es während der Entwicklung des Wurmes, bei der die Abstammungen und die Schicksale aller 1090 Zellen genau bekannt sind, zum programmierten Zelltod von exakt

131 Zellen. Man fand jedoch Mutanten, bei denen dieser Zelltod nicht auftrat (Ellis und Horvitz, 1986). Die Entdeckungen, daß *ced-3* und *ced-9* Homologe der humanen Proteine ICE bzw. Bcl-2 (B-cell lymphoma) sind (Yuan et al., 1993; Hengartner and Horvitz, 1994), machte die Untersuchung des programmierten Zelltodes bei Säugern der molekularbiologischen Untersuchung zugänglich.

1.3.2 Induktion der Apoptose

Im heutigen Bild von der Regulation der Apoptose, spielen zwei Proteinfamilien die zentralen Rollen: Cysteinproteasen, die nach Aspartatresten schneiden (Caspasen), sowie pro- und anti-apoptotische Proteine aus der bcl-2 Genfamilie (Abbildung 1.1). Charakteristisch für Mitglieder der bcl-2 Genfamilie sind eine bis vier BH-Domänen (bcl-homology). Jeder pro-apoptotische Stimulus wird mit der Aktivierung eines pro-apoptotischen “BH3-only”-Proteins beantwortet (Huang and Strasser, 2001). Dabei unterteilt man die Initiation der Apoptose in einen “intrinsischen” und einen “extrinsischen” Weg. Der intrinsische Weg beruht auf einer endogenen, also entwicklungspezifischen Genexpression von bestimmten BH3-only-Proteinen (z.B. Bad, Bim), während der extrinsische Weg abhängig von der Ligation von sogenannten “Todesrezeptoren” wie CD95/Fas zur Aktivierung von Bid führt. Selbstverständlich gibt es keine genaue Abgrenzung, denn die “extrinsische” Stimulation mit UV-B Strahlung induziert DNA Schäden, die abhängig von p53 mit der Expression des BH3-only Proteins Noxa beantwortet wird, welches entsprechend Apoptose induziert. Man nimmt an, daß “BH3-only” Proteine zur Aktivierung von Bax und Bak führen, die ihrerseits an die äußere Mitochondrienmembran translozieren, um dort entweder direkt als Kanäle oder als Teil von Kanälen zu wirken, die zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen mitochondrialen Proteinen führen (Polster et al., 2001). Anti-apoptotische Bcl-2 homologe Proteine wie Bcl-2, Bcl-W und Bcl-xL sind in der Lage, diese Funktion von Bax und Bak zu blockieren, womit ihre breite anti-apoptotische Wirkung erklärt werden kann. Die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien führt zur Bildung des “Apoptosoms”, eines Komplexes aus Cytochrom C, Apaf-1 (homolog zu *ced-4*), dATP und Caspase 9 (homolog zu *ced-3*). Durch die Bindung von Cytochrom C an Apaf-1 wird dieses Protein befähigt, mit Caspase-9 zu interagieren und die Autoprozessierung dieser Protease zu unterstützen. Caspase-9 initiiert schließlich die Aktivierung weiterer Caspasen (darunter CPP32/Caspase 3) durch Proteolyse, die ihrerseits durch ihre Aktivität den Zusammenbruch der Zelle in der oben beschriebenen Weise bewerkstelligen (Adrain und Martin, 2001; Slee et al., 2001). Als Beispiel soll genügen, daß die für die Apoptose so charakteristische internucleosomale DNA Fragmentierung durch

die Caspase aktiviert DNase (CAD) durchgeführt wird. CAD wiederum ist konstitutiv durch ein Inhibitorprotein (ICAD) inhibiert, welches durch Caspase 3 gespalten wird, um CAD zu aktivieren (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Dieses “kanonische” Modell der Apoptose kann allerdings nicht alle experimentellen Befunde erklären; so haben Experimente mit transgenen Mäusen mit Inaktivierung der Gene für Caspase 3 oder Caspase 9 gezeigt, daß es in vivo durchaus zur Kompensation durch andere Caspasen kommen kann (Zheng et al., 2000).

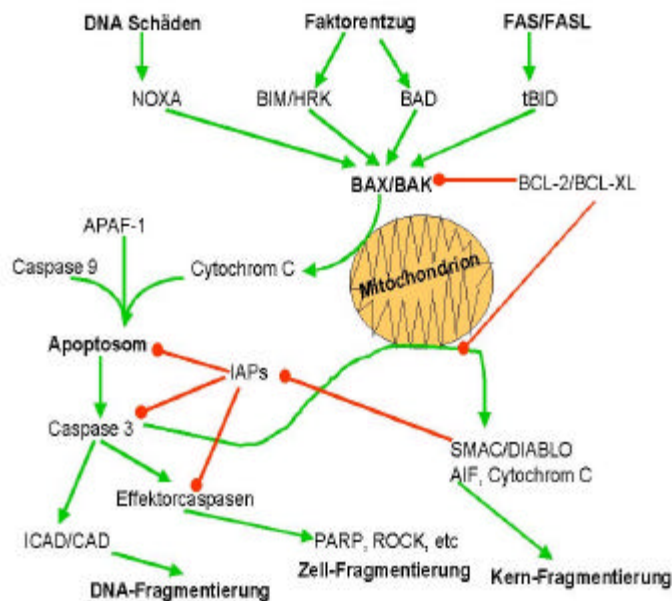


Abbildung 1.1: Biochemischer Mechanismus der Apoptose. Spezifische Induktoren des Zelltodes induzieren die Aktivierung von Proteinen der “BH-3-only” Bcl-2 Subfamilie. Diese bewirken über Bax und/oder Bak die Freisetzung von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Cytochrom C, Apaf-1 und Caspase 9 bilden zusammen mit ATP das Apoptosom, in dem es zur Autoaktivierung von Caspase 9 kommt. Aktive Caspase 9 startet die “Caspasen-Kaskade”, die schließlich zu Zelltod und Desintegration der Zelle führt.

1.3.3 Regulationsebenen der Apoptose

Caspasen werden als weitgehend inaktive Zymogene synthetisiert, dennoch besitzen sie eine geringe Fähigkeit zur Autoprozessierung. Aus diesem Grunde ist es einsichtig, daß es eine Klasse von Proteinen gibt, die als Inhibitoren der Caspasen fungiert: die IAP Proteine (inhibitor of apoptosis proteins; Deveraux and Reed, 1999). Die ersten IAPs wurden in Baculoviren identifiziert (Sugimoto et al., 1994; Xue und Horvitz, 1995; Bump et al., 1995) und haben vermutlich die Aufgabe, die infizierten Zellen an der Apoptose zu hindern. Sie enthalten eine charakteristische Proteindomäne: die BIR-Domäne (baculovirus inhibitor of apoptosis related). Mit BIR-spezifischen Sonden gelang es, mehrere IAPs bei Säugern zu klonieren (unter anderem IAP-1, IAP-2, XIAP). Es wurde gezeigt, daß eine Funktion von Überlebensfaktoren die Stimulation der Expression von IAPs ist (Wiese et al., 1999a). Andererseits wurde Diablo/SMAC (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) als ein Protein identifiziert, das bei der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt wird, um die IAP-vermittelte Inhibition von Caspasen wieder aufzuheben. Allerdings scheint die Freisetzung

von SMAC aus Mitochondrien wiederum abhängig von Caspasen und über Bcl-2 inhibierbar zu sein (Adrain et al., 2001). Es ist daher eher unwahrscheinlich, daß es einen linearen Weg zur Apoptoseinduktion gibt, sondern eher ein Netzwerk von Wegen verschiedene pro- und anti-apoptotische Signale integriert. Manche BH3-only-Proteine, wie Bid und Bad, werden posttranslational reguliert. Bid wird nach Aktivierung von Fas durch Caspase-8 gespalten, und erst das c-terminale Spaltprodukt tBid entfaltet die pro-apoptotische Wirkung (Luo et al., 1998). Die Gegenwart von neurotrophen Faktoren führt in cerebellären Körnerzellen zur Phosphorylierung von Bad (Datta et al., 1997). Durch diese Phosphorylierung wird Bad durch 14-3-3 Proteine im Cytoplasma gebunden und an der Interaktion mit Bax am Mitochondrion gehindert (Datta et al., 2000).

1.4 Neurotrophe Faktoren, ihre Rezeptoren und Signaltransduktion

1.4.1 Neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren

Inzwischen kennt man eine ganze Familie NGF-homologer Proteine, die Neurotrophine (Barde, 1990). Es konnte gezeigt werden, daß BDNF (brain derived neurotrophic factor) und NT-4 (Neurotrophin-4) neurotrophe Faktoren für Motoneurone darstellen (Sendtner et al., 1992a; Funakoshi et al., 1995). BDNF und NT-4 werden jedoch nicht im embryonalen Muskel exprimiert und kommen daher nicht als Überlebensfaktoren für embryonale spinale Motoneurone in vivo in Frage. CNTF (ciliary neurotrophic factor) ist ein potenter Überlebensfaktor für Motoneurone in vitro und in vivo (Sendtner et al., 1992b), wird aber in postnatalen Schwanzzellen und nicht im embryonalen Muskel exprimiert (Sendtner et al., 1992c). Schließlich wurden in der Folge eine ganze Reihe neurotropher Faktoren für Motoneurone identifiziert bzw. gereinigt und kloniert (Tabelle 1.1). Mit den meisten dieser Faktoren kann man degenerierende Neurone nach Läsionen im Tierexperiment retten. Von diesen Faktoren spielen jedoch nur CT-1 (Cardiotrophin-1, (Pennica et al., 1996) und vermutlich CLC (Elson et al., 2000) die Rolle eines neurotrophen Faktors für Motoneurone während der Phase des natürlichen Zelltods (Oppenheim et al., 2001). Der erste Rezeptor für NGF, der kloniert wurde, p75^{NTR} (Chao et al., 1986) hatte keinerlei Ähnlichkeit mit den inzwischen bekannten Tyrosinkinase-Rezeptoren. Bis zur Entdeckung, daß das Protoonkogen trkA einen solchen Rezeptor für NGF darstellt, war es schwer zu verstehen, wie NGF seine Wirkung in Zielzellen entfalten soll (Vetter et al., 1991; Kaplan et al., 1991). Wegen seiner entfernten Ähnlichkeit mit dem TNFR-I gewann die Vorstellung an Popularität, daß p75^{NTR} sogar eher ein "Todesrezeptor" sei (Casaccia-Bonofil et al., 1996; Frade et al., 1996). Inzwischen ist bekannt, daß p75^{NTR} und trkA zusammen einen hochaffinen Neurotrophin-

rezeptorkomplex bilden (Green und Greene, 1986; Hempstead et al., 1991; Bibel et al., 1999; Wiese et al., 1999b). Abgesehen von der Bindung der Neurotrophine an p75^{NTR}, binden die Neurotrophine und die meisten anderen neurotrophen Faktoren an Wachstumsfaktorrezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (trkA, trkB, trkC, IGFI-R, FGF-R2, c-met, c-ret). Davon unterscheiden sich die neurotrophen Zytokine, welche an zusammengesetzte Rezeptoren aus gp130 und LIFR, sowie entsprechende spezifitätvermittelnde Untereinheiten binden. Rezeptoren von diesem Typ besitzen keine intrinsische, sondern eine assoziierte Tyrosinkinaseaktivität durch Januskinasen (JAK).

Tabelle 1.1 Neurotrophe Faktoren für Motoneurone und ihre Rezeptoren

Neurotropher Faktor	Rezeptor auf Motoneuronen
1. Neurotrophine	
Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	p75 ^{NTR} , trkB
Neurotrophin-3 (NT-3)	p75 ^{NTR} , trkC
Neurotrophin-4 (NT-4)	p75 ^{NTR} , trkB
2. CNTF/LIF Genfamilie	
Ciliary neurotrophic factor (CNTF)	gp130, LIFR, CNTFR- α
Leukemia inhibitory factor (LIF)	gp130, LIFR
Cardiotrophin-1 (CT-1)	gp130, LIFR, ?
Cardiotrophin-1-like-cytokine (CLC)	gp130, LIFR, CNTFR- α ?, CLF
3. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF)	c-met
4. Insulin-like growth factors	
Insulin-like growth factor I	IGFI-R
Insulin-like growth factor II	IGFII-R
5. Glial-derived neurotrophic factor und Homologe	
Glial-derived growth factor (GDNF)	c-ret, GFR α 1
Neurturin (NTR)	c-ret, GFR α 2
Artemin	c-ret, GFR α 3
Persephin	c-ret, GFR α 4
6. Fibroblast growth factors	
FGF-2, -5, -9 und andere ?	FGFR-2

(modifiziert nach Sendtner et al., 2000)

1.4.2 Signalwege, die durch neurotrophe Faktoren aktiviert werden

Alle beschriebenen Rezeptoren werden nach Ligandenbindung an bestimmten Tyrosinseitenketten phosphoryliert. Diese Phosphotyrosinepitope stellen daraufhin spezifische Bindungsstellen für Proteine dar, die über entsprechende Bindungsdomänen (SH-2 oder PTB-Domänen) verfügen. Nach Bindung an den Rezeptor werden diese Bindungsproteine meist selbst an Tyrosinresten phosphoryliert und/oder entfalten ihre Wirkung durch ihre Lokalisation in der Nähe der Plasmamembran. Ein zentrales Paradigma der Signaltransduktion stellt der Ras-Raf Weg dar, der von allen neurotrophen Faktoren aktiviert wird: Das Adapterprotein Shc bindet ein Phosphotyrosinepitop am aktivierten Rezeptor und wird daraufhin selbst phosphoryliert, um eine Bindungsstelle für Grb2 darzustellen, welches in einem Komplex mit Sos vorliegt. Sos ist ein Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) für Ras, welcher sich schon an der Membran befindet. Aktiviertes Ras kann daraufhin die Raf Kinase binden, die ihrerseits durch diese Bindung katalytisch aktiviert wird und ihre Effektoren, z.B. MEK phosphoryliert. MEK phosphoryliert ERK und ERK aktiviert den Transkriptionsfaktor CREB, der seinerseits Gene wie z.B. c-fos aktiviert (Sheng und Greenberg, 1990; Ginty et al., 1994; Xia et al., 1996) oder auch zum neuronalen Überleben beiträgt (Riccio et al., 1999; Abbildung 1.2).

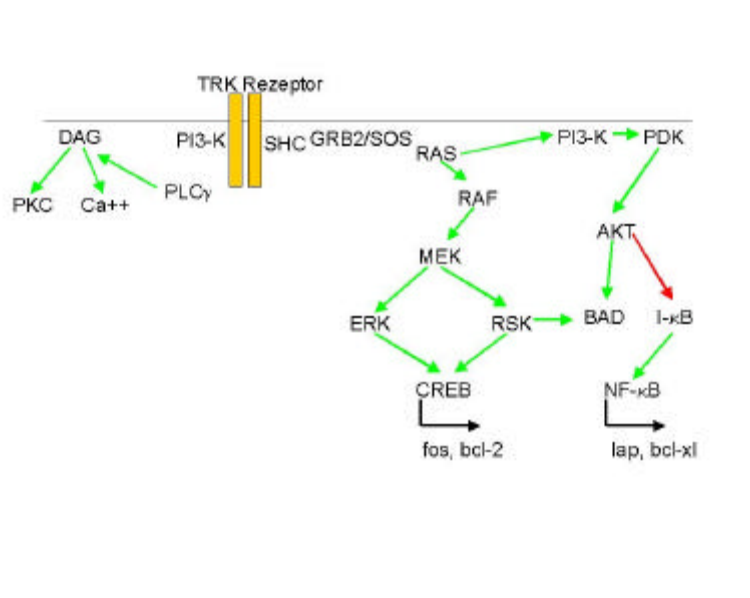


Abbildung 1.2: Klassische Signalwege der Neurotrophine. Die Neurotrophinrezeptoren der trk Familie sind klassische Rezeptortyrosinkinase, die durch Autophosphorylierung Bindungsstellen für Signalmoleküle bereitstellen. Dargestellt sind die klassischen drei Signalwege: PLC bildet die second messenger Diacylglycerin und Inositolphosphat, die ihrerseits zur PKC Aktivierung und Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern führen. PI3-K führt über eine Kinasekaskade zu Akt (PKB) Aktivierung und die Bindung von Grb/Sos an den Rezeptor aktiviert den Ras/Raf-Weg. Schließlich induzieren die meisten Signalwege Änderungen in der Genaktivität.

Erschwert wird das Verständnis dieser Signalkaskaden durch Bifurkationen auf fast jeder Ebene: Der Rezeptor bindet außerdem PLC γ , sowohl Shc als auch andere Adapterproteine (z.B. FRS, IRS, GAB) können dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor besetzen und es gibt immer mehrere Mitglieder jeder Genfamilie (z.B. H-ras, K-ras, N-ras; A-raf, B-raf, c-raf-1). Weiterhin hat jedes Signalmolekül mehrere Effektoren (Ras aktiviert unter anderem auch PI3-K), MEK aktiviert auch RSKs.

Andererseits konvergieren mehrere Signalwege in einem Signalmolekül (Raf wird auch durch Tyrosin- und Serinphosphorylierung reguliert). Folglich handelt es sich in Wahrheit nicht um Signaltransduktionskaskaden, sondern um Netzwerke. Dazu kommt, daß jedes Signal auch wieder abgeschaltet werden muß und diese "Aus"-Schalter (GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs) und Proteinphosphatasen) selbst Teile von Signalwegen und vielfältig regulierbar sind. Schließlich muß man berücksichtigen, daß die Lokalisation von Signalproteinen ebenfalls eine Rolle für ihre Aktivität und Regulation spielt: c-Raf-1 ist z.B. Teil des Rezeptorkomplexes von trk-A in retrograd transportierten Endosomen ("signalling endosome", Howe et al., 2001), während B-Raf ausschließlich an mitochondrialen Membranen lokalisiert zu sein scheint (G.Pei, Dissertation, Würzburg 2001; Wiese et al., 2001).

1.4.3 Wie interferieren neurotrophe Faktoren mit dem Apoptosemechanismus ?

Cerebelläre Körnerzellen lassen sich in relativ großen Mengen aus Nagetieren isolieren und in hoher Reinheit präparieren. Man kann sie mit brauchbarer Ausbeute transfizieren, so daß sie sich als Modell zur Untersuchung der Signaltransduktion in Neuronen sehr gut eignen. Vieles, was im Detail über die Signaltransduktion von neurotrophen Faktoren in Neuronen bekannt ist, wurde mit cerebellären Körnerzellen erarbeitet. Arbeiten aus dem Labor von M. Greenberg haben gezeigt, daß die Überlebenswirkungen von IGF-I und BDNF in Körnerzellen auf der einen Seite unterschiedlich sind, sich aber teilweise überlappen: Der Überlebenswirkung von BDNF wird über zwei Wege vermittelt. Über den Ras-Raf Weg kommt es zur Aktivierung von CREB und schließlich zur transkriptionellen Aktivierung von bcl-2. Überexpression von dominant negativen CREB Protein führt zum Zelltod. Gleichzeitig führt die Aktivierung des Ras-Raf Weges aber auch zur Phosphorylierung von Bad über RSK (Bonni et al., 1999). Der Überlebenswirkung von IGF-I, der wiederum mit einem PI3-K Inhibitor, LY294007, ausgeschaltet werden kann, führt letztlich ebenfalls zur Bad Phosphorylierung. Interessanterweise führt BDNF aber zur Phosphorylierung von Serin 112, während IGF-I zur Phosphorylierung von Serin 136 führt. Somit konvergieren beide Wege in vitro auf dem selben Protein, aber nicht auf derselben Phosphorylierungsstelle (Bonni et al., 1999). Sympathische und

sensorische Neuronen aus Hühnchen- und Mäuseembryonen lassen sich durch Trituration oder Mikroinjektion transfizieren. Es wurde gezeigt, daß NGF über die Aktivierung von CREB zum neuronalen Überleben beiträgt (Riccio et al., 1999). Mit sympathischen Neuronen konnte auch gezeigt werden, daß neurotrophe Faktoren die Expression von IAP Proteinen regulieren (Wiese et al., 1999a), wobei der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle spielt (Middleton et al., 2000) und eventuell über PI3-K aktiviert wird (Romashkova und Makarov, 1999; Alonzi et al., 2001). PI3-K spielt auch eine Rolle bei der Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Bad (Datta et al., 1997) und des Transkriptionsfaktors FRHL-1, der andernfalls zur Expression von FasL beiträgt (Brunet et al., 1999). Motoneurone kann man in vitro mit vielen Faktoren am Leben halten. Es stellt sich daher die Frage nach der Spezifität ihres Überlebenssignals. Alle entsprechenden Rezeptoren haben die gemeinsame Eigenschaft, daß sie zur Ras Aktivierung führen. Tatsächlich konnte man durch Transfektion von primären Motoneuronen des Hühnchens mit konstitutiv aktivem Ras Protein (V12RAS) diese Motoneuronen in vitro am Leben erhalten (Weng et al., 1996). Im Einklang damit wurde gezeigt, daß embryonale sensorische und Motoneuronen der Maus absolut abhängig von B-Raf sind, unabhängig vom angebotenen neurotrophen Faktor (Wiese et al., 2001). Motoneuronen können auch durch erhöhte cAMP Spiegel am Leben erhalten werden (Hanson, et al., 1998). Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieser Effekt über RAP1 und seinen Effektor B-Raf vermittelt wird (York et al., 1998). Unterschiedliche Neuronentypen scheinen also sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Signalwege für ihr Überleben zu brauchen.

1.5 Die Rolle des LIF-Rezeptors für das Überleben von Motoneuronen

Der Rezeptorkomplex für die neurotrophen Zytokine LIF, CNTF und CT-1 besteht wie oben ausgeführt aus gp130, LIFR- β (LIFR) und je nach Zytokin einem spezifischen α -Rezeptor, der im Falle von CNTF über einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden ist (Davis et al., 1991), und im Falle von CT-1 noch nicht bekannt ist (Stahl und Yancopoulos, 1994). Das zuletzt entdeckte Zytokin CLC (Cardiotrophin-like cytokine) bindet den CNTFR- α nur zusammen mit dem Korezeptor CLF/NR6 (Elson et al., 2000). Die Rolle, die gp130, LIFR, CNTFR- α und NR6 für das embryonale Überleben von Motoneuronen spielen, läßt sich aus Genablationsstudien bei der Maus ersehen. Alle Mäuse mit entsprechender homozygoter Inaktivierung eines dieser Gene sterben perinatal, wobei sie weder richtig atmen noch säugen (Alexander et al., 1999). Bei diesen Mäusen fehlen bei der Geburt bis zu 40 % der Motoneurone in bestimmten Hirnstammkernen oder im Rückenmark (DeChiara et al., 1995; Li et al., 1995; Nakashima et al., 1999). Im Gegensatz dazu findet man weder bei LIF $-/-$ noch bei

CNTF $-/-$ Mäusen einen Verlust von Motoneuronen bei der Geburt. Lediglich bei CT-1 $-/-$ Mäusen findet man eine moderate Zunahme des Verlusts von Motoneuronen während der Embryonalentwicklung (Oppenheim et al., 2001). Man nimmt an, daß CLC der bisher fehlende Ligand des CNTFR- α ist, der in der Embryonalentwicklung eine Rolle für das Überleben der Motoneurone spielt, da die CLF/NR6 $-/-$ Mäuse den selben Phänotyp wie die CNTFR- α $-/-$ Mäuse haben. Die Genablationsstudien deuten darauf hin, daß CNTF und LIF vor allem postnatal eine Rolle spielen. Während die CNTF $-/-$ Maus postnatal einen progressiven Verlust von Motoneuronen aufweist (Masu et al., 1993), konnte gezeigt werden, daß CNTF und LIF eine besondere Rolle nach Nervenläsionen spielen (Sendtner et al., 1996). CNTF wird bei einer Nervenläsion aus Schwanzzellen freigesetzt (Sendtner et al., 1992c; Sendtner et al., 1997) und LIF wird an der Läsionsstelle produziert (Curtis et al., 1994). Beide Zytokine werden nach der Läsion von Motoraxonen retrograd transportiert (Curtis et al., 1993; Curtis et al., 1994). Weiterhin konnte mit CNTF der Krankheitsverlauf in *pnn* Mäusen, die an einer progressiven Motoneuronendegeneration leiden, verzögert werden (Sendtner et al., 1992b; Sagot et al., 1995b) während GDNF im gleichen Mausmodell zwar den Tod, jedoch nicht den Funktionsverlust der Motoneurone aufhalten konnte (Sagot et al., 1996). Genauso konnte die Überexpression von Bcl-2 zwar den Zellverlust, aber nicht den Krankheitsverlauf bei *pnn* Mäusen verzögern (Sagot et al., 1995a). Es stellt sich also die Frage, welche besonderen Eigenschaften die Signaltransduktion von CNTF gegenüber anderen neurotrophen Faktoren hat, vor allem im Hinblick auf die Regeneration von Neuronen. Die Bindung des Liganden induziert die Heterodimerisierung von gp130 und LIFR und ihre nachfolgende Phosphorylierung an mehreren Tyrosinresten durch rezeptorassoziierte JAK Kinasen (Stahl et al., 1994; Abbildung 1.3). Diese Phosphotyrosinreste (pY) fallen in zwei Gruppen: Die am weitesten membranproximal gelegenen Tyrosine (**pYIDV** im LIFR, und **pYILV** in gp130) werden von den beiden SH2-Domänen der Tyrosinphosphatase SHP-2 gebunden, die außerdem als Adapterprotein für GRB2 fungiert. Die 7 weiteren SH2-Domänen-Bindestellen entsprechen Stat3 Bindungsstellen (**pYXXQ**; Luttkicken et al., 1994; Stahl et al., 1995). Stat3 (signal transducer and activator of transcription) ist ein Transkriptionsfaktor, der nach der Phosphorylierung am Rezeptor dimerisiert und in den Kern transloziert, um Gene zu aktivieren. Tatsächlich hat man gefunden, daß nach einer Nervenläsion, in den axotomierten Motoneuronen Stat3 an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Haas et al., 1999; Schwaiger et al., 2000) und aktiviert bleibt, bis die Regeneration abgeschlossen ist (Schwaiger et al., 2000). Der LIFR/gp130 Komplex aktiviert also direkt den Ras-Raf Weg und Stat3.

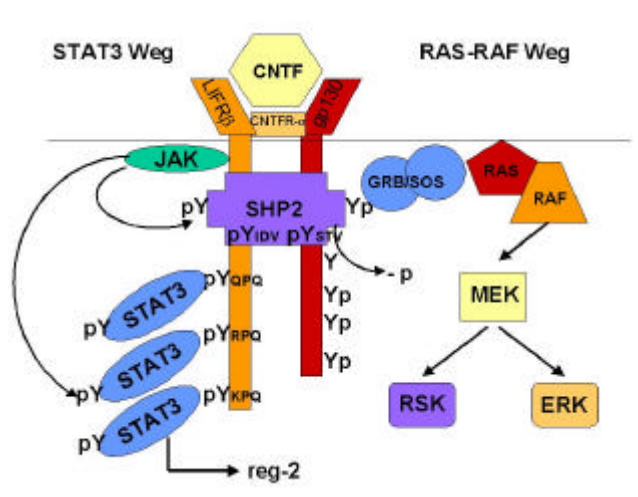


Abbildung 1.3: Signalwege, die am LIFR beginnen. Nach Ligandenbindung werden die Rezeptoruntereinheiten gp130 und LIFR durch JAK Kinasen an Tyrosinresten phosphoryliert und es werden Bindungsstellen für Signalmoleküle wie SHP-2 und Stat3 geschaffen. SHP-2 bindet mit seinen zwei SH2-Domänen beide Rezeptoruntereinheiten gleichzeitig und entfaltet zweierlei Wirkungen. Zum einen ist SHP-2 als Tyrosinphosphatase am Rezeptor aktiv, andererseits wird SHP-2 auch durch JAK an einem Tyrosin phosphoryliert und bildet dadurch eine Bindungsstelle für den Grb/Sos Komplex, der seinerseits zur Ras-Aktivierung führt. An den Rezeptor gebundenes Stat3 wird ebenfalls durch JAK phosphoryliert und kann daraufhin homo- oder heterodimerisieren. Das Stat-Dimer wandert in den Zellkern und wird direkt transkriptionell aktiv. Die Rolle einer Serinphosphorylierung von Stats ist noch immer unklar.

Verschiedene Autoren haben gezeigt, daß CNTF und verwandte Zytokine auch in Motoneuronen den PI3-K Weg aktivieren, der für das Überleben *in vitro* und *in vivo* essentiell sein soll (Nishimune et al., 2000; Dolcet et al., 2001). Diese Autoren nehmen an, daß CNTF zur Stat3-abhängigen Expression von Reg-2 im Motoneuronen führt und Reg-2 als autokriner Überlebensfaktor über einen bisher unbekanntem Rezeptor zur Aktivierung von PI3-K führt. Die Aktivierung von PI3-K wird allerdings auch durch Ret oder trk Rezeptoren vermittelt (Soler et al., 1999). Es liegt also nahe, anzunehmen, daß Stat3 noch andere Gene aktiviert, deren Expression die Wirkung von CNTF von der Wirkung anderer neurotropher Faktoren unterscheidet.

1.6 Die Rolle von Cytochrom C bei der neuronalen Apoptose

Nachdem gezeigt wurde, daß Cytochrom C bei der Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt wird und zur Ausführung der Apoptose *in vitro* notwendig ist (Kluck et al., 1997; Li et al., 1997; Yang et al., 1997), wurde gefunden, daß auch die Injektion von Cytochrom C in sympathische Neuronen dosisabhängig zum Zelltod führt (Deshmukh und Johnson, 1998). Dieselben Autoren fanden aber auch, daß Cytochrom C nur dann Apoptose induzierte, wenn

den Neuronen gleichzeitig NGF entzogen wurde: Diesen Zustand nannten sie “competence-to-die”, da die molekularen Grundlagen noch unklar waren. Es stellte sich jetzt die Frage, ob Cytochrom C auch in vivo zur Ausführung der Apoptose notwendig war. Im Nervensystem kommt es, wie oben ausgeführt, zu extensivem Zelltod während der Entwicklung und Mäuse mit Inaktivierung der Gene für Caspasen 3 und 9, sowie für Apaf-1, zeigten Defekte bei der Regulation des neuronalen Zelltods während der Entwicklung (Kuida et al., 1996;Kuida et al., 1998;Woo et al., 1998;Hakem et al., 1998;Yoshida et al., 1998). So stellte sich die Frage, ob Cytochrom C in vivo für die Regulation des neuronalen Zelltods notwendig ist.

1.7 Zielsetzungen:

Es ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzungen:

- (1) Deletion des Cytochrom C Genes in der Keimbahn der Maus und Untersuchung der Auswirkungen des Fehlens von Cytochrom C auf die Entwicklung des Nervensystems.
- (2) Mutation der Bindestellen für SHP-2 und Stat3 im Gen für den LIF-Rezeptor, um zu untersuchen, welche Signalwege für das neuronale Überleben in vivo entscheidend sind.
- (3) Zelltyp-spezifische Genablation von Stat3, um auf einem alternativen Weg die Frage zu klären, welche Rolle Stat3 für das Überleben von Motoneuronen in vivo spielt.

1.8 Abkürzungen und Nomenklatur:

Es gibt unterschiedliche Konventionen für die Schreibweise von Genen verschiedener Organismen. Gene werden bei *C. elegans* klein und kursiv geschrieben; bei der Maus wird der erste Buchstabe groß geschrieben, beim Menschen alle. In dieser Arbeit beziehen sich die Bezeichnungen auf verschiedene Arbeiten in unterschiedlichen Organismen (meist Taufliège, Hühnchen, Maus, Ratte und Mensch); daher wurden die Abkürzungen für Gene und Proteine immer wie in der Erstbeschreibung geschrieben, unabhängig davon, auf welchen Organismus sich der Text bezieht. Der Kürze wegen werden für Gene und ihre Produkte nur ihre Abkürzungen verwandt und nur für ausgewählte Gene der volle (und meist ungebräuchliche) Name im Text erwähnt.

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Apaf	Apoptotic protease activating protein
Bad	bcl-2 associated death promoting
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bim	BCL2 interacting mediator of cell death
Bcl-2	B cell lymphoma
BDNF	brain derived neurotrophic factor

CAD	caspase activated DNase
CLC	cardiotrophin like cytokine
CLF	cytokine like factor
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CNTRF- α	CNTF receptor- α
CREB	cAMP responsive element binding protein
CT-1	cardiotrophin-1
DAG	diacylglycerol
ERK	extracellular signal regulated kinase
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
GDNF	glial cell line derived neurotrophic factor
gp130	glycoprotein with 130 kD
HRK	harakiri
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICAD	inhibitor of CAD
IGMBP2	immunoglobulin mu binding protein
JAK	janus kinase
LIF	leukemia inhibitory factor
LIFR	LIF-receptor
NGF	nerve growth factor
NT-3/NT-4	neurotrophin 3/neurotrophin 4
PI3-K	phosphoinositol-3-kinase
PLC	phospholipase C
Ras	rat sarcoma
Reg-2	regenerating protein
RSK	ribosomal S-protein kinase
RT	Reverse Transkriptase
SHP-2	SH-containing phosphatase-2
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMAC	second mitochondria derived activator of caspases
SOD1	Cu,Zn dependent superoxide dismutase
Sos	son of sevenless
STAT	signal transducer and activator of transcription
TRK	tropomyosin receptor kinase

2. Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

2.1.1 Salze, Lösungen und Enzyme

Grundchemikalien in höchster Reinheit wurden von Merck und Sigma bezogen.

Trizol	Life Technologies, Gaithersburg, MD
Glykogen 20 µg/ml	Invitrogen
3-Triethoxysilylpropylamin	Merck, Darmstadt
Silan #35130	Serva
TissueTek (OCT)	Sakura, Zoeterwoude, NL
DABCO	Merck
Aquatex	Merck
DAKO Substrat (NCIP/NBT)	DAKO, Hamburg

Restriktionsenzyme wurden von NEB und Fermentas bezogen.

Weitere Enzyme

T4 DNA Ligase	Fermentas
Shrimp Alkalische Phosphatase	Roche
Taq-Polymerase	Genecraft-Natutec
T3 RNA Polymerase	NEB

Bakterienmedium LB

10g Trypton, 10g NaCl, 5g Hefeextrakt pro Liter Wasser, sofort autoklavieren.

Lösungen für die Zellkultur

wurden von LifeTechnologies, Gaithersburg, bezogen:

Neurobasalmedium, Hank's balanced salt solution (HBSS), B27 Zellkultursupplement, Glutamax.

2.1.2 DNA Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG, Ebersberg oder Life Technologies, Gaithersburg gekauft.

2.1.2.1 Oligonukleotide für das Cytochrom C Projekt

CYCy1	5'-CAC AAT ATG GAC AGA AGG GAT GCG AATCTAG-3'
CYC-x1	5'-GAC ACT TAC GAC AGG CCT TAG GAC G-3'
diagn3revl	5'-GCC ATA AAT ACA GCA GCC ATT AGG-3'
Bamcyt3rev	5'-CGG ATC CGC AAG CAG ATC AGC TAG AG-3'
Specyt3fwd	5'-GAC TAG TGG TTT ATG TAT GAT ATC-3'
cytcRP3	5'-GCA GAT CAA CTA TAA AGA AGT G-3'
cytcFP41	5'-TGC CAA CAA GAA CAA AGG TAA C-3'
cytcRP4	5'-CCA GGT GAT GCC TAA ACA GA-3'
cytcFP2	5'-GGA AGT GAC TTT AAT CGG CAG-3'
3'neo	5'-GAT TCG CAG CGC ATC GCC TT-3'

2.1.2.2 Oligonukleotide für die NFL-Cre und Stat3 Projekte

NFL-Seq	5'-TCG CAG GCT GCG TCA GGA G-3'
pMC-Cre	5'-GGT ATG CTC AGA AAA CGC C-3'
Cre2f	5'-ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG-3'
Cre1r	5'-CTC CCA CCG TCA GTA CGT GAG AT-3'
Z3	5'-GGC CTC TTC GCT ATT ACG-3'
AG2	5'-CTG CTA ACC ATG TTC ATG CC-3'
mStat3e22fwd	5'-CCT GAA GAC CAA GTT CAT CTG TGT GAC-3'
mStat3e23rev	5'-CAC ACA AGC CAT CAA ACT CTG GTC TCC-3'
mStat3e16fwd	5'-CTC CTT GCC AGT TGT GGT GAT C-3'
mStat3e17rev	5'-TGG CGG CTT AGT GAA GAA GTT C-3'
mStat3e21fwd	5'-GTC TCC ACT TGT CTA CCT CTA-3'
mStat3e23rev2	5'-CTG AGG GCT CAG CAC CTT-3'
mStat3a	5'-AGC AGC TGA CAA CGC TGG CTG AGA AGC T-3'
mStat3b	5'-TTG CTG CTC TCG CTG AAG CGC AGT AGG-3'
mStat3c	5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'
STATloxP	5'-GAT TTG AGT CAG GGA TCC ATA ACT TCG-3'

bcl-xlantisense	5'-CGG CTC TCG GCT GCT GCA TT-3'
bclxlsense	5'-AGG CTG GCG ATG AGT TTG AA-3'
bcl2fwd	5'-CTT TGT GGA ACT GTA CGG CCC CAG CAT GCG-3'
bcl2rev	5'-ACA GCC TGC AGC TTT GTT TCA TGG TAC ATC-3'
bcl-wfwd	5'-GAA TTC ATG GCG ACC CCA GC-3'
bcl-wrev	5'-TAG ACT TTC TCA CTT GCT AGC-3'
baxfwd	5'-TGG AGC TGC AGA GGA TGA TT-3'
baxrev	5'-AAG TTG CCA TCA GCA AAC AT-3'
mReg2fwd	5'-AGG AGA AGA CTC TCC GAA G-3'
mReg2rev	5'-TTA ACC AGT AAA TTT GCA G-3'
mefas	5'-CAA CAA TCA GGA CAG CAC ACT C-3'
mefs	5'-ACA CGT AGA TTC CGG CAA GTC-3'
SOD4A	5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3'
SOD4B	5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3'

2.1.2.3 Oligonukleotide für das LIFR Projekt

mLIFRe21fwd	5'-CTT AAG ACA TTG GAA ATG AAC-3'
mLIFRe21rev	5'-GAT TTA GGA GAG TCT TCG TCT-3'
mLIFRe20fwd	5'-CTT TAT TTG AAG GAT TAA GG-3'
mLIFRe20rev	5'-GAT TAC CTC GCA GAC GCT C-3'
EcoLIFRi19fwd	5'-GGA ATT CTA TCG GAA GCG AGA ATG GT-3'
diagnFQPQrev	5'-CTT TGG CTT GCG GCT GGA-3'
diagnFIDVrev	5'-ACA TGG ACT GCA CAT CGA TAA-3'
diagnFRPQrev	5'-TAC ATT GGC CTG AGG TCT AAA-3'

5'-phosphorylierte Oligonukleotide für die Mutagenese:

BamKO	5'-CAC CAC AGG GTC CAC GTC CTG C-3'
XbatoXho	5'-TCG GCA GCT CTC GAG TTC ACA TC-3'
YIDVmut2	5'-ACT GCA CAT CGA TAA ACA CCA CCT GGG A-3'
FQPQmut	5'-GGC TTG CGG CTG GAA CAT GGA CTG CAC-3'
FKPQmut	5'-CAT CTG CGG CTT GAA GCC TGC CAC CAC-3'
FRPQmut	5'-GGC CTG AGG TCT AAA ACC GGC GGT CTT-3'

2.1.3 Antikörper

anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche
anti-p75 ^{NTR} Antikörper, monoklonal	Chemicon
anti-Fas Antikörper Jo2	BD-Pharmingen
anti-cytochrom C Antikörper 7H8.2C12	BD-Pharmingen (nur für denat. Protein)
anti-cytochrom C Antikörper 6H2.B6	BD-Pharmingen (nur für natives Protein)
anti-phospho-Stat3 (Y705); #9131	NEB
anti-phospho-Stat3 (S727); #9134	NEB
anti-Cre Rekombinase, polyklonal	Eurogentec-BAbCo
anti-Cre Rekombinase, monoklonal 7.23	BAbCo
anti-Cre Rekombinase, polyklonal	Novagen
anti-Cre Rekombinase, monoklonal	Chemicon

2.1.4 Genomische DNA Bibliothek

Maus Embryonale Stammzell-DNA Bibliothek (129Sv); Release I in pBeloBAC11, von Genome Systems, St.Louis, MO

2.1.5 "Kits" für die Molekularbiologie

Qiagen:	Mini-Spin Maxi Gel Extraction Kit
Promega:	Altered Sites II Mammalian Mutagenesis System
Roche:	DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)
Pharmacia:	Random priming labeling Kit
Life Technologies:	Superscript II RT-PCR Kit
Clontech:	T-Cloning Kit mit pT-Adv Advantage HF-PCR Kit
Perkin Elmer:	Big Dye Terminator

2.1.6 Bakterienstämme, Mauslinien und Zelllinien

Escherichia coli Stämme:

Mit Verwendung und wichtigem Genotyp:

DH5 α	<i>endA1, recA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), gyrA96</i>	Standardklonierungen
JM109	<i>endA1, recA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), gyrA96</i>	Klonierungen mit pALTER-MAX

ES1303	<i>mutS201::TN5</i>	Ortsspezifische Mutagenese
BB4	<i>supF</i>	λ -Phagen Wirt
Y1090	<i>supF</i>	λ -Phagen Wirt

Mauslinien:

C57BL/6, Inzuchtstamm	Charles River, Sulzfeld, und Eigenzucht; Embryodonoren; genetischer Hintergrund für Cytochrom C transgene Mäuse.
CD-1, Auszuchtstamm	Charles River, Sulzfeld, und Eigenzucht; Rezipienten für mit Stammzellen injizierte Blastozysten; genetischer Hintergrund für NFL-Cre und Stat3.
Stat3 ^{flox/flox} , Stat3 ^{wt/KO}	von S.Akira, Osaka (Takeda et al., 1997; Takeda et al., 1998), auf Agouti-Hintergrund erhalten, rückgekreuzt auf CD-1 (hellgraue Fellfarbe).
NFL-Cre #50	etabliert in der Klinischen Forschergruppe Neuroregeneration auf CD-1 Hintergrund.
AlacZR	lacZ Reportermaus für Cre-transgene Mauslinien von A.Berns, Amsterdam (Akagi et al., 1997) auf CD-1 und C57BL/6 Hintergrund.

Maus Embryonale Stammzelllinien:

E14	129/OlaHsd	von A. Smith, Centre for Genome Research, Edinburgh, UK (Hooper et al., 1987).
R1	129SvxC57BL/6	von A. Nagy, Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Kanada (Nagy et al., 1993).

2.2 Methoden der Molekularbiologie

2.2.1 PCR

Soweit nicht anders angegeben, wurden PCR Reaktionen in einem Volumen von 30 μ l angesetzt. Die Konzentrationen der Primer waren 0,3 μ M, der Desoxynukleotidtriphosphate 0,2 μ M und Taq-Polymerase wurde mit 1 U pro Ansatz eingesetzt. Die Menge an DNA variierte zwischen 10 und 300 μ g. Primer wurden alle nach folgenden Regeln abgeleitet: erste und letzte Base eine Pyrimidinbase, ein GC-Anteil von 30-45 % und eine Länge von 18-21

Basen. Fast alle PCR Reaktionen konnten daher mit einer Hybridisierungstemperatur von 55-59 °C durchgeführt werden. Die Verlängerungszeit (bei 72 °C) wurde mit 1000 Basen pro Minute für jedes Produkt angepaßt, wobei die Verlängerungszeit nie unter 30 Sekunden lag. Alle Denaturierungsschritte (94 °C) dauerten ebenfalls 30 Sekunden.

2.2.2 RNA Isolierung und Reverse Transkription

Gesamt-RNA aus Gewebe oder Zellkultur wurde mithilfe des Trizol Reagens entsprechend der Anleitung des Herstellers präpariert. In Kürze: Das Gewebe oder die Zellen wurden in 1 ml Trizol lysiert und in Glashomogenisatoren 5 Minuten von Hand homogenisiert. Entsprechend der Anleitung wurde mit Chloroform eine Phasentrennung durchgeführt und nach Zentrifugation die klare wässrige Phase abgenommen und mit Isopropanol versetzt. Als Fällunghilfe für die RNA wurden 20 µg Glykogen zugegeben. Nach der Zentrifugation wurde das RNA-Glykogenpellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt (1 OD₂₆₀ entspricht 40 µg/ml RNA).

100 ng Gesamt-RNA pro 10 µl wurden mit Superscript II Reverse Transcriptase und random hexamer Primern entsprechend der Anleitung des Herstellers revers transkribiert. Nach Verdau der RNA durch RNase H konnten die Proben direkt für die semiquantitative PCR eingesetzt werden.

2.2.3 Semiquantitative RT-PCR

Die Zyklenzahlen für alle semiquantitativen RT-PCRs wurden empirisch festgelegt, indem Plasmide mit kloniertem PCR-Produkt in Verdünnungen von 0,15 bis 150 fg pro Ansatz mitamplifiziert wurden. Die Zyklenzahl, bei der die RT-PCR Produkte Ausbeuten im Bereich des Standards gaben und dieser in diesem Bereich linear war, wurden für weitere Messungen verwendet, wobei drei Standards geeigneter Verdünnung zum Vergleich immer mit eingeschlossen waren.

PCR Produkte wurden auf 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt und mittels Southern Blot auf Nitrozellulosemembranen übertragen (siehe dort). Die PCR Produkte wurden mit radioaktiven Sonden (das gleiche PCR Produkt) hybridisiert und resultierende Autoradiogramme mit dem Fuji BAS Reader und AIDA Software ausgewertet. Die Signale waren nach wenigen Stunden Exposition jeweils schon auswertbar.

Normalisiert wurden alle Ergebnisse mit einer gleichzeitig durchgeführten Elongationsfaktor 1-spezifischen RT-PCR.

Primerkombinationen,

Hybridisierungstemperaturen,

Produktgrößen

und Zyklenzahlen für die verschiedenen getesteten Gene können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Primer 1	Primer 2	Hybridisierungstemperatur in °C	Größe in bp	Zyklenzahl
*Cre2f	Cre1r	58	265	30
*Act-f	Act-r	58	539	30
mStat3e22fwd	mStat3e23rev2	56	150	30-35
*mStat3e21fwd	mStat3e23rev2	56	241 (wt)/198 (Δ e22)	35
mEFs	mEFas	55	350	25-30
mReg2fwd	mReg2rev	53	750	23-30
bcl-2fwd	bcl-2rev	55	250	22
baxfwd	baxrev	55	95	35
bcl-wfwd	bcl-wrev	55	780	22
bcl-Lsense	bcl-xLantisense	60	336	24

*: nur qualitativer Nachweis.

2.2.4 Southern Blot/Hybridisierung einer genomischen BAC-Library

Für Southern Blots wurden 5-7 μ g genomischer DNA pro Spur auf 0,8 % Agarosegelen mit 280 Vh aufgetrennt. Die DNA wurde dann 10 Minuten mit 0,25 N HCl depuriniert, mit Wasser gewaschen und in 0,4 N NaOH über Nacht mittels Kapillartransfer auf eine Nitrocellulose Membran (Hybond N+; Amersham) übertragen. Die Membran wurde dann mit 2 x SSC neutralisiert, getrocknet und bei 120 mJ/cm² (254 nm) im Stratalinker (Stratagene) mit der Membran quervernetzt.

Als Sonden dienten in der Regel PCR Produkte (80 ng), die mit dem Random priming labeling Kit von Pharmacia unter Verwendung von ³²P- α dCTP radioaktiv markiert wurden.

Southern Blots oder die Filter der genomischen Bibliothek wurden in Church Puffer (7 % SDS, 0,5 M Na-Phosphatpuffer; pH 7,4) bei 65 °C eine Stunde vorhybridisiert. Dann wurde die Sonde denaturiert in den Hybridisierungspuffer gegeben und über Nacht hybridisiert. Der Hybridisierungspuffer wurde dann abgegossen und durch 2 x SSC 0,1 % SDS für 5 Minuten ersetzt. Dann wurde mit der gleichen Lösung 40 Minuten bei 55 °C gewaschen und danach nochmals ebensolange mit 0,2 x SSC, 0,1 % SDS. Die Membranen wurden dann in Saran Folie eingeschlagen und die Autoradiogramme entweder mit Röntgenfilm (Kodak X-Omat) oder den Phosphorimager Image Plates aufgenommen.

2.2.5 Western Blot

Gewebe wurden frisch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert. Extrakte wurden durch Zerstoßen unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff und anschließendem Lösen in RIPA Puffer hergestellt. Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford-Methode (BioRad) gemessen. SDS-Gelelektrophorese und Detektion wurden nach den Angaben der Hersteller der Antikörper durchgeführt.

2.2.6 Klonierungen

Restriktionsansätze:

Analytische Ansätze enthielten typischerweise 100-300 ng Plasmid in 10 µl. Weiterhin enthielt der Ansatz 1 µl des entsprechenden Enzympuffers (10x) und 1-5 U Restriktionsenzym. Diese Ansätze wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, mit Ladepuffer versetzt und mittels Agarosegelen analysiert.

Präparative Ansätze enthielten bis zu 3 µg Plasmid in 30 µl, Restriktionspuffer und 30 U Restriktionsenzym. Die Ansätze wurden über eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Oftmals schloß sich die Elution eines DNA Fragmentes aus einem Agarosegel an. Hierzu wurde das Qiagen Gelextraction Kit verwendet und der Anleitung des Herstellers gefolgt. Sollte nur das Restriktionsenzym entfernt werden, so wurde die Probe direkt in 3 Volumen Puffer PB auf die Säule aufgetragen, mit PE gewaschen und in EB (10 mM Tris pH 8,5) eluiert.

Die DNA Konzentration wurde jeweils photometrisch bei 260 nm bestimmt (1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml DNA).

Dephosphorylierung mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP):

Wurden Plasmide nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert, so wurden etwa 100 ng gereinigtes Plasmid in 10 µl 1x SAP Puffer mit Boehringer SAP 60 Minuten bei 37 °C dephosphoryliert. SAP kann durch Erhitzen auf 68 °C für 15 Minuten hitzeinaktiviert werden.

Ligationsansätze:

Ligationen wurden mit 20-100 ng Vektor DNA und einem dreifachen molaren Überschuß zu klonierendem Fragment in 10-15 µl Ansätzen mit T4-DNA Ligase bei 15 °C über Nacht ligiert. 2-5 µl der Ligationsansätze wurden dann mittels 45 Sekunden Hitzeschock in JM109 *E. coli* Bakterien transformiert.

PCR-Klonierungen:

PCR Produkte wurden mittels A/T-Cloning in pT-Adv (Clontech) gemäß der Anleitung des Herstellers kloniert.

2.2.7 Plasmidpräparationen

Plasmide aus *E. coli* wurden mit Kits der Firma Qiagen präpariert. Entsprechend der Kulturgrößen wurden das Mini Spin Kit (maximal 10 µg Plasmid aus 1,5 ml Kultur) oder das Maxi Kit (bis zur 600 µg aus 100 ml Kultur) verwendet.

BAC DNA wurde gemäß der Angaben des Herstellers (Genome Systems) durch Phenol:Chloroform Extraktion und Ethanolpräzipitation wie bei λ-Phagen beschrieben extrahiert. Die DNA wurde durch "Spot-Dialyse" auf einem schwimmenden Millipore Filter (0,2 µm; Nitrozellulose) entsalzt.

2.2.8 λ-Phagen Infektion und Präparation

Bei allen Schritten mit λ-Phagen wurden Protokolle aus Sambrook et al. (1989) möglichst genau eingehalten. Von Dr Austin Smith, Centre for Genome Research, Edinburgh, übernahmen wir einen λ-Klon (λ-M2 1,3 x 10⁹ pfu/ml) mit einem Fragment des murinen LIFR Gens (Chambers et al., 1998), das für den Bau von Vektoren zur Veränderung des LIFR Gens in der Maus verwendet werden sollte.

Propagation von λ-M2:

5 ml Vorkulturen mit BB4 und Y1090 *E.coli* Bakterien wurden in LB in der Gegenwart von 10 mM MgSO₄ und 10 mM Maltose über Nacht vorbereitet. Der Rezeptor des λ-Phagen, *lamB*, ist ein Maltosetransporter, der nur in Gegenwart von Maltose exprimiert wird und zur Phagenbindung Mg²⁺ benötigt.

Plattenlysate wurden hergestellt, indem 200 µl Bakterien (OD₆₀₀ von 0,5) mit 2 µl einer 1:1000 Verdünnung Phagen (1000 pfu) infiziert wurden. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und ohne Schütteln wurden die Bakterien in 5 ml Top Agar (mit Maltose und Magnesium) bei 42 °C plattiert. Am Tage danach wurden Plattenlysate und Plaquelysate (Sambrook et al 1989; Band I2.63 und 2.65) zur Lagerung hergestellt, die jedoch nicht wieder gebraucht wurden.

Präparation von λ-Phagen

Mit den Vorkulturen wurden 250 ml Kulturen (BB4 und Y1090) in LB mit Magnesium und Maltose angeimpft und das Wachstum der Bakterien spektrophotometrisch verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,5 wurden die 250 ml Kulturen mit jeweils 200 µl Phagen infiziert. Nach 30 Stunden Kultur wurden die lysierten Bakterienkulturen mit 10 ml Chloroform für 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Dann wurden 25 µl DNase I (10U/µl) und 25 µl RNase I (10mg/ml) zugegeben und weitere 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Nach Zugabe von NaCl für eine Endkonzentration von 1 M, wurden die Phagenlösungen für eine Stunde auf Eis

gestellt. Die Lösungen wurden danach durch Zentrifugation bei 10.000 U/min (T19-Beckmann) bei 4 °C für 12 Minuten geklärt und die Überstände mit PEG8000 (10 % Endkonzentration) im Kühlraum über Nacht gefällt. Die Phagensuspension mit PEG8000 wurde nochmals bei 10.000 U/min im T19 Rotor bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Phagenpellet wurde in 2 ml SM Puffer gelöst und in 4 Aliquots aufgeteilt.

Präparation von DNA aus λ -Phagen

Die 500 μ l Aliquots wurden mit jeweils 10 μ l Proteinase K (10mg/ml) und 25 μ l SDS (10%) bei 65 °C für eine Stunde inkubiert, um die Phagenhülle abzubauen. Nach zweifacher Phenol:Chloroform Extraktion wurde die Phagen DNA mit 0,3 M Natriumacetat pH 4,5 und 2 Volumen Ethanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 200 μ l TE aufgenommen und enthielt 5-6 μ g/ μ l DNA.

2.2.9 Extraktion von genomischer DNA aus Gewebe

Mausschwanzspitzen oder andere Gewebestücke wurden in 500 μ l Lysispuffer (10 mM Tris / HCl pH 7,5; 0,1 M EDTA; 0,15 M NaCl; 0,5 % SDS) mit 15 μ l Proteinase K (10 mg / ml) über Nacht bei 55 °C im Thermoschüttler lysiert. Das Lysat wurde mit 430 μ l SDS (5 %) und 170 μ l NaCl (3M) vermischt, bevor 750 μ l Chloroform zugegeben wurden. Nach 30 Sekunden Schütteln wurden die Suspensionen für 15 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit (14.000 U/min) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und die Oberphase nochmals zweimal mit Chloroform extrahiert. Die genomische DNA wurde aus dem Überstand mit zwei Volumina Ethanol gefällt und die DNA Flocke direkt, das heißt ohne Zentrifugation, in 70 % Ethanol überführt und gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das DNA Pellet an der Luft getrocknet und nach 5 Minuten in 10 mM Tris pH 8,5 gelöst.

2.2.10 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese des murinen LIFR Gens und der cDNA wurde genau der Beschreibung des Promega Altered Sites II Kits folgend durchgeführt. Dazu wurde die cDNA des murinen LIFR aus pBluescript LIFR (von Ian Chambers, Centre for Genome Research, Edinburgh) mit EcoRI und NotI in pALTER MAX in Expressionsrichtung inkloniert. Entsprechend wurde das genomische 3kb LIFR Fragment (enthält Intron 19, Exon 20, Intron 20 und einen Teil von Exon21 bis zur BamHI Stelle) mit EcoRI und BamHI und das 4,5 kb BamHI Fragment (enthält Exon 21 ab der BamHI Schnittstelle und den 3'UTR) in gleicher Richtung in pALTER MAX inkloniert. Da die Orientierungen beider Fragmente gleich

waren, konnten die gleichen Oligonukleotide für die Mutagenese der cDNA und der genomischen DNA verwendet werden.

Die Mutagenese mit Oligonukleotiden wurde gewählt, weil sowohl cDNA als auch ein genomisches Fragment mutiert werden sollten, was hierdurch parallel durchgeführt werden konnte. Weiterhin konnten auf diese Weise mehrere Mutationen simultan eingeführt werden.

2.2.11 DNA Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Zur Sequenzierung von Plasmiden wurden etwa 300-600 ng DNA, 10 pmol Primer und 2 µl Big-Dye Mix in 20 µl Volumen eingesetzt. Zur Sequenzierung von PCR Produkten wurden 10 ng/100 bp DNA, 10 pmol Primer und 2 µl Big-Dye Mix in 20 µl eingesetzt. Das Programm der PCR Maschine lief folgendermaßen ab: 3 Min. 96 °C; 30x (15 Sek. 96 °C; 15 Sek. 58 °C; 4 Min. 60 °C); 5 Min 60 °C; Halten bei 15 °C.

Die PCR Produkte wurden über Sephadexsäulchen gereinigt und auf einem Applied Biosystems 373 Sequencer analysiert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Embryonale Stammzellen

2.3.1.1 Kultur von ES-Zellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden nach den Standardprotokollen des Labors kultiviert.

2.3.1.2 Ernte von ES-Zellen für das Screening mit PCR

Sobald die Zellen in 96 well Platten fast konfluent waren, wurden sie mit Trypsin/EDTA abgelöst und in 200 µl Medium vereinzelt. 100 µl der Zellsuspension wurden in einer 96 well Platte in Gefriermedium weggefroren. Für das Cytochrom C Projekt wurde die andere Hälfte der Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 30 µl Wasser suspendiert und für 5-10 Minuten gekocht. Danach wurden 3 µl einer 2mg/ml Proteinase K Lösung dazugegeben und die Zellen bei 50 °C im Heizblock über Nacht inkubiert. Die Proteinase K wurde durch Inkubation für 15 Minuten bei 95 °C inaktiviert und das DNA Lysat bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren.

Für das LIFR Projekt wurden die vereinzelt ES-Zellen mit der Mehrkanalpipette in 96 well PCR Platten (PeqLab, Erlangen) überführt und bei 3000 rpm im Schwenkrotor abzentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben in diesen PCR Gefäßen durchgeführt.

2.3.1.3 Ernte von ES-Zellen für die Isolierung von genomischer DNA

ES-Zellklone, die mit PCR positiv getestet waren, wurden aufgetaut, vermehrt und dann in mit Gelatine beschichteten 6 well Platten kultiviert. Waren die Zellen fast konfluent, wurde das Medium abgenommen, die Zellen in PBS zweimal gewaschen und mit 500 µl Lysispuffer lysiert.

2.3.2 Kultur von embryonalen Motoneuronen der Maus

Der Tag nach der Paarung (Vaginalpfropf) wurde als Tag 1 der Embryonalentwicklung festgelegt. Embryonale Motoneurone wurden entweder an Embryonaltag 12 (E12) oder E14 präpariert. Dazu wurde die trächtige Maus mit Äther betäubt und durch Genickbruch getötet. Das Muttertier wurde äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Bauchdecke geöffnet. Die beiden Hörner der Gebärmutter wurden am Stück aus der Mutter entnommen und die Fruchtblasen präpariert. Die Embryonen wurden einzeln aus der Fruchtblase genommen, der Schwanz oder Kopf zur Analyse des Genotyps abgetrennt und in Lysispuffer zur DNA Extraktion gesammelt. Danach wurde das Rückenmark mit zwei spitzen Pinzetten am Stück entnommen und in HBSS überführt. Nachdem die Glia limitans abgezogen war, wurde das Rückenmark in 180 µl HBSS auf Eis gestellt, bis alle Embryonen präpariert waren. Nach Zugabe von 20 µl 1 % Trypsin wurden die Gewebe 15 Minuten bei 37 °C verdaut und mit 20 µl 0,1 % Trypsininhibitor abgestoppt. Die Zellen wurden sechsmal durch eine gelbe Pipettenspitze trituriert und in 800 µl Neurobasalmedium in 24 well Platten suspendiert, die vorher mit 10 ng/ml anti-p75^{NTR} Antikörper (in 10 mM Tris pH 8,0) für 2 h bei Raumtemperatur beschichtet worden waren. Nicht gebundene Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit 500 µl warmem HBSS entfernt. Die gebundenen Motoneurone wurden mit 800 µl Depolarisationslösung (30 mM KCl; 0,8 % NaCl) abgelöst und mit 2 ml Vollmedium (Neurobasalmedium, B27 Supplement, Glutamax, 10 % Pferdeserum) suspendiert und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 200 µl abgenommen, die Zellen suspendiert und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Ungefähr 3000 Motoneurone wurden pro Vertiefung auf Nunc 4 well Platten in 100 µl Vollmedium plattiert, die vorher mit Poly-D,L-Ornithin (0,5 mg/ml in 0,15 M Boratpuffer pH 8,35) und danach mit Laminin (2,5 µg/ml in HBSS) beschichtet worden waren. Nach etwa einer Stunde hatten sich die Zellen abgesetzt und neurotrophe Faktoren wurden zugegeben. Nach 2-3 Stunden wurden adhärende, im Phasenkontrast dunkle Zellen mit hellem Rand in 3-5 Feldern als Ausgangswert gezählt. Das Medium wurde am Tag nach der Kultur und dann an jedem zweiten Tag ersetzt.

2.4 Histologie

2.4.1 Nissl-Färbung

Gewebe wurden nach pericardialer Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 über Nacht bei 4 °C nachfixiert. Nach Entwässern in Alkohol und Entfetten in Chloroform wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und am Mikrotom mit einer Dicke von 7 bzw. 12 µm (Hirnstamm bzw. Rückenmark) geschnitten. Die Schnitte wurden im erwärmten Wasserbad auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und wie folgt gefärbt. Die Schnitte wurden jeweils für 5 Minuten in die folgenden Lösungen getaucht: Xylen, Xylen, 100 % Ethanol, 100 % Ethanol, 95 % Ethanol und 70 % Ethanol. Danach wurden die Schnitte kurz in destilliertes Wasser getaucht und in 0,5 % Cresylviolett für 15-30 Minuten gefärbt. Die Färbelösung wird (für 500 ml) mit 2,5 g Cresylecht Violett, 300 ml Wasser, 30 ml 1 M Natriumacetat und 170 ml 1 M Essigsäure angesetzt (eine Woche rühren, dann filtern). Danach wurden die Schnitte in Wasser 3-5 Minuten differenziert und über eine aufsteigende Alkoholreihe (siehe oben) dehydriert. Die Schnitte wurden dann zum Klären in Xylen gestellt und eingedeckelt.

2.4.2 Auszählen von Motoneuronen in histologischen Schnitten

Motoneurone wurden in jedem fünften bzw. zehnten Schnitt (Hirnstamm bzw. Rückenmark) unter 10x Vergrößerung gezählt. Dabei wurden nur Zellen mit folgender Morphologie berücksichtigt: starke Färbung des Zytoplasmas, großer runder Zellkern und deutlicher Nukleolus. Da Motoneuronen eine größere Ausdehnung als die Schnittdicke besitzen, mußte die erhaltene Zahl korrigiert werden, um Doppelzählungen zu vermeiden (Sendtner et al., 1996). Quantitative Zählungen wurden nur im Fazialiskern im Hirnstamm und im lumbalen Rückenmark durchgeführt.

2.4.3 In situ β -Galactosidase-Färbung

Tiere für die histologische Detektion von β -Galactosidase wurden mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 transcardial perfundiert. Organe wurden entnommen und für weitere 3 Stunden im selben Fixativ nachfixiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Organe in 30 % Rohrzucker in PBS überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Gewebe für Schnitte wurde in TissueTek eingebettet und mit einer Dicke von 20 µm bei -20 °C geschnitten. Ganze Organe oder Gewebeschnitte wurden in X-Gal Lösung (0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4; 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(II); 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III); 2 mM $MgCl_2$; 0,1 % 5-Bromo-4-chloro-3-indolylgalac-

tosid) über Nacht bei 30 °C inkubiert. Gewebeschnitte wurden mit 1 % Neutralrot in 4 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5 gegengefärbt. In anderen Experimenten wurden ganze Gehirne nach Perfusion (2 % PFA) mit X-Gal gefärbt, nachfixiert in 4 % PFA und das Gewebe am Vibratom ohne Einbettung in 50-100 µm Schnittdicke geschnitten. Diese Schnitte konnten direkt auf gelatinierte Objektträger aufgezogen werden und wurden mit Aquatex eingedeckelt.

2.4.4 In situ Hybridisierung

Frisch isolierte Gehirne von adulten Mäusen wurden in TissueTek eingebettet und in Stickstoff-gekühltem Isobutan eingefroren und bei -80 °C gelagert. Serielle Gefrierschnitte von 10 µm Dicke wurden gesammelt und jeder zehnte Schnitt zur Orientierung mit Cresylviolett gefärbt. Gefrorene Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 15 Minuten an der Luft getrocknet. Nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen, mit 0,4 % Triton in PBS permeabilisiert und nach einem weiteren Waschschrift in PBS und Wasser in Triethanolaminpuffer (TEA; 1,8 g/100 ml; pH 8,0) äquilibriert. Durch Zugabe von 250 µl Essigsäureanhydrid/100 ml TEA wurden die Schnitte acetyliert. Es folgten zwei Waschschriffe in PBS und dann in Wasser, bis die Schnitte über eine Ethanolreihe (50 %, dann 70 %) dehydriert oder gleich weiterverwendet wurden.

Die Hybridisierung wurde mit 100 ng Sonde pro ml in 100 µl Hybridisierungspuffer pro Schnitt bei 60 °C über Nacht durchgeführt. Der Hybridisierungspuffer hatte folgende Zusammensetzung: 600 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,05 % tRNA aus Hefe; 1x Denhardt's Lösung; 10 % Dextransulfat; 100 µg/ml Heringsspermien DNA. Die Sonden wurde mit dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) von Roche nach der mitgelieferten Anleitung markiert.

Ausgangsplasmide für Sonden waren: **Cre** open reading frame in pBluescript II (antisense: T3-Pol; mit NotI linearisieren; sense: T7-Pol; mit XhoI linearisieren); 336 bp Maus **bcl-xl** Fragment in pT-Adv (PCR-Fragment-siehe RT-PCR; antisense: T7-Pol; mit HindIII linearisieren); Ratte **reg-2** open reading frame in pGEM-T (von Chris Henderson, Marseille; antisense: T7-Pol; mit HindIII linearisieren; sense: SP6-Pol; mit BglIII linearisieren).

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte zuerst in 2x SSC (20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0), dann in 1x SSC gewaschen, dann 60 Minuten mit RNase A Puffer (20 mg/L RNase A; 0,1 M Tris/HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA) behandelt. Nach weiteren Waschschriffen in 1x SSC und 0,2x SSC bei Raumtemperatur, schloß sich ein Waschschrift in 0,2x SSC bei 60 °C für eine Stunde an. Die Schnitte wurden dann jeweils bei Raumtempera-

tur nochmal mit 0,2x SSC und Wasser gewaschen und dann entweder zur Lagerung über ein Ethanolreihe entwässert oder direkt zwei Stunden mit Blockierungslösung (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 % FCS) bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C (oder 4 Stunden bei Raumtemperatur) mit einer 1:200 Verdünnung des α -DIG Fab Fragmentes (Alkalische Phosphatase Konjugat) in Blockierungslösung inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 100 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl und dann 100 mM Tris/HCl pH 9,4; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂. Die Schnitte wurden dann mit DAKO-AP Substrat (BCIP/NBT) mit 0,1 mM Levamisol überschichtet und die Detektionsreaktion für 2 Stunden (bcl-xl) oder 3 Stunden (Cre) oder 4 Stunden (reg-2) durchgeführt. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt und die Schnitte mit Aquatex eingedeckelt.

2.4.5 Immunhistochemie

Das Expressionsmuster der Cre Rekombinase in NFL-Cre Mäusen wurde auch durch immunhistochemische Färbung charakterisiert. Versuche mit allen angegebenen Antikörpern gegen Cre in Gefrierschnitten waren erfolglos. Deshalb wurden 30-50 μ m Vibratomschnitte von Gehirnen von Tieren angefertigt, die mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 perikardial perfundiert worden waren. Die Schnitte wurden in PBS bei 4 °C aufbewahrt. Blockiert wurde in 10 % BSA in PBS mit 0,5 % Triton X-100 für eine bis zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Primärantikörper wurden in PBS / 1 % BSA / 0,5 % Triton verdünnt und mit den Schnitten über Nacht unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS / 1 % BSA / 0,5 % Triton wurden die Schnitte mit Farbstoffkonjugiertem Sekundärantikörper in der gleichen Lösung für zwei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und mit DABCO eingedeckelt. Die Ränder wurden mit handelsüblichem Nagellack abgedichtet und die Schnitte bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.5 Verhaltenstests

2.5.1 Rotarod

Zum Rotarod Test fand ein Rotarod Modell 7650 für Mäuse der Firma Ugo Basile Verwendung. Getestet wurde im Beschleunigungsmodus bei größter Übersetzung (4 Umdrehungen/Min. bis 40 Umdrehungen/Min. in 5 Minuten). Jede Maus wurde pro Testtag fünfmal getestet, wobei zwischen den einzelnen Versuchen 3-5 Minuten Zeit zur Erholung der Tiere blieben. Ein Test wurde entweder nach 200 Sekunden abgebrochen oder sobald die Maus vom Rotarod fiel. Die Retentionszeiten (in Sekunden) auf dem Rotarod wurden

gemittelt.

2.5.2 Motorperformance-Test

Ein Testschema zur Quantifizierung der motorischen Fähigkeiten von Mäusen wurde von Frau Dr.med.vet. Holtmann in unserem Labor etabliert (Giess et al., 2002), das sich an klinischen Tests für Patienten mit Motoneuronerkrankungen orientiert. Mäuse mit konditionaler Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3 in Motoneuronen wurden im Alter von 6, 9 und 12 Monaten getestet.

2.6 Statistik

2.6.1 Software

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von Graph Pad Prism durchgeführt.

2.6.2 Student's t-Test

Dieser Test wurde zur Bestimmung der Signifikanz von parametrischen Daten verwendet, wenn nur zwei Gruppen verglichen wurden (z.B. Motoneuronanzahl nach/ohne Läsion). Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine gepaarten Beobachtungen/Messungen vorgenommen, weshalb immer nur der nicht-gepaarte t-Test Verwendung fand. Die Nullhypothese wurde auf der 5 %-Basis ($p < 0.05$) verworfen.

2.6.3 Mann-Whitney U-Test

Dieser Test wurde zur Bestimmung der Signifikanz von nichtparametrischen Daten verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit traf dies nur auf die Ergebnisse des Motorperformance-Tests zu. Die Nullhypothese wurde auf der 5 %-Basis ($p < 0.05$) verworfen.

2.6.4 ANOVA

Wenn mehrere Gruppen verglichen werden sollten, wurde eine einfache Analyse der Varianz (Einweg-ANOVA) durchgeführt (z.B. Motoneuronanzahl nach Läsion und Behandlung mit verschiedenen neurotrophen Faktoren). Einzelne Gruppen wurden mit Bonferronis post-hoc Test miteinander verglichen. Die Nullhypothese wurde auf der 5 %-Basis ($p < 0.05$) verworfen.

3. Ergebnisse

3.1 Inaktivierung des somatischen Cytochrom C Gens der Maus

3.1.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Cytochrom C wurde als ein Interaktionspartner im Apoptosom beschrieben. Ziel dieses Projektes war es, die Rolle von Cytochrom C bei der Apoptose von Nervenzellen in vivo durch genetische Inaktivierung in der Maus zu untersuchen. Die homozygote Deletion des Cytochrom C Gens führt jedoch zu einem sehr frühen Entwicklungsdefekt: Schon am 8. Embryonaltag findet man nur noch Embryonen ohne erkennbare Körperachse. Im weiteren wurden daher heterozygote Tiere untersucht, die in bestimmten Geweben, wie Gehirn und Rückenmark, eine Reduktion der Menge von Cytochrom C aufweisen. Trotzdem konnten keine Unterschiede zwischen Tieren mit einem oder zwei Cytochrom C Genen in Bezug auf den Zelltod von Motoneuronen in vivo und in vitro gefunden werden. Bei der Analyse der Apoptose von Thymozyten zeigte sich ein Trend, der eine kleine, aber reproduzierbare Verzögerung einer späten Zelltodphase nach induzierter Apoptose nahelegt. Erste Experimente deuten außerdem auf einen Effekt der Cytochrom C Gendosis auf den Verlauf einer Experimentellen Autoimmunencephalitis (EAE) hin.

3.1.2 Genetische Inaktivierung des Cytochrom C Gens

3.1.2.1 Klonierung des Cytochrom C Gens der Maus

Zur genetischen Inaktivierung mußte ein genomischer Klon des Cytochrom C Gens der Maus (MC1) kloniert werden. Erschwert wurde dies durch die Anwesenheit von mindestens 3 bekannten Pseudogenen (MC2-4). In einem ersten Versuch mit bereits im Labor vorhandenen Sonden und damit ermittelten Klonen der genomischen BAC Bibliothek konnte ein Cytochrom C Gen kloniert werden, das mit PCR Primern, die spezifisch für MC1 aber nicht für MC2-4 sind, nachgewiesen werden konnte. Sogar eine diagnostische HpaI Schnittstelle im Intron schien darin vorhanden zu sein. Beim Sequenzieren stellte sich allerdings heraus, daß es sich um ein bisher unbekanntes viertes Pseudogen von Cytochrom C handelte und die "diagnostische" HpaI Schnittstelle durch eine Mutation im Leserahmen erzeugt wurde. Im weiteren zeigte sich, daß keiner der 18 verfügbaren BAC Klone MC1 enthält.

Alle bekannten Cytochrom C Pseudogene sind prozessierte Pseudogene. Es lag also nahe, den zweiten Versuch zur Klonierung von MC1 mit einer promotorspezifischen Sonde zu starten. Dazu wurden die Primersequenzen CYCy1 und CYC-x1 aus einer Arbeit über den Cytochrom C Promotor der Ratte verwendet (Hake und Hecht, 1993). Das entsprechende 500 bp PCR Produkt war spezifisch und bei der Sequenzierung zeigte sich eine hohe Homologie mit der bekannten Rattensequenz (84-92 %, BLAST). Um die Spezifität sicherzustellen, wurde diesmal zuerst mit dieser Sonde ein genomischer Southern Blot von Maus DNA hybridisiert. Sowohl mit EcoRI als auch mit BamHI verdaute DNA wurde jeweils nur ein einziges Fragment von 3 kb bzw. 4,5 kb detektiert. Mit diesem PCR Fragment als Sonde wurde die genomische BAC Bibliothek nochmals hybridisiert. Acht Kandidatenklone wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern CYCy1 und CYC-x1 getestet. Nur zwei Klone, 26i01 und 26j01, ergaben das erwartete Produkt. Dieses Resultat wurde mit einer anderen Primerkombination, cytcFP2 und cytcRP4, verifiziert, die mit genomischer DNA nur ein Produkt von 650 bp ergab und negativ für alle zuerst getesteten BAC Klone war.

Nachdem genomische DNA aus Maxi-Präparationen der beiden BAC Klone hergestellt worden war, wurde diese einem Restriktionsverdau mit mehreren Restriktionsenzymen bzw. Kombinationen von Enzymen unterworfen und nach Southern Blot mit der Promotorsonde hybridisiert (Abb 3.1.1).

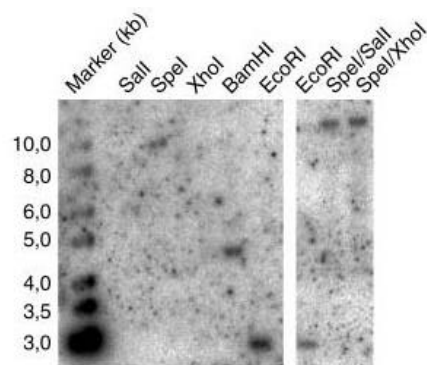


Abbildung 3.1.1: Southern Blot/Restriktionsverdau des BAC Klons 26i01. Genomische Fragmente des BAC Klons, die mit der Cytochrom C-Promotorsonde hybridisieren, haben folgende Größen: SpeI (~10 kb), BamHI (4,5 kb), EcoRI (3 kb), SpeI/Sall (~11 kb), Spe/XhoI (~11 kb). Sall und XhoI Fragmente sind größer (nicht gezeigt). Als Marker wurde die 1 kb-Leiter von Fermentas verwendet, deren Fragmente > 2,5 kb alle mit der Cytochrom C Promotorsonde hybridisieren.

Diese beiden Klone enthielten offensichtlich MC1, da sie die beiden gleichen 3 kb (EcoRI) und 4,5 kb (BamHI) Fragmente ergaben wie genomische DNA. Die anderen Enzyme wurden auf der Grundlage ausgewählt, daß die durch sie generierten DNA-Enden mit XhoI- und

XbaI-Enden kompatibel sind, Enzyme, deren Schnittstellen im ausgewählten Targetingvektor pPNT in der MCS beiderseits der neo-Kassette liegen (Abb. 3.1.2). Aus Abb. 3.1.1 ist ersichtlich, daß das SpeI bzw. die SpeI/SalI und SpeI/XhoI Fragmente die für die Subklonierung des Cytochrom C Gens brauchbare Größe von etwa 10 kb aufweisen. Es wurde also versucht, diese Fragmente in pBS II zu klonieren. Dazu wurden die Kolonien von den erhaltenen Transformanten auf Replikaplatten ausgestrichen und wieder per Kolonie-PCR mit den Primern CYCy1 und CYC-x1 gescreent. Zwei Klone (2S1, 3S1) ergaben das gesuchte PCR Produkt und zeigten nach SpeI Verdau ihrer DNA eine 10 kb Bande. Als nächstes wurde versucht, eine Restriktionskarte des Subklones 2S1 anzufertigen. Dazu wurde eine extensive Restriktionsanalyse mit nachfolgendem Southern Blot mit der Promotorsonde durchgeführt.

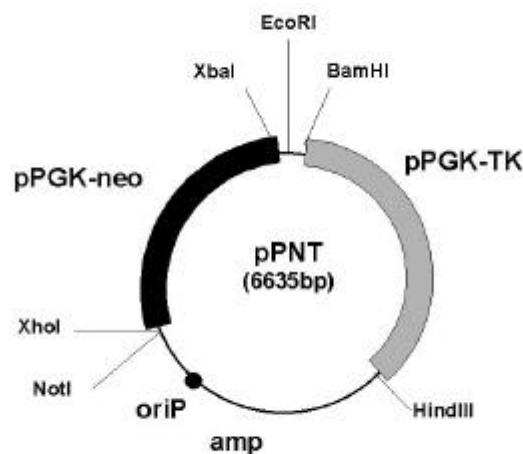


Abbildung 3.1.2: Plasmidkarte des Targetingvektors pPNT (Tybulewicz et al., 1991). Beide Selektionsgene werden unter der Kontrolle eines murinen Phosphoglyceratkinase-Promotors (pPGK) exprimiert und enthalten ein eigenes Polyadenylierungssignal. Zur Propagation in Bakterien enthält das Plasmid einen bakteriellen Replikationsstartpunkt (ori) und ein β -Lactamasegen (amp).

3.1.2.2 Konstruktion des Targeting-Vektors pPNTcycs

Leider konnte ich keine Möglichkeit erkennen, wie man, wie ursprünglich geplant, den ganzen Subklon in pPNT (ohne neo-Kassette) hätte klonieren können, um danach das Cytochrom C Gen mit der neo-Kassette zu ersetzen. Deshalb wurde die Strategie wie folgt geändert: Das 4,5 kb BamHI Fragment mit einem Teil des Promotors sollte als langer Arm vor die neo-Kassette kloniert werden. Eine Sequenzierung des 5' davon liegenden 900 bp BamHI Fragmentes hatte nämlich ergeben, daß es repetitive DNA enthält und deshalb für den

Vektor ungeeignet war. Der kurze Arm sollte dann mittels PCR kloniert werden, da 2S1 von der Gegenseite inzwischen ebenfalls sequenziert worden war. Dabei stellte sich heraus, daß MC1 auch auf der 3' Seite von repetitiver DNA flankiert war. Deshalb wurde eine nicht-repetitive Sequenz in geeignetem Abstand für den 3' Primer gesucht. Die verwendeten PCR Primer für den kurzen Arm wurden mit passenden Schnittstellen für die Klonierung in pPNT ausgestattet und hießen Specyct3fwd und Bamcyt3rev. Das resultierende PCR Fragment (aus 2S1) war etwa 1,6 kb lang (erschien im Gel aber wie 2,2 kb) und wurde in pT-Adv direkt kloniert und sequenziert. Das 1,6 kb BamHI/SpeI Fragment wurde dann in BamHI/XbaI geschnittenen pPNT kloniert. Zwei positive Klone, pPNT-E3 und pPNT-F6, wurden aus den per Kolonie-PCR getesteten Klonen für den letzten Klonierungsschritt ausgewählt. Dazu mußte jedoch vorher das 4,5 kb BamHI Fragment in pBSKS(+) subkloniert werden. Die richtige Orientierung relativ zur NotI Schnittstelle des 4,5 kb BamHI Subklons (B7) wurde durch Sequenzierung festgestellt. Der Targeting-Vektor pPNT-cycc wurde dann durch Einbau des 4,5 kb NotI/XhoI Fragmentes aus B7 in pPNT-E3 fertiggestellt (Abb. 3.1.3). Der Vektor enthielt schließlich 6,1 kb homologe Sequenz.

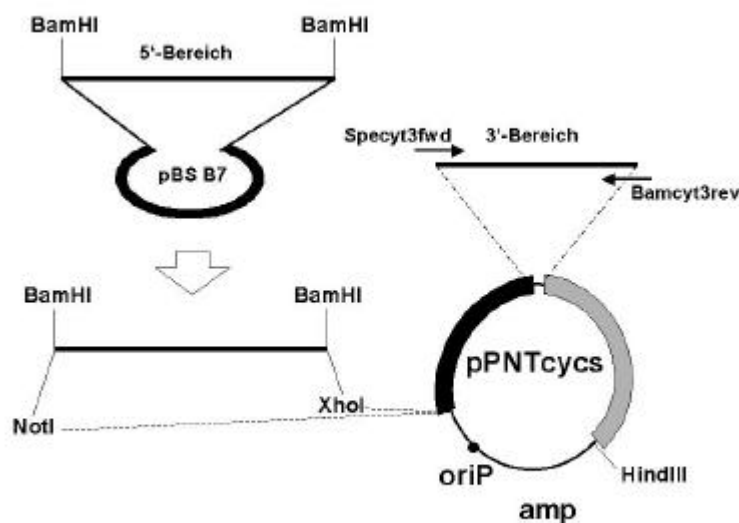


Abbildung 3.1.3: Klonierungsstrategie zur Herstellung des Targetingvektors pPNTcycc zur Entfernung des somatischen Cytochrom C Gens der Maus. Der kurze Arm wurde als PCR Fragment aus dem 3'-Bereich des Gens in XbaI/BamHI-geschnittenen pPNT einkloniert. Der lange Arm, war als 4,5 kb BamHI kloniert (pBS B7) und konnte mit XhoI/NotI aus pBS ausgeschnitten und in pPNT-E3 umklontiert werden.

3.1.2.3 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen und Etablierung der Linie

Der Vektor pPNT-cyca wurde mit NotI linearisiert und in E14 ES-Zellen elektroporiert. Nach Selektion mit G418 und Gancyclovir wurden etwa 300 Klone gepickt. Die Primer 3'-neo und diagn3rev wurden zum Screening der ES-Zellen verwendet und sollten die Integration beim kurzen Arm detektieren. Erste Versuche für das Screening per PCR der ES-Zellklone blieben allerdings erfolglos. Deshalb wurde ein Konstrukt als Positivkontrolle kloniert, um die PCR Bedingungen für das Screening optimieren zu können. Dazu wurde ein PCR Fragment mit Speyct3fwd und Bamdiagn3rev (1,8 kb) direkt in pT-Adv kloniert und mit BamHI/SpeI Verdau in BamHI/XbaI geschnittenen pPNT kloniert. Dieser Vektor hieß pPNTcyca^{pos}. Zur Optimierung der PCR Bedingungen wurde pPNTcyca^{pos} 10⁶-fach im Vergleich zur genomischen KomplettdNA verdünnt. PCR mit 3'-neo und diagn3rev bei 54 °C Annealingtemperatur ergab das erwartete Produkt. Allerdings litt das Screening der ES-Zellen immer unter unspezifischen Nebenreaktionen ("Schmier"). Um ein eventuell vorhandenes spezifisches PCR Produkt dennoch sichtbar zu machen, wurden die Gele nach Southern Blot mit dem kurzen Arm des Konstrukts als Sonde hybridisiert. Erst nach der vierten Elektroporation wurden Klone identifiziert, in denen das Cytochrom C Gen durch homologe Rekombination auf einem Chromosom inaktiviert war. In diesem Screening wurden Pools von je 4 Klonen (5 µl Lysat pro Klon) in 50 µl PCR Ansätzen mit den Primern 3'-neo und diagn3rev_l analysiert. Die Annealingtemperatur betrug 59 °C, die Verlängerungszeit 2:20 Minuten und es wurden 40 Zyklen nach Pseudo-Hotstart durchlaufen. Gründe, weshalb es schließlich doch möglich war, positive Klone zu finden und den "Schmier" zu unterdrücken, könnten sein: Das Reaktionsvolumen wurde von 20 auf 50 µl vergrößert, der Primer diagn3rev wurde verlängert zu diagn3rev_l; eventuell war vorher auch die Inaktivierung der Proteinase K nicht vollständig gewesen. Die positiven Pools wurden aufgelöst und einzelne Klone analysiert (Abb. 3.1.4A).

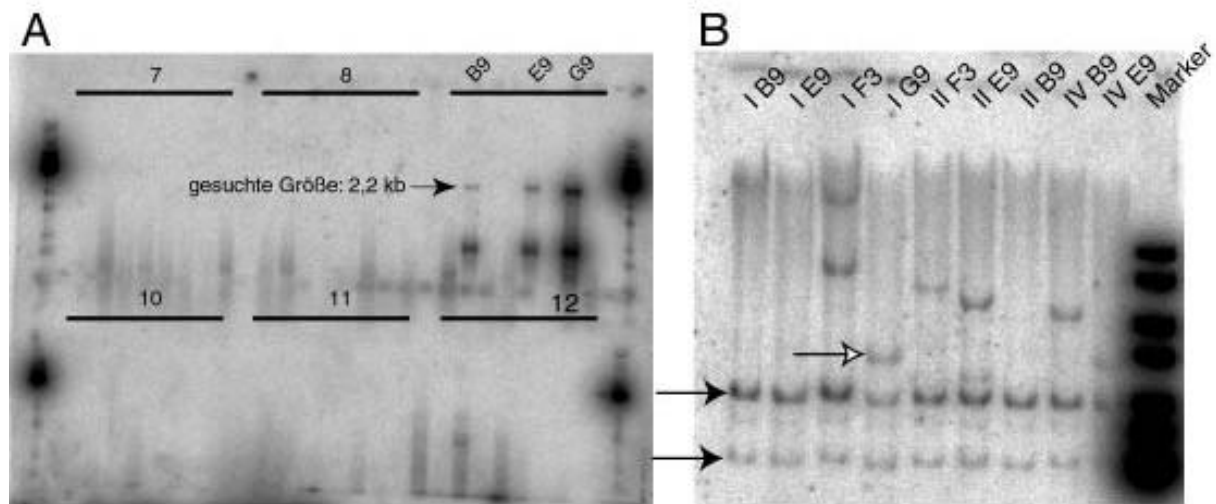


Abbildung 3.1.4: Screening von G418-resistenten ES-Zellen. (A) PCR Produkte wurden durch Southern Blot sichtbar gemacht. 3 Pools von Zellen erzeugten das erwartete 2,2 kb PCR Produkt (B9, E9 und G9). (B) Die Klone in den jeweiligen Pools wurden aufgetaut, ohne Feder-Zellen expandiert und per Southern Blot nach HpaI-Verdau analysiert. Man erkennt das wt Cytochrom C Allel bei 4 kb (oberer schwarzer Pfeil) und ein vermutliches Pseudogen bei 3 kb (unterer schwarzer Pfeil), sowie das korrekte Produkt der doppelt homologen Rekombination (4,7 kb; Klon I G9; weißer Pfeil). Bei diesem Klon ist das Signal des wt Allels um 50 % erniedrigt, während das Verhältnis von wt zu transgenem Allel 1:1 ist. Bei anderen Klonen kann man zufällig integrierte Transgene bei anderen Größen erkennen.

Diese Klone wurden ohne feeder-Zellen expandiert, genomische DNA isoliert, diese mit HpaI verdaut und nach Southern Blot mit der Promotorsonde hybridisiert (Abb. 3.1.4B). Auf dieser Abbildung erkennt man noch weitere transgene Klone, bei denen jedoch nicht das Fragment mit der erwarteten Größe (4,7 kb für korrekte doppelt homologe Rekombination) auftaucht. Dieses Fragment zeigt nur Klon 4./IG9. Die Integration auf der 3' Seite wurde noch einmal mit sauberer DNA überprüft. Der Klon 4./IG9 wurde dreimal zur Blastozysteninjektion eingesetzt. Es wurden daraus insgesamt 4 Chimären geboren, wovon Chimäre #8 "Octavian" (Abb. 3.1.5E) das Transgen in die Keimbahn weitergab. Die Linie wurde dann auf C57BL/6 und CD-1 genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. Die Weitergabe des Transgens wurde in der F₁-Generation mit Southern Blot und PCR verifiziert (Abb. 3.1.5B), danach wurde die Zucht nur mittels PCR Genotypisierung überwacht (Abb 3.1.5D).

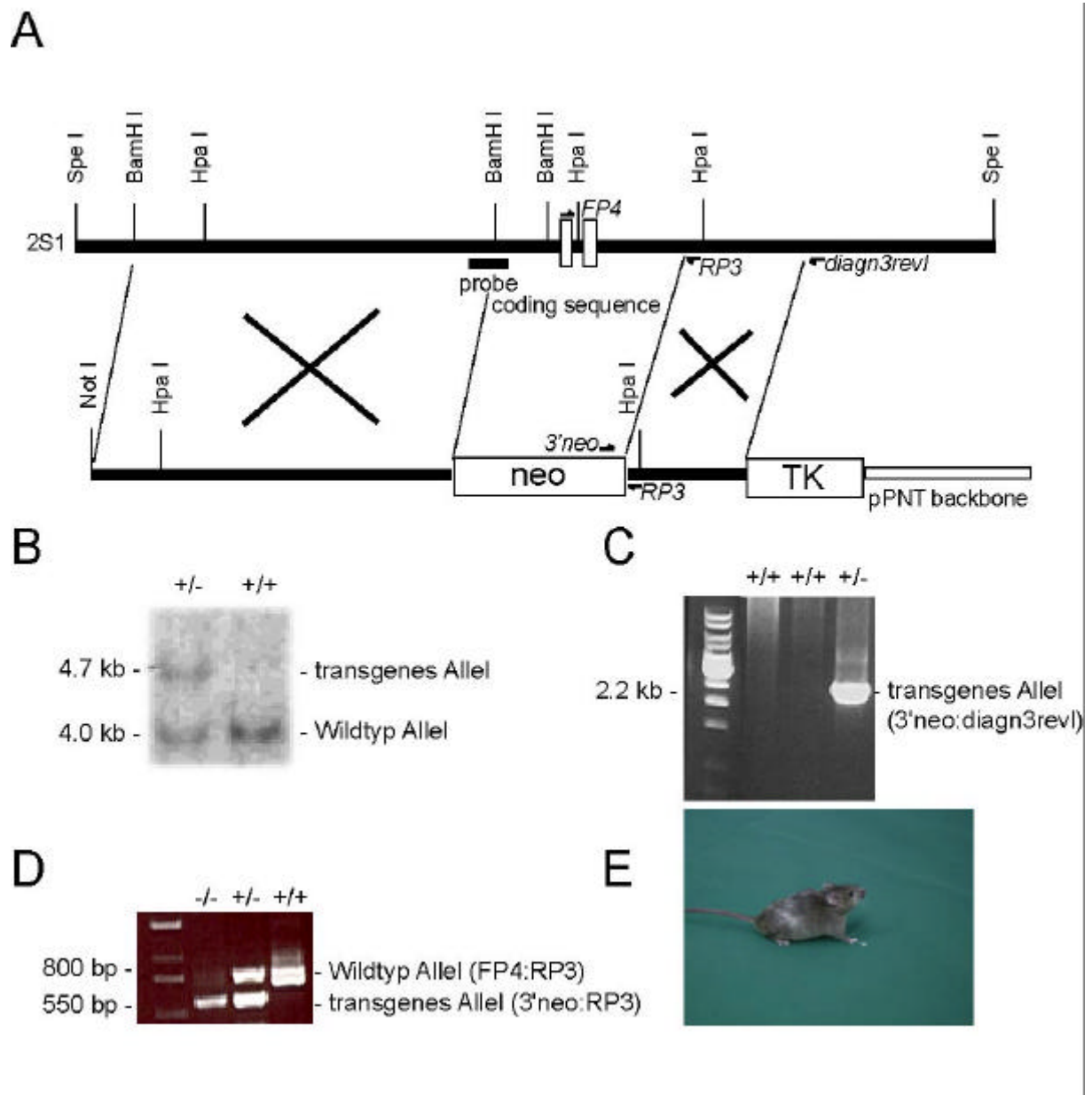


Abbildung 3.1.5: Zusammenfassung der Inaktivierung des somatischen Cytochrom C Gens bei der Maus. (A) Konstruktion des Replacement-Vektors pPNTcycs. Wichtige Schnittstellen und PCR-Primer, sowie die Cytochrom C Exons und Resistenzgene (offene Kästen) sind eingezeichnet. (B) Southern Blot von genomischer DNA. (HpaI Verdau; Detektion mit der Promotorsonde). (C) Integrations-PCR am kurzen Arm. Nur transgene Zellen, die die korrekte Insertion des neo-Resistenzgens ausweisen, liefern das 2,2 kb PCR-Produkt mit diesen Primern. (D) Genotypisierungs-PCR. Alle möglichen Cytochrom C Genotypen können simultan mit dieser GabelPCR nachgewiesen werden. (E) Foto von Chimäre #8, die das Transgen in der Keimbahn weitergab.

3.1.3 Analyse der Cytochrom C Knockout Maus

Kurz nachdem wir Keimbahntransmission für das Cytochrom C Null-Allel erhalten hatten, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe die Cytochrom C knockout Maus publiziert (Li et al., 2000). Danach ist die genetische Inaktivierung von Cytochrom C in der Maus embryonal letal

und man kann E12 bestenfalls völlig deformierte Zellmassen ohne erkennbare Körperachse oder Gliedmaßen mit Cytochrom C Null Genotyp isolieren (Li et al., 2000). Wir konnten mindestens zwei solcher retardierter Embryonen E12 und E13 finden (Abb. 3.1.5D). Die Genotypisierung dieser halb resorbierten Embryonen ist aber sehr schwierig, vor allem wegen Kontaminationen mit mütterlichem Gewebe, die schwer zu vermeiden ist. Auch auf CD-1 Hintergrund überleben die Embryonen nicht länger als auf C57BL/6 Hintergrund. Die Embryonen sterben also noch vor der Ausbildung eines erkennbaren Nervensystems, so daß die Analyse des Nervensystems bei den Cytochrom C Null Tieren unmöglich ist.

Beim Vergleich der Intensität von Cytochrom C auf einem Western Blot erkennt man aber, daß in heterozygoten Tieren, zumindest in manchen Geweben, die Menge an Cytochrom C reduziert ist – es liegt also ein Gendosiseffekt vor (Abb.3.1.6).

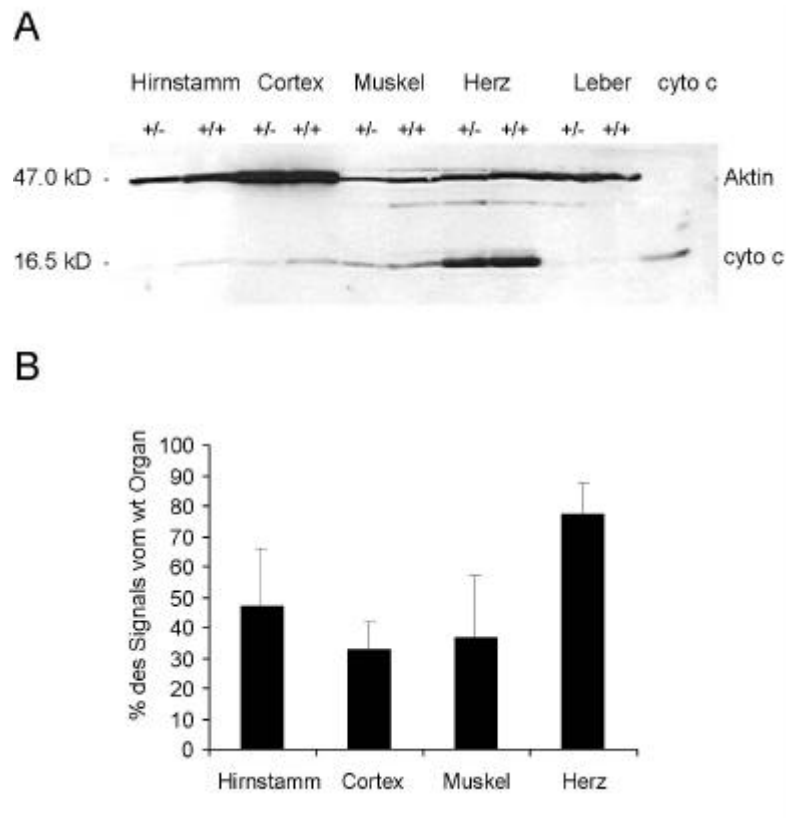


Abbildung 3.1.6: Gendosiseffekt bei heterozygoten Cytochrom C Mäusen. (A) Western Blot von Gewebekomplexen von Cytochrom C ^{+/+} und ^{+/-} Mäusen. (B) Die Expression von Cytochrom C erscheint in heterozygoten Tieren in verschiedenen Organen um die Hälfte erniedrigt (densitometrische Auswertung von 2 Western Blots bei mehreren Expositionszeiten n=3-5).

3.1.4 Analyse der Folgen der Reduktion der Cytochrom C Gendosis auf die Apoptose von Motoneuronen

Man könnte also, falls die Menge von Cytochrom C für die Initiation oder Exekution der Apoptose geschwindigkeitsbestimmend ist, erwarten, einen Effekt auf die Ausführung der Apoptose in Cytochrom C ^{+/-} Tieren/Zellen zu finden. Wir überprüften diese Hypothese in zwei in vivo Paradigmen für den Zelltod von Motoneuronen. Die Phase des natürlichen Zelltods von Motoneuronen erstreckt sich bis in die ersten postnatalen Tage. Wäre der Zelltod von Motoneuronen verzögert, so würde man eine Verlängerung dieser Phase erwarten. Im anderen Paradigma, dem läsionsinduzierten Zelltod, wird ein Fazialisnerv am ersten Tag nach der Geburt durchtrennt. Man erwartet dann die Degeneration der meisten Motoneurone im Fazialiskern innerhalb einer Woche. Wäre die Apoptose der lädierten Motoneurone verzögert, so würde man erwarten, daß die Zählung der Motoneurone im Fazialis wenige Tage nach der Läsion einen Unterschied zwischen Cytochrom C^{+/-} und ^{+/+} Mäusen ergibt. Entsprechend dieser Überlegungen wurden die Motoneurone in 5 Tage alten Cytochrom C ^{+/-} und ^{+/+} Mäusen mit und ohne Fazialisläsion gezählt. Wie in Abbildung 3.1.7 zu sehen ist, wurde kein Unterschied in der Anzahl von Motoneuronen im Fazialiskern gefunden. Auch nach Fazialisläsion am ersten postnatalen Tag war kein Unterschied zwischen den Genotypen zu finden (Abb 3.1.7).

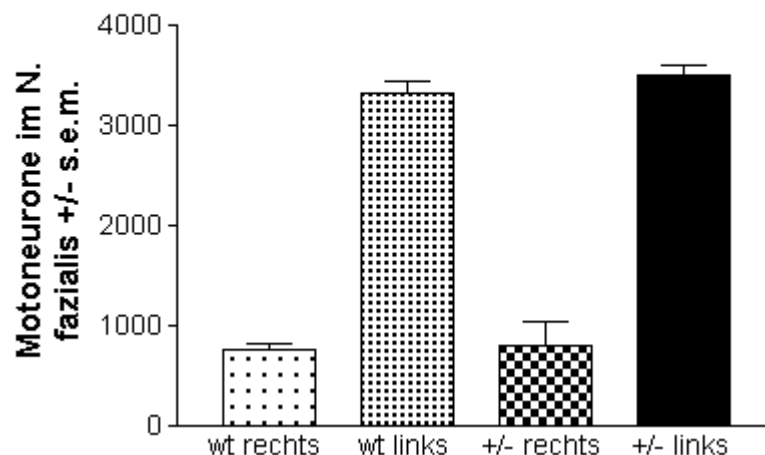


Abbildung 3.1.7: Auszählung von Motoneuronen im Fazialiskern von 5 Tage alten Cytochrom C ^{+/-} und ^{+/+} Mäusen. Die Anzahl von Motoneuronen nach der Phase des physiologischen Zelltods von Motoneuronen ist 5 Tage nach der Geburt nicht verändert (linke Fazialiskerne). Der rechte Fazialisnerv wurde am Tag 1 nach der Geburt durchtrennt, um die Degeneration der axotomierten Motoneurone zu induzieren. Auch in diesem Fall erscheint der Zelltod der Motoneurone nicht verzögert (“rechts”). Die Motoneuronen im Fazialiskern wurden in Cresylviolett-gefärbten Serienschritten in jedem fünften Schnitt gezählt; n=4-5).

Es ist durchaus möglich, daß ein Phänotyp der Cytochrom C^{+/-} Motoneurone in bezug auf die Ausführung der Apoptose leichter in vitro zu quantifizieren ist. Es gibt eine Veröffentlichung (Raoul et al., 1999) die zeigt, daß bei einem Teil der embryonalen Motoneurone in vitro durch Aktivierung des Fas-Rezeptors Apoptose induziert werden kann. Dieses Paradigma wurde von uns gewählt, weil in diesem Falle der pro-apoptotische Stimulus, der agonistische α -Fas Antikörper Jo2, sehr genau titriert werden kann, sodaß auch ein milder Dosisseffekt gemessen werden könnte. In Abbildung 3.1.8 ist ein repräsentatives Experiment gezeigt, in dem es durchaus so aussieht, als ob die Überlebenskurve der Cytochrom C^{+/-} Motoneurone zu höheren Jo2 Dosen verschoben ist. Diese vielversprechende Beobachtung muß jedoch noch in Wiederholungsexperimenten bestätigt werden.

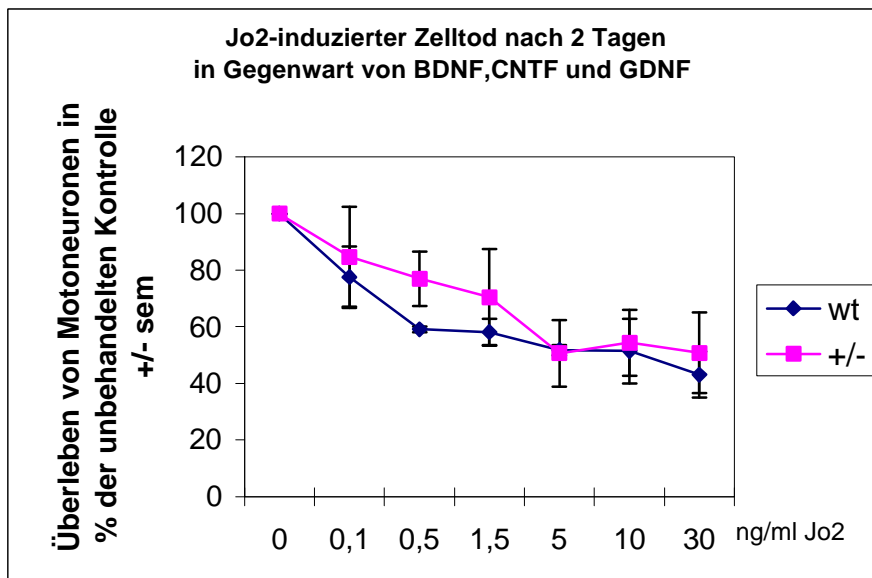


Abbildung 3.1.8: In einem Experiment erschien die Überlebensrate von embryonalen Motoneuronen in Gegenwart von BDNF, CNTF und GDNF nach Jo2 Behandlung für die Cytochrom C heterozygoten Zellen tendenziell verschoben. Embryonale Motoneurone wurden E12,5 isoliert und über Nacht mit BDNF (1 ng/ml), CNTF (5 ng/ml) und GDNF (0,1 ng/ml) kultiviert. Am nächsten Tag wurde nach Mediumwechsel zu den neurotrophen Faktoren der agonistische Fas Antikörper Jo2 in der angegebenen Konzentration gegeben. Die Motoneurone wurden weitere zwei Tage kultiviert und dann gezählt. Das Überleben wurde relativ zur einer Kontrolle ohne Jo2 ausgedrückt.

3.1.5 Analyse der Folgen der Reduktion der Cytochrom C Gen dosis auf die Apoptose von Thymozyten

Bei Thymozyten von Caspase 9 defizienten Mäusen wurde eine Erniedrigung der Apoptoserate im Vergleich zu Kontrollen gefunden (Kuida et al., 1998). Wir wollten daher überprüfen, ob es ähnliche Effekte bei Cytochrom C heterozygoten Zellen gibt, da sowohl Caspase 9 als auch Cytochrom C Komponenten des Apoptosoms sind. Daher wurde die Apoptose von Thymozyten aus Cytochrom C^{+/-} und ^{+/+} Mäusen in Zusammenarbeit mit Dr. Andrew Chan aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Gold untersucht. Dabei wurden Thymozyten aus jungen erwachsenen Mäusen isoliert und mit bestimmten pro-apoptotischen Stimuli behandelt. Danach wurde der zeitliche Verlauf des Zelltods der behandelten Zellen anhand folgender Parameter verfolgt: Die Induktion der Apoptose wurde mit Annexin V-Färbung verfolgt, die die Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Plasmamembran darstellt (Chan et al., 1998). Der endgültige Zelltod wurde anhand einer Propidiumiodid (Pi)-Färbung verfolgt. Dabei wird die Fluoreszenz des Propidiumfarbstoffs nach seiner Interkalation in Kern-DNA gemessen. Lebende Zellen sind jedoch in der Lage, Pi auszuschließen, sodaß nur tote Zellen mit durchlässiger Membran gefärbt werden. Schließlich wurde auch eine TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling)-Färbung zur Detektion von apoptotischer DNA Fragmentierung an diesen Zellen durchgeführt. Alle Messungen wurden am FACS Gerät der Arbeitsgruppe Gold durchgeführt mit jeweils 10000 gezählten Zellen. Als pro-apoptotische Stimuli wurden UV-B (254 nm, 40 mJ/cm²), Gammastrahlung (125 rad) und Methylprednisolon (Urbason; 0,1 µg/ml) verwendet.

In Abbildung 3.1.9A ist gezeigt, daß der Cytochrom C Genotyp keinen Effekt auf den Verlauf der Phosphatidylserinexposition nach Gammabestrahlung mit 125 rad hat. Im Gegensatz dazu erkennt man, daß der Zusammenbruch der Membranintegrität bei heterozygoten Zellen verzögert ist (Abb. 3.1.9B).

Bei Behandlung von Thymozyten mit Urbason findet man ebenfalls keinen signifikanten Effekt des Genotyps auf die Phosphatidylserinexposition (Abb. 3.1.10A). Es bestätigt sich aber der Trend aus Abb. 3.1.9B, daß Cytochrom C^{+/-} Zellen einen verzögerten Zusammenbruch der Membranintegrität aufweisen (Abb. 3.1.10B).

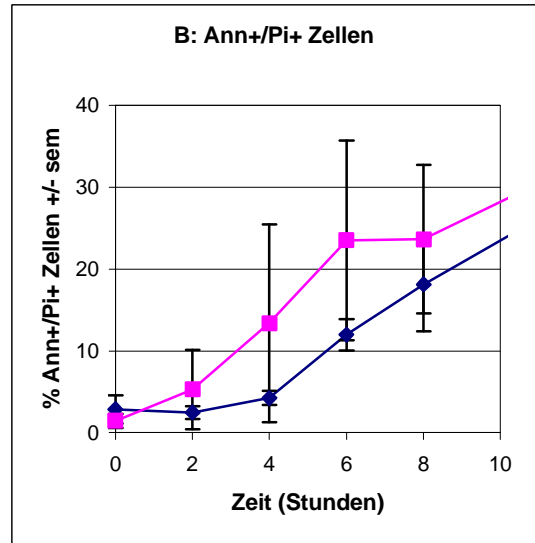
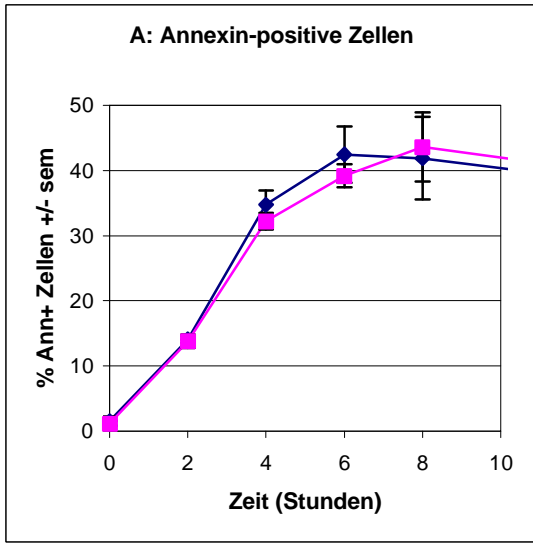


Abbildung 3.1.9: Verlauf des Zelltods von Thymozyten nach γ -Bestrahlung mit 125 rad. A: Die Exposition von Phosphatidylserin nach Bestrahlung wird nicht signifikant durch die Reduktion der Cytochrom C Gendosis beeinflusst. B: Der Zusammenbruch der Membranintegrität wird durch die Reduktion der Cytochrom C Gendosis verzögert. Quadrate: Wildtyp. Diamanten: Cytochrom C^{+/-}. n=3 Experimente.

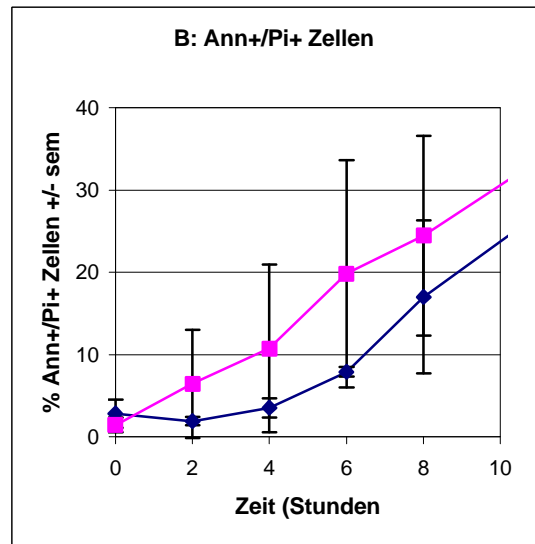
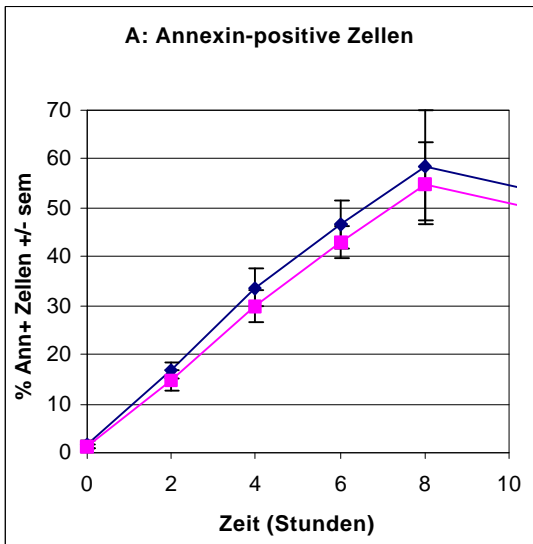


Abbildung 3.1.10: Verlauf des Zelltods von Thymozyten nach Behandlung mit 0,1 μ g/ml Urbason. A: Die Exposition von Phosphatidylserin nach Glucokortikoidbehandlung wird nicht signifikant durch die Reduktion der Cytochrom C Gendosis beeinflusst. B: Der Zusammenbruch der Membranintegrität wird durch die Reduktion der Cytochrom C Gendosis verzögert. Quadrate: Wildtyp. Diamanten: Cytochrom C^{+/-}. n=3 Experimente.

Bei Zellen von Mäusen mit genetischer Inaktivierung von Apaf-1 und Caspase 9 wurde eine Reduktion der Apoptose nach UV-Bestrahlung berichtet (Hakem et al., 1998). Insofern lag es nahe, die Apoptose von Thymozyten mit Reduktion der Cytochrom C Gendosis auch nach UV-Bestrahlung zu untersuchen. In der Tat konnten wir einen Effekt der Cytochrom C Gendosis auf den Verlauf der Apoptose nach UV-Bestrahlung finden. In Abbildung 3.1.11 kann man erkennen, daß der Trend aus den vorangegangenen Experimenten (Abb. 3.1.9 und Abb. 3.1.10) hier deutlicher zutage tritt: Bei Zellen mit Reduktion der Cytochrom C Gendosis gibt es im Vergleich zu Wildtypzellen ab 6 h eine Erhöhung des Anteils Ann^+/Pi^- Zellen bei gleichzeitiger Reduktion Ann^+/Pi^+ Zellen. Das bedeutet, daß der Übergang von Annexin-Positivität zu Annexin- und Pi-Positivität bei Cytochrom C^{+/-} Thymozyten verzögert ist und sich daher die Zwischenstufe (Ann^+/Pi^-) anreichert.

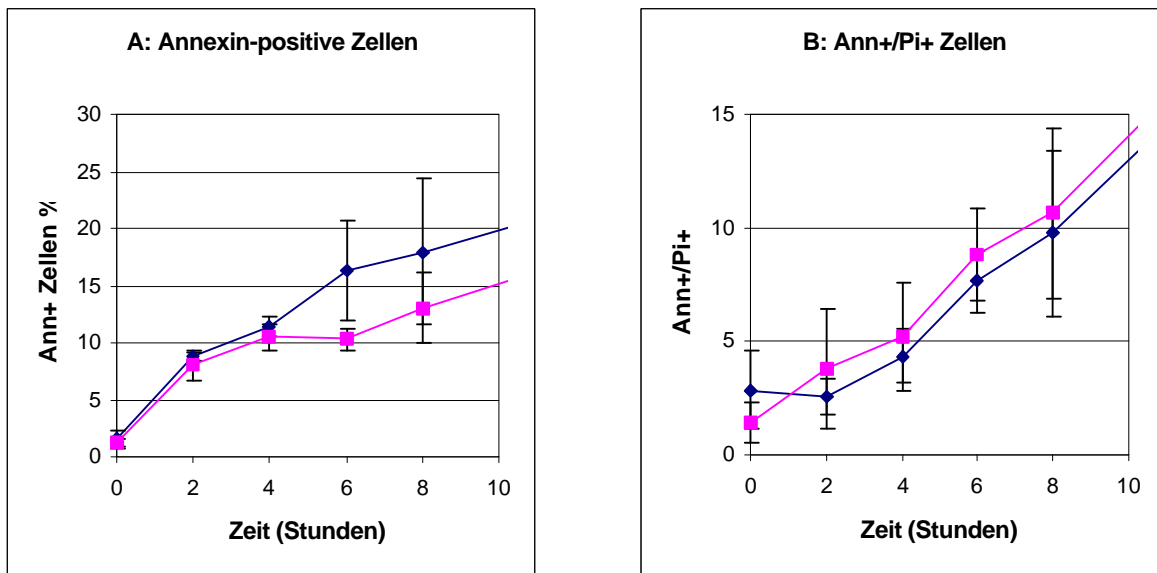


Abbildung 3.1.11: Verlauf des Zelltods von Thymozyten nach UV-B Bestrahlung mit 40 mJ/cm². A: In diesem Experiment erscheint die Phosphatidylserinexposition der heterozygoten Zellen beschleunigt im Vergleich zum Wildtypen. Tatsächlich war ein ähnlicher Trend auch in Abb. 3.1.10 zu erkennen. Möglicherweise wird das Zwischenprodukt akkumuliert, da die Weiterreaktion verzögert ist. B: Entsprechend ist der Zusammenbruch der Membranintegrität verzögert, jedoch nicht signifikant. Quadrate: Wildtyp. Diamanten: Cytochrom C^{+/-}. n=3 Experimente.

Dieser Effekt ist allerdings nur transient und nach 24 Stunden unterscheiden sich die Werte von Cytochrom C^{+/-} und ^{+/+} nicht mehr. Ein Problem stellt jedoch die Interpretation dieser Ergebnisse dar: Es ist durchaus möglich, daß zur Ausführung der Apoptose, zumindest in einer späten Phase, eine gewisse Menge an Cytochrom C ins Cytoplasma freigesetzt sein

muß. Die Reduktion der Menge an Cytochrom C würde sich schließlich in einem verzögerten Erreichen eines hypothetischen Schwellenwerts äußern, was durchaus eine Verzögerung der Apoptose erklären könnte. Andererseits könnte die Energieladung der Zelle an der Entscheidung Apoptose/Nekrose beteiligt sein (Nicotera et al., 1999). Die Zellen könnten in diesem hypothetischen Modell nicht den "schnelleren" apoptotischen Weg zum Zelltod beschreiten und würden dann verzögert und schließlich "nekrotisch", d.h. lytisch sterben.

Hier nicht gezeigte Pilotexperimente zur TUNEL-Färbung der sterbenden Thymozyten zeigen keinen Unterschied zwischen beiden Genotypen. Zusammenfassend kann man sagen, daß es in unserem heterozygoten Tiermodell einen schwachen Einfluß von Cytochrom C auf den Verlauf des Zelltods gibt, daß aber Cytochrom C nur an einem späten Schritt (nach der DNA-Fragmentierung) geschwindigkeitsbestimmend beteiligt ist.

3.1.6 Weitere Untersuchungen der Maus mit heterozygoter Inaktivierung des Cytochrom C Gens

Erste Experimente der Arbeitsgruppe Gold, die im Moment wiederholt werden, deuten darauf hin, daß die Dosis des Cytochrom C Gens einen Einfluß auf den Verlauf der Experimentellen Autoimmunencephalitis (EAE) nach Immunisierung mit dem Myelinprotein MOG hat. Sollten sich die bisherigen Resultate bestätigen lassen, hätte man Hinweise, daß die beobachtete Verzögerung der Apoptose in vivo durchaus relevant ist.

Für die Zukunft sind Untersuchungen des sehr frühen Zelltods von spezifischen Populationen von Motoneuronen geplant, wo man eher einen meßbaren Unterschied der Zellzahlen zu einem bestimmten Zeitpunkt erwartet, da die Apoptose in einem sehr eng begrenzten Zeitfenster abläuft.

Ein bisher nicht untersuchter Aspekt ist der Einfluß der Gendosisreduktion von Cytochrom C auf den Energiemetabolismus der Maus. Gerade im Hinblick auf eine Reihe neurodegenerativer Erkrankungen mit Reduktion des mitochondrialen Energiestoffwechsels, wie z.B. Leigh's Syndrom, könnte dieses Mausmodell von großem Nutzen sein.

3.2 Analyse der NFL-Cre Maus

3.2.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Die zelltypspezifische Genablation mit dem Cre/loxP System umgeht einige der größten Probleme der klassischen Methode der Geninaktivierung in Mäusen, indem nur in bestimmten Geweben oder Zelltypen, eventuell sogar nur ab einem bestimmten Zeitpunkt, ein Gen gezielt ausgeschaltet werden kann. Allerdings hängt das Cre/loxP System von der Verfügbarkeit von brauchbaren Cre-transgenen Mauslinien mit entsprechenden Expressionsmustern und –kinetiken ab. Wir haben eine transgene Mauslinie etabliert und analysiert, die die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Neurofilament-L Promotors exprimiert. Das Expressionsmuster von Cre wurde in mehreren Geweben mit RT-PCR und durch Kreuzung mit einer Reportergermaus untersucht. Im Gehirn wurden Cre exprimierende Zelltypen mit in-situ Hybridisierung, Immunhistochemie und wiederum mit Hilfe der Reportermaus identifiziert. Dabei zeigte sich eine spezifische Cre Expression in bestimmten Neuronpopulationen wie hippocampalen Pyramidenzellen und spinalen und cranialen Motoneuronen. Unsere NFL-Cre Maus besitzt einige Eigenschaften, die bisher publizierte Cre-Linien nicht aufweisen, so z.B. eine starke Cre Expression in hippocampalen Pyramidenzellen, aber nicht in Körnerzellen des Gyrus dentatus; Expression in cortikalen Pyramidenzellen, aber keine Expression im Striatum; Expression in zerebellären Purkinje-, aber nicht in Körnerzellen; sowie die Expression in spinalen und cranialen Motoneuronen, aber nicht in angrenzenden Interneuronen.

3.2.2 Etablierung der Linie NFL-Cre

Die Eignung des humanen NF-L Promotors zur Kontrolle der neuronspezifischen Expression von Transgenen in der Maus wurde bereits mehrfach gezeigt (Leconte et al., 1994; Akassoglou et al., 1997). Dabei war bereits bekannt, daß cis-Elemente innerhalb der Introns für die Regulation der Spezifität der Genexpression wichtig sind (Beaudet et al., 1992; Hsu et al., 1995).

Die Linie NFL-Cre wurde von Dr. Jennifer Gunnensen in unserem Labor etabliert. Der Vektor zur transgenen Expression von Cre unter der Kontrolle des humanen NF-L Promotors wurde folgendermaßen konstruiert: Das Plasmid dNFL, welches ein Fragment des humanen NF-L Gens enthält, wurde freundlicherweise von Dr. J.P. Julien, McGill University, Montreal, Kanada, zur Verfügung gestellt. Ein 6 kb EcoRI Fragment, welches den NF-L Promotor und den gesamten offenen Leserahmen von NF-L enthält, wurde in pBSIIKS(+) subkloniert,

wodurch ein Stück von 3,4 kb 3' untranslatierter Sequenz verloren ging. Dieser Vektor, pKS.NFL, wurde mit ClaI und XhoI verdaut, wobei die kodierende Region von Exon 1 und ein kleiner Teil von Intron 1 entfernt wurde. Nach Auffüllen der Enden wurde ein Cre-pA Fragment, abgeleitet aus pMC-Cre (von Drs. Gu und Rajewsky, Köln), inkloniert, um das Plasmid pKS.NFL-Cre zu ergeben. Das Plasmid pKS.neo wurde durch Umklonierung einer NheI/BamHI geschnittenen neo-Kassette aus pGH1 (Gu et al., 1993) in XbaI/BamHI geschnittenen pBSIIKS(+) erhalten. Ein SmaI Fragment aus pKS.NFL-Cre, welches 2 kb vom NF-L Promotor, gefolgt von Cre-pA und dem Rest des humanen NF-L Gens enthielt, wurde in die SmaI Schnittstelle von pKS.neo kloniert, sodaß das NFL-Cre Gen 3' von der neo-Kassette lag. Das gesamte neo-NFL-Cre Fragment wurde mit KpnI/NotI Verdau aus dem Vektor geschnitten, gereinigt und in R1 ES-Zellen elektroporiert (Abb 3.2.1A). Transgene, G418 resistente Klone wurden einer Southern Blot Analyse unterworfen. Zwei Klone (#13 und #50) wurden ausgewählt und als transgene Linien etabliert. Linie #13 wurde auf C57BL/6, Linie #50 auf CD-1 genetischen Hintergrund rückgekreuzt. Im Laufe meiner Analysen wurde klar, daß Linie #13 keine Cre Expression zeigt, und wurde nicht weiter gezüchtet.

3.2.3 Analyse der transgenen Cre Expression von NFL-Cre

Die Linie #50 wurde mit einer lacZ Reportermauslinie auf CD-1 Hintergrund (AlacZR; Akagi et al., 1997) verkreuzt, um das Aktivitätsmuster von Cre in verschiedenen Geweben zu bestimmen. Dazu wurden von NFL-Cre;lacZ transgenen Mäusen verschiedene Gewebe entnommen und die Expression von Cre mittels RT-PCR überprüft. Abbildung 3.2.1B zeigt, daß Cre in adultem zerebralen Kortex, Hirnstamm und Rückenmark, aber nicht im Ischiasnerv exprimiert ist. Die Expression scheint also spezifisch für Neurone zu sein, während Gliazellen, wie Schwannzellen, keine Cre Rekombinase exprimieren. Andere Gewebe wie innere Organe exprimierten Cre nicht (nicht gezeigt). In einem anderen Experiment wurde auf genomischer Ebene die Rekombination des Reportergens durch Cre gezeigt (Abb. 3.2.1C). In dieser Abbildung ist das Prinzip der PCR Analyse des genomischen lacZ Reporterlokus schematisch gezeigt. Auch mit diesem Test zeigte sich, daß die Cre-vermittelte Rekombination des Reportergens spezifisch für Gehirn und Rückenmark ist. In Abbildung 3.2.1D und E ist schließlich am Beispiel des Nucleus facialis gezeigt, daß die Expression der Cre Rekombinase spezifisch für Neurone ist, während umgebende Gliazellen Cre nicht exprimieren. Diese Analysen zeigen zusammenfassend, daß die Expression des NFL-Cre Transgens in Mäusen spezifisch für Nervenzellen ist.

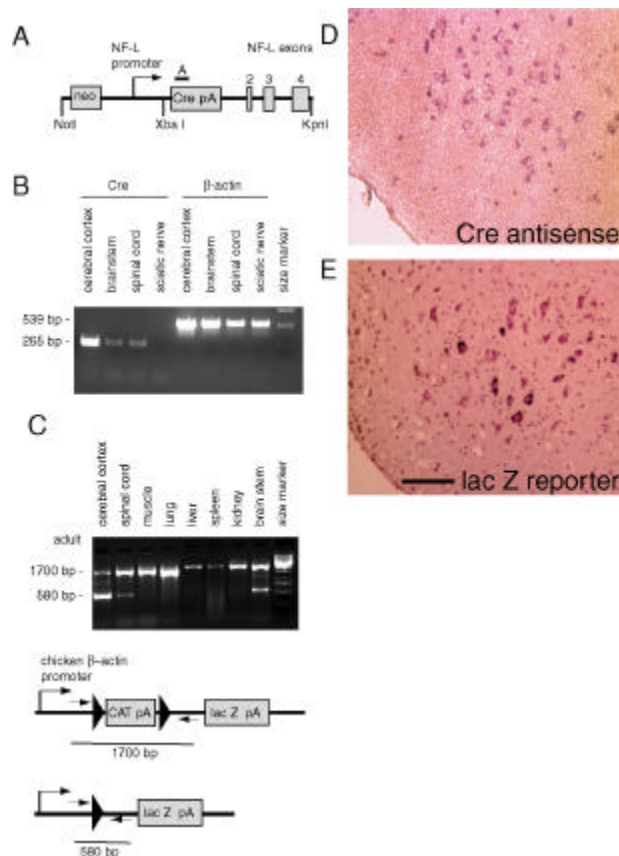


Abbildung 3.2.1: Generierung und Charakterisierung von NFL-Cre. (A) Die kodierende Region von Exon 1 innerhalb eines humanen 6 kb NF-L Genfragments wurde durch den offenen Leserahmen der Cre Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 ersetzt, wobei regulatorische Sequenzen innerhalb der NF-L Introns unversehrt blieben. (B) Die Cre Rekombinase ist spezifisch im Gehirn und dem Rückenmark exprimiert. Mit RT-PCR auf Gesamt-RNA aus adultem cerebralen Kortex, Hirnstamm, Rückenmark und Ischiasnerv wurde Cre mRNA nur im Gehirn und Rückenmark detektiert, aber nicht im Ischiasnerv, der Leber, der Milz oder den Nieren (die letzten drei sind nicht gezeigt). (C) Die transgene Cre Rekombinase ist enzymatisch aktiv und rekombiniert ein Reporterallel in vivo. NFL-Cre Mäuse wurden mit einem lacZ Reporterstamm verkreuzt. Die Cre-vermittelte Rekombination des Reportergens wurde via PCR auf genomischer DNA als 580 bp Fragment detektiert, während das nicht rekombinierte Allel ein 1,7 kb Produkt lieferte. Die Cre-vermittelte Rekombination ist daher spezifisch für Gehirn und Rückenmark. (D) Die Expression der Cre Rekombinase ist neuronspezifisch. Mit in situ Hybridisierung findet man Cre Expression im Fazialiskern nur in Motoneuronen. (E) Cre-vermittelte Rekombination des lacZ Reporterallels in Motoneuronen im Fazialiskern. Hirnschnitte von NFL-Cre; lacZ Mäusen wurden mit X-Gal gefärbt, um die Aktivität der β-Galactosidase sichtbar zu machen. Im adulten Fazialiskern waren mindestens $53,7 \pm 12,9$ % (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n=3$) der Motoneurone durch X-Gal gefärbt. Maßstab 100µm. (Abbildung modifiziert aus Schweizer et al., 2002).

Im Zuge der ersten Charakterisierung von NFL-Cre wurde klar, daß das Expressionsmuster von Cre im Nervensystem sehr vielfältig ist. Die X-Gal Färbung in Gefrierschnitten war allerdings nur bei höheren Vergrößerungen gut sichtbar, sodaß für die Darstellung der Cre

Aktivität in Übersichten ein anderes Vorgehen gewählt wurde. Deshalb wurde ein Gehirn einer adulten NFL-Cre; lacZ Maus zuerst mit X-Gal gefärbt und dann nach Postfixation am Vibratom geschnitten. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.2.2 dargestellt.

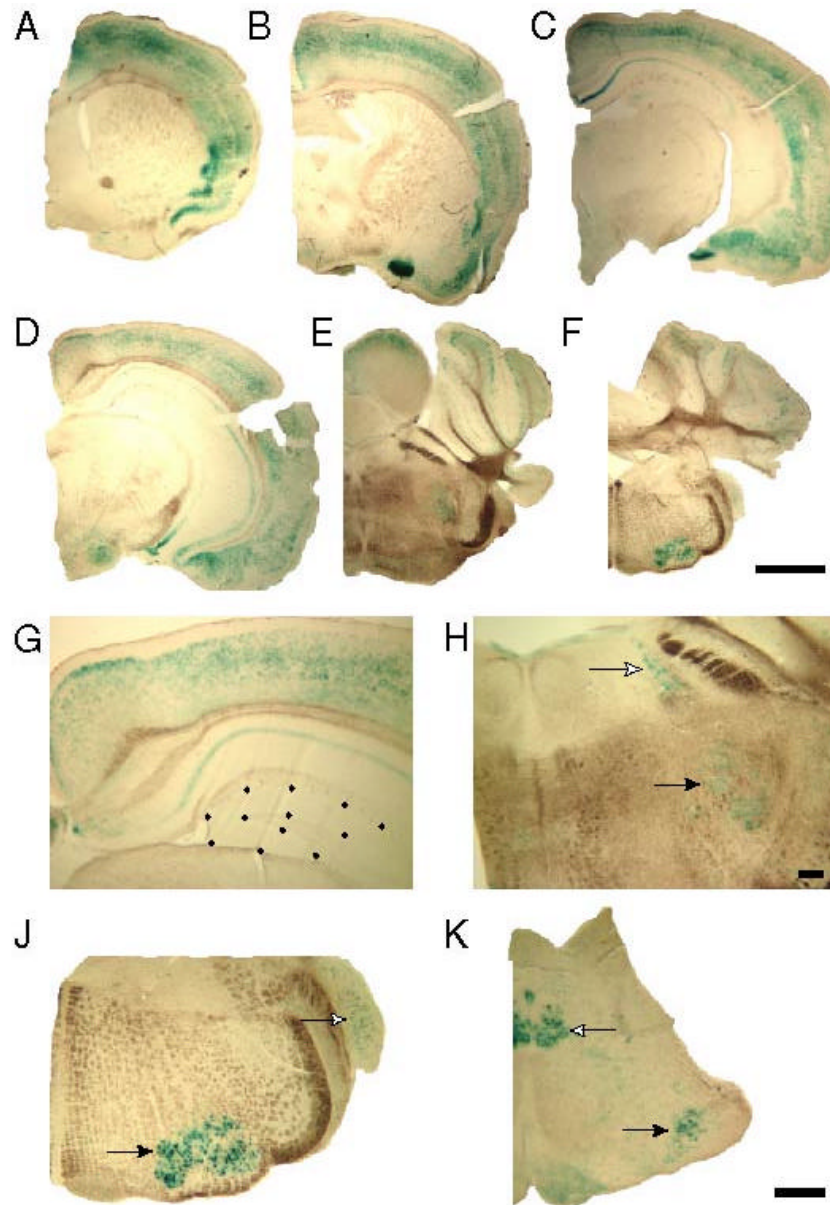


Abbildung 3.2.2: Übersicht über die Expression von NFL-Cre anhand der β -Galactosidaseaktivität des Reportergens. (A-F) Coronalsschnitte durch das Gehirn einer adulten NFL-Cre; lacZ Maus in sechs verschiedenen Ebenen bei gleicher Vergrößerung. Maßstab: 1 mm. (G) Cre-Expression im Hippocampus ist spezifisch für Pyramidenzellen des Cornus ammonis, jedoch abwesend in Körnerzellen des Gyrus dentatus (schwarze Punkte). (H) Cre Expression in Kernen des V. cranialen Nervs: mesenzephaler Kern (weißer Pfeil); Motorkern (schwarzer Pfeil). Maßstab für G und H: 100 μ m. (J) Cre Expression im Fazialiskern (schwarzer Pfeil) und im ventralen Nucleus cochlearis (weißer Pfeil). (K) Cre Expression im Nucleus hypoglossus (weißer Pfeil) und im lateralen Nucleus reticularis (schwarzer Pfeil). Maßstab für J und K: 500 μ m.

Die Expression von Cre in Neuronen des cerebralen Kortex reflektiert die zytoarchitektonischen Grenzen zwischen verschiedenen Cortexregionen (Abb. 3.2.2 A-D). Auffällig ist hingegen die völlige Abwesenheit von Cre Expression (bzw. β -Galactosidaseaktivität) im Striatum (Abb. 3.2.2A,B). Man kann weiterhin gut erkennen, daß im Hippocampus die Pyramidenzellen des Cornus ammonis deutlich gefärbt sind, während keine Färbung im Gyrus dentatus zu erkennen ist (Abb.3.2.2C,D,G). In Abbildung 3.2.2E und F erkennt man sehr deutlich die Färbung der Zellschicht der Purkinjezellen im Kleinhirn und einzelne Kerne im Hirnstamm. Die Expression von Cre in Kerngebieten des V. Hirnnerven ist in Abb.3.2.2H nochmals vergrößert dargestellt, ebenso die Expression in den rein motorischen Kernen des VII. und XII. Hirnnerven (Abb. 3.2.2J,K). Die Expression von Cre in spinalen und cranialen Motoneuronen wurde bei der Untersuchung der Rolle des Transkriptionsfaktors Stat3 für das Überleben dieser Zellen (Abschnitt 3.3) ausgenutzt.

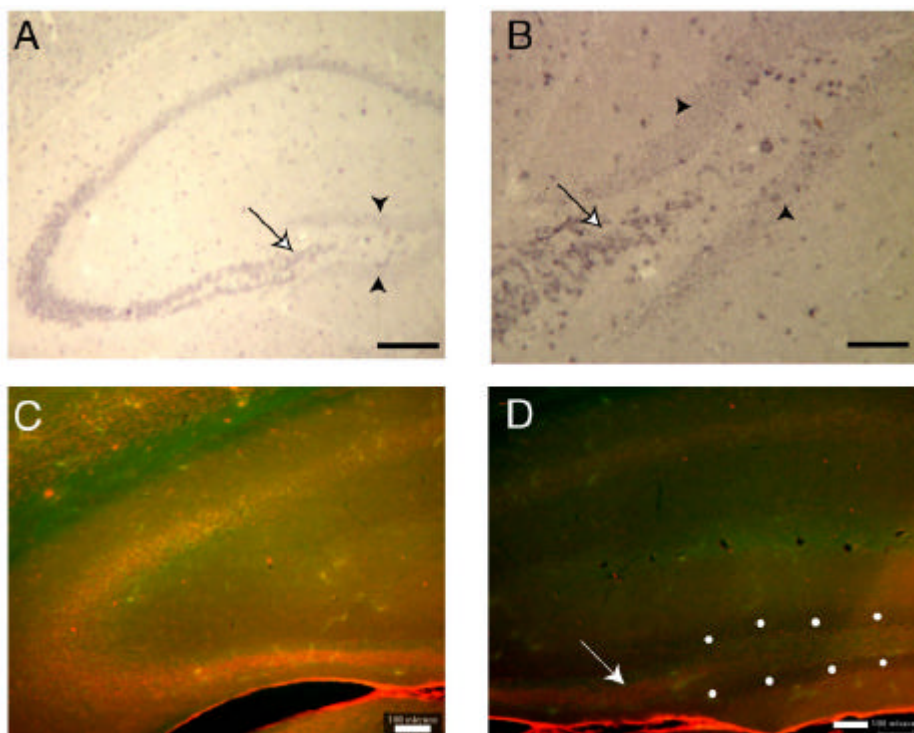


Abbildung 3.2.3: Expression von Cre Rekombinase im Hippocampus. (A) In situ Hybridisierung für Cre Rekombinase. Während Pyramidenzellen in CA1 und CA3 stark gefärbt sind (weißer Pfeil), ist Cre praktisch abwesend in Körnerzellen des Gyrus dentatus (Pfeilspitzen). Maßstab 200 μ m. (B) Ausschnitt aus (A). Man erkennt einzelne positiv gefärbte Neurone im Hilus, Körnerzellen sind jedoch nicht gefärbt (Pfeilspitzen). Maßstab 50 μ m. (C) Immunfluoreszenzdetektion von Cre im Hippocampus. Cre (rot); Parvalbumin (grün). (D) Vergrößerung aus (C). Weiße Punkte zeigen den Verlauf des Gyrus dentatus an. Die Pyramidenzellen in CA3 sind deutlich Cre-positiv (Pfeil), ebenso einzelne Neurone im Hilus.

Eine besonders interessante Eigenschaft der Cre Expression von NFL-Cre ist die Abwesenheit von Cre-Aktivität im Gyrus dentatus. Gerade für elektrophysiologische Untersuchungen im Hippocampus hätte man die Möglichkeit, das Fehlen von Genaktivitäten auf der prä-, aber nicht der postsynaptischen Seite zu untersuchen. Da auch die Expression des Reportergens prinzipiell vom Integrationsort in Genom abhängig ist, wäre es möglich, daß Cre zwar im Gyrus dentatus aktiv ist, diese Aktivität aber aufgrund der fehlenden Reporterexpression nicht detektiert wird. Aus diesem Grunde, wurde dieser Punkt mit zwei weiteren, unabhängigen Methoden nochmals näher untersucht. In Abbildung 3.2.3A und B ist das Ergebnis einer in situ Hybridisierung mit einer Cre-spezifischen Sonde dargestellt. Wiederum ist die Cre mRNA nur in den Pyramidenzellen in CA1 und CA3 nachzuweisen, während im Gyrus dentatus zwar einzelne Interneurone im Hilus, jedoch keine Körnerzellen, gefärbt sind. Auch immunhistochemisch läßt sich die Cre Rekombinase nur in CA1 und CA3, jedoch nicht in Körnerzellen des Gyrus dentatus, nachweisen (Abb. 3.2.3C und D).

Die Verfügbarkeit eines Antikörpers gegen Cre ermöglicht es, durch Doppelfärbungen die Cre exprimierenden Neurone näher zu charakterisieren. In unseren Händen war es möglich, Cre-Immunreaktivität mit einem bisher oft verwendeten Antiserum gegen Cre (BAbCo; 1:2000) und einem monoklonalen Antikörper von Chemicon (1:500) in Gewebeschnitten nachzuweisen (Abb. 3 2 4). Der monoklonale Antikörper 7.23 (BAbCo) und das polyklonale Serum von Novagen lieferten keine befriedigenden Ergebnisse.

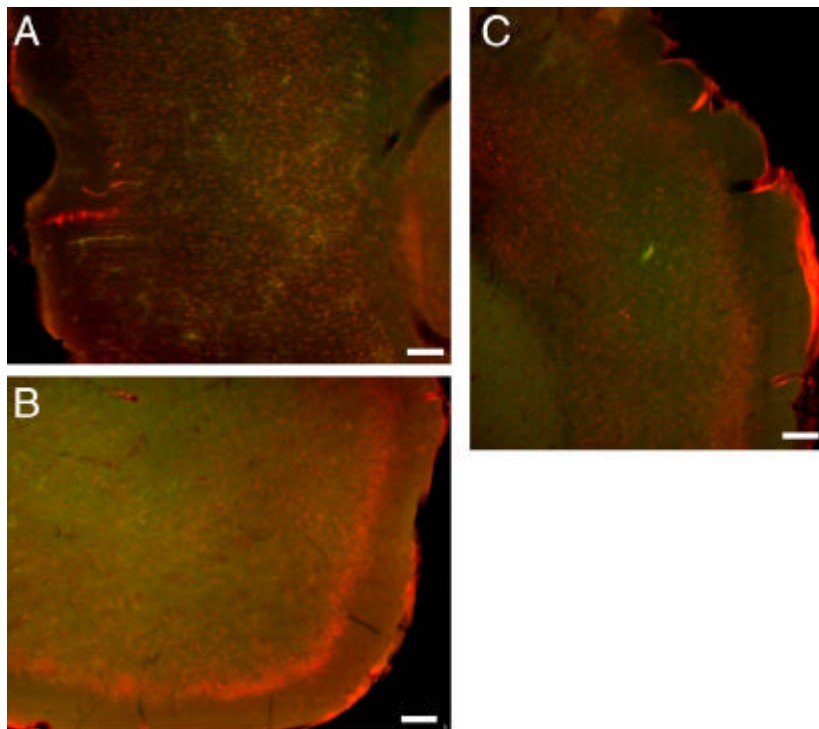


Abbildung 3.2.4: Immunfluoreszenz zur Charakterisierung der Expression von Cre im cerebralen Cortex. (A) Entorhinaler Cortex auf der Höhe des Striatum. (B) Piriformer Cortex. (C) Übergang zwischen primärem sensorischen Cortex (S1) und auditorischem Cortex. Chemicon mAb 1:500. Maßstab 100 µm.

Bei der Doppelfärbung gegen Cre (monoklonal) und Parvalbumin (polyklonal) findet man,

daß beide Färbungen praktisch nicht überlappen. Das heißt, daß der weitaus größte Teil von Interneuronen Cre nicht exprimiert. Entsprechend des Expressionsmusters im Cortex (Abb. 3.2.2A-D, G) erscheint es auch viel wahrscheinlicher, daß Cre von den Pyramidenzellen im Cortex exprimiert wird. Man kann also zumindest sagen, daß inhibitorische Neurone nicht von der Cre-vermittelten Genrekombination durch NFL-Cre betroffen sein werden. Man findet Cre Expression nicht nur im Gehirn, sondern auch im Rückenmark (Abb. 3.2.5A und Abb. 3.3.2) und in sensorischen Neuronen der Hinterwurzelganglien (Abb. 3.2.5B).

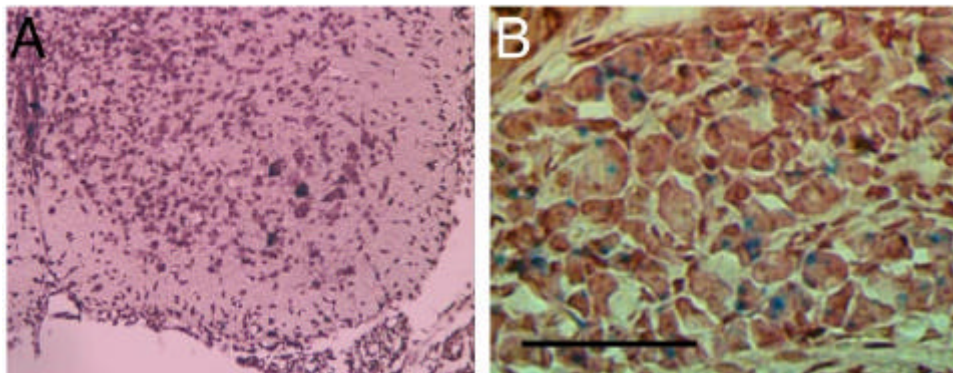


Abbildung 3.2.5: X-Gal Nachweis von β -Galactosidase im Rückenmark und in Hinterwurzelganglien von NFL-Cre; lacZ Reprotermäusen. (A) Man erkennt deutlich die Färbung der Motoneurone im Vorderhorn, während Interneurone nicht gefärbt sind. (B) Sowohl große als auch kleine sensorische Neurone exprimieren Cre Rekombinase. Maßstab 200 μ m.

Die vorliegende Analyse des Expressionsmusters der Cre Rekombinase in NFL-Cre kann nur einen Überblick darstellen. Detailliert ist nur die Analyse von spinalen und cranialen Motoneuronen, besonders im Hinblick auf die Expression während der Entwicklung. Zukünftige Untersuchungen anderer Gehirnregionen oder Transmittersysteme werden eine eigene detailliertere Untersuchung erfordern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu aber die notwendigen Analysemethoden etabliert.

Nicht von allen Gehirnregionen können histologische Bilder gezeigt werden, deshalb sind in Tabelle 3.2.1 alle untersuchten Strukturen aufgelistet und ihre Cre Expression vermerkt.

Gehirnstruktur/Kernregion	Cre Expression
Vorderhirn	
Bulbus olfactorius	+
piriformer Cortex	+++
Clastrum	+++
Septum	+
Ammonshorn (Pyramidenzellen)	+++
Gyrus dentatus (Körnerzellen)	-
Gyrus dentatus (Hilus)	++
Amygdala	++
Cerebraler Cortex (Pyramidenzellen)	++ bis +++
Striatum	-
Zwischenhirn	
Thalamus (VPL, VPM)	++
Hypothalamus	-
Locus coeruleus (pers. Mitteilung C.Goridis, Marseille)	-
Nucleus ruber	-
Substantia nigra	-
Hirnstamm	
Brückenkerne	+
Oculomotor Kern	++
Vestibularkerne	-
ventraler Nucleus cochlearis	++
mesenzephaler Trigeminskern	++
Motorkern des Trigemini	+++
Abduzenskern	-
Fazialiskern	+++
Ambiguuskern	++
Hypoglossuskern	+++
Zerebellum	
Purkinjezellen	+
Körnerzellen	-
Rückenmark	
Motorneurone	++
Interneurone	-
Hinterwurzelganglien/Sensorische Neurone	++

Tabelle 3.2.1: Zusammenfassung der Expression von Cre im Gehirn und Rückenmark. (-) keine Expression. (+) schwache Expression < 30%; (++) Expression bis 60%; (+++) starke Expression >60% der Zellen innerhalb einer Struktur.

3.3 Die Rolle von Stat3 für das Überleben von Motoneuronen

3.3.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Die Mitglieder der CNTF/LIF/Cardiotrophin Genfamilie sind potente Überlebensfaktoren für embryonale und lädierte Motoneurone sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese Faktoren binden an Rezeptorkomplexe, die gp130 und LIFR als signaltransduzierende Komponenten enthalten. Im Gegensatz zu den Rezeptoren für andere neurotrophe Faktoren, führt die Aktivierung von gp130 und LIFR zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3. Es war aber zu Beginn dieser Arbeiten unklar, ob die Aktivierung von Stat3 für den Überlebens-effekt der neuropoietischen Zytokine notwendig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde Stat3 in Motoneuronen mit Hilfe des Cre/loxP Systems konditional inaktiviert. Stat3 ist nicht für das Überleben embryonaler Motoneurone essentiell, obwohl man *in vitro* eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve für CNTF findet. *In vivo* hingegen kann kein erhöhter Zelltod von Motoneuronen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, kommt es bei adulten Tieren mit Inaktivierung von Stat3 in Motoneuronen zu einem erhöhten Zelltod nach Fazialisläsion. Diese Neurone können wiederum durch die Applikation neurotropher Faktoren, einschließlich CNTF, gerettet werden. Durch semiquantitative RT-PCR kann man zeigen, daß Stat3-regulierte Gene, deren Expression nach Nervenläsion induziert wird, in Neuronen mit Inaktivierung von Stat3 weniger stark exprimiert werden. Zu diesen Genen gehören Reg-2, ein Mitogen für Schwanzzellen, das von regenerierenden Neuronen exprimiert wird, und Bcl-xL, ein Gen, welches direkt in die Apoptoseregulation eingreift. Diese Daten zeigen, daß Stat3 Aktivierung eine essentielle Rolle für das Überleben nach Läsion von postnatalen Motoneuronen spielt, aber nicht während der Embryonalentwicklung. Das bedeutet, daß die Signalwege ein und desselben neurotrophen Faktors sich während der Entwicklung verändern können.

3.3.2 Inaktivierung von Stat3 in Motoneuronen

Für diese Untersuchungen konnten wir unsere NFL-Cre Mäuse verwenden, die Cre Rekombinase in spinalen und cranialen Motoneuronen exprimieren (Abschnitt 3.2). Mäuse, bei denen das Stat3 Allel loxP-flankiert ist (floxed Stat3), wurden von Dr. Akira, Osaka, freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Takeda et al., 1998). Bei diesen Mäusen ist das Exon 21 durch loxP-Erkennungsstellen flankiert. Diese genomische Region kodiert für einen Teil der

funktionell wichtigen SH2-Domäne und die Tyrosin-Phosphorylierungsstelle Y705. Durch einen unbekanntem Mechanismus kommt es nach Entfernung von Exon 21 zur Benutzung einer kryptischen Splicing Akzeptorstelle und damit zu einem Verlust eines Teiles von Exon 22 in der mRNA, die die zweite regulatorische Phosphorylierungsstelle, S727, enthält. Das resultierende Protein ist daher nicht mehr funktionsfähig (Takeda et al., 1998). Bei der Verkreuzung von NFL-Cre und floxed Stat3 Mäusen war es wichtig, ein Kreuzungsschema anzuwenden, das eine brauchbare Ausbeute an Tieren mit dem gewünschten Phänotyp ermöglicht. Dazu wurden zwei Linien Stat3 transgener Linien unterhalten: Die erste Linie wurde homozygot für floxed Stat3 gehalten ($Stat3^{flox/flox}$), während die andere Linie heterozygot für Stat3 ($Stat3^{KO/wt}$) auf einem NFL-Cre Hintergrund gezüchtet wurde. Aus der homozygoten floxed Stat3 Linie wurden jeweils die Weibchen mit Männchen aus der zweiten Linie verpaart, die homozygot für NFL-Cre und heterozygot für Stat3 waren (Abb.3.3.1).

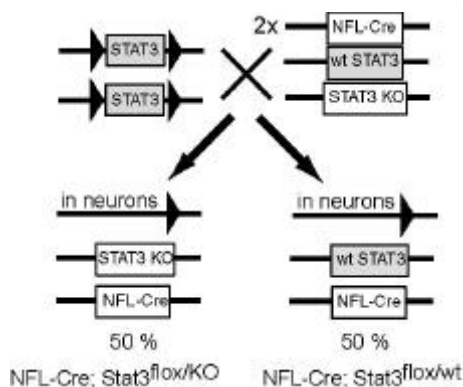


Abbildung 3.3.1: Verkreuzungsschema für NFL-Cre und floxed Stat3 Linien. Eine Linie wurde homozygot für das loxP flankierte Stat3 Allel gehalten und Weibchen aus dieser Linie mit einem Männchen verkreuzt, welches homozygot für NFL-Cre und heterozygot for Stat3 war. Man erhält so den gewünschten Genotyp und entsprechende Kontrollen jeweils zu 50 % (aus Schweizer et al., 2002).

Dieses Schema hat den Vorteil, daß man zu 50 % Tiere mit neuron-spezifischer Inaktivierung von STAT3 ($NFL-Cre; Stat3^{flox/KO}$) erhält und die restlichen Tiere ($NFL-Cre; Stat3^{flox/wt}$) als Kontrollen dienen. Beide Linien wurden auf CD-1 genetischem Hintergrund gehalten und regelmäßig rückgekreuzt.

Es stellte sich die Frage, ob die Cre Rekombinase schon früh genug in embryonalen Motoneuronen exprimiert wird, daß man die Rolle von Stat3 für das neuronale Überleben während der Phase des natürlichen Zelltodes von Motoneuronen untersuchen kann. Dazu wurden NFL-Cre transgene Embryonen der AlacZR Reportermaus E13 fixiert und mit X-Gal gefärbt. Wie man in Abbildung 3.3.2A sehen kann, ist zu diesem Zeitpunkt schon ein großer Teil der Motoneurone X-Gal positiv, hat also das lacZ Reporter gen durch Cre-vermittelte Rekombination aktiviert. Als nächstes wurden E12 Motoneurone von NFL-Cre; floxed Stat3 Embryo-

onen isoliert. Die Motoneuronen wurden über Nacht in Gegenwart von GDNF kultiviert, um ihnen Zeit zur erneuten Genexpression zu geben. Danach wurde Gesamt-RNA von den Motoneuronen von individuellen Embryonen präpariert, revers transkribiert und mit RT-PCR analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Cre Rekombinase schon E12 exprimiert wird und Stat3 schon teilweise inaktiviert ist (Anwesenheit des verkürzten Transkriptes und Reduktion des Wildtyp Transkriptes; Abb. 3.3.2B).

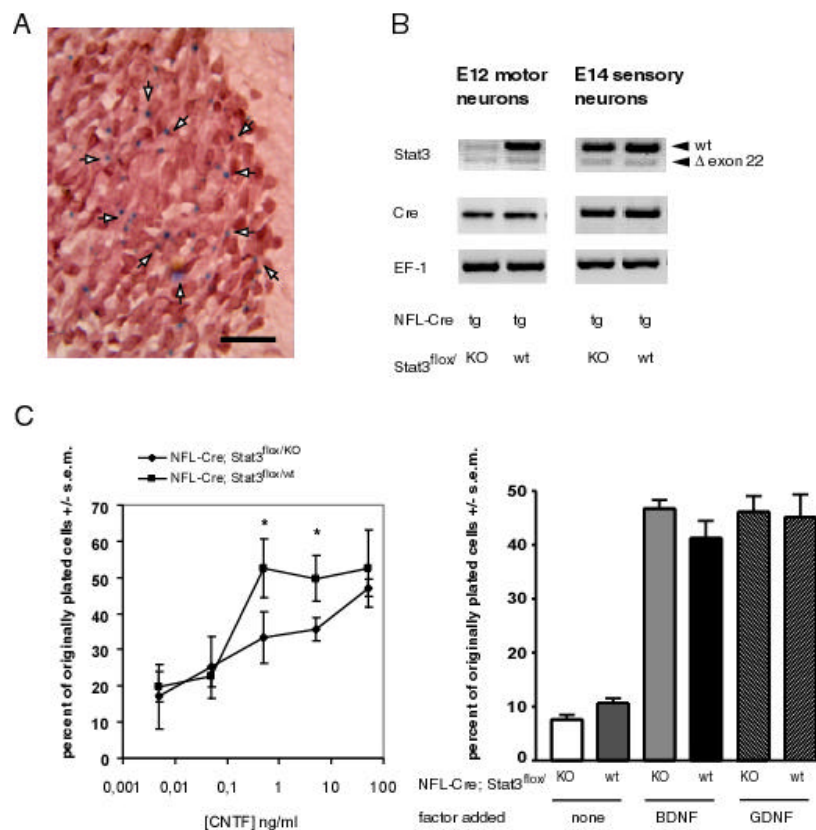


Abbildung 3.3.2: Spinale Motoneurone hängen nicht von der Expression von Stat3 während der Phase des natürlichen Zelltods ab. (A) Embryonale Motoneurone exprimieren Cre unter der Kontrolle des humanen NF-L Promotors. E13 Embryonen von NFL-Cre; lacZ Mäusen wurden mit X-Gal gefärbt. Ein Schnitt durch das lumbale Rückenmark zeigt X-Gal positive Neurone (blau, Pfeile) nur in den ventrolateralen Motorsäulen. (B) RT-PCR zeigt die Gegenwart des rekombinierten, verkürzten Stat3 Transkriptes, welchem Exon 22 fehlt, schon ab E12. (C) Embryonale Motoneurone von NFL-Cre; Stat3^{fl/wt} Tieren benötigen höhere Dosen CNTF zum maximalen Überleben in vitro. Ihr Überleben in Gegenwart von BDNF oder GDNF ist nicht beeinträchtigt. Maßstab 200 µm. (aus Schweizer et al., 2002).

3.2.3 Stat3 ist nicht essentiell für spinale Motoneurone während der Zeit des embryonalen Zelltods

Wenn man E14 embryonale Motoneurone von NFL-Cre; floxed Stat3 Mäuse isoliert, findet man keinen signifikanten Unterschied in der Ausbeute von lumbalen Motoneuronen zwischen NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} und NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Tieren. Diese Motoneuronen wurden 6 Tage lang in der Gegenwart von BDNF, GDNF oder CNTF kultiviert. Motoneurone von NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Embryonen zeigten keine Veränderung in ihrer Überlebensrate in Gegenwart von BDNF oder GDNF (Abbildung 3.3.2C). Im Gegensatz dazu zeigten Motoneurone von NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Embryonen eine verschobene und flachere Dosis-Wirkungskurve für ihr Überleben in Gegenwart von CNTF. Diese Motoneurone benötigen eine höhere CNTF Konzentration für ihr Überleben – dabei können alle NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Motoneurone mit CNTF am Leben gehalten werden, allerdings erst bei einer Konzentration von 50 ng/ml (47,1 ± 2,3 % gegen 52,5 ± 10,6 % für NFL-Cre; Stat3^{flox/wt}; Abbildung 3.3.2C). Auch in vivo konnte E19 kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von Motoneuronen im Fazialiskern und im lumbalen Rückenmark zwischen NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} und NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Mäusen gefunden werden. Entsprechend haben wir die Anzahl von Motoneuronen im Fazialiskern von 6 Wochen alten Mäusen bestimmt (Tabelle 3.3.1). Wiederum war keine Reduktion der Anzahl von Motoneuronen feststellbar, was bedeutet, daß in NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen kein erhöhter Zelltod während der Embryonalentwicklung oder der frühen postnatalen Phase feststellbar ist. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse aus den in vitro Untersuchungen, daß Stat3 während der Phase des physiologischen Zelltodes nicht für das Überleben der Motoneurone entscheidend ist.

Tabelle 3.3.1: NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäuse zeigen keinen erhöhten Verlust von Motoneuronen

	NFL-Cre; Stat3 ^{flox/wt}			NFL-Cre; Stat3 ^{flox/KO}		
	Mittelwert	S.E.M.	N	Mittelwert	S.E.M.	N
Fazialismotoneurone (6 Wochen) ¹	2206	88	4	2281	89	4
Fazialismotoneurone (1 Jahr) ¹	2243	100	8	2201	56	6
Lumbale Motoneurone (1 Jahr)	2506	34	3	2184	187	3

¹: Anzahl Motoneurone pro Seite

3.2.4 Mäuse mit neuronspezifischer Inaktivierung von Stat3 zeigen keine Neurodegeneration

Mäuse mit Inaktivierung von Stat3 in Motoneuronen werden entsprechend der nach Mendel erwarteten Frequenz geboren und entwickeln sich normal. Im Gegensatz zu Mäusen mit einer Inaktivierung von Stat3 in vielen Organen und Geweben, die mit dem “balancer-Cre” Mausstamm erzeugt wurden (Alonzi et al., 2001), sind unsere NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäuse lebensfähig, fertil und zeigen keinerlei offensichtlichen Phänotyp. Mit einem Testverfahren, das motorische Störungen erfaßt, konnten ebenfalls keine funktionellen Defizite der NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäuse festgestellt werden (Tabelle 3.3.2). Außerdem wurde auch keine Reduktion der Anzahl von Motoneuronen in einem Jahr alten NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Tieren, weder im Fazialiskern noch im lumbalen Rückenmark, festgestellt (Tabelle 3.3.1).

Tabelle 3.3.2: Ein Jahr alte NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäuse zeigen keinerlei verschlechterte motorische Kontrolle sowie keine verminderte motorische Aktivität

	NFL-Cre; Stat3 ^{flox/wt}			NFL-Cre; Stat3 ^{flox/KO}		
	Mittelwert	S.E.M.	N	Mittelwert	S.E.M.	N
Körpergewicht in g	43,6	2,3	7	44,0	3,1	4
Laufrad (Runden) ¹	16032	4172	7	24650	3347	4
Motorperformance Score ²	19,5	0,41	7	18,3	0,63	4

¹: Runden eines Laufrads innerhalb von 7 Tagen.

²: nicht significant, Mann Whitney U-Test.

3.2.5 Endogenes Stat3 ist für das Überleben von Motoneuronen nach Fazialisläsion notwendig

Es wurde gezeigt, daß Motoneurone nach einer Nervenläsion bei neugeborenen Mäusen durch CNTF am Leben gehalten werden können (Sendtner et al., 1990). Desweiteren zeigte sich durch gezielte Ausschaltung der Gene, daß endogener CNTF und LIF am Überleben von lädierten Motoneuronen in jungen adulten Mäusen beteiligt sind (Sendtner et al., 1996; Sendtner et al., 1997). Entsprechend ist bekannt, daß Stat3 nach Nervenläsion in Motoneuronen phosphoryliert wird und aktiviert bleibt, bis die Regeneration des Axons abgeschlossen ist (Haas et al., 1999; Schwaiger et al., 2000). Deshalb stellte sich die Frage, ob Stat3 vielleicht im Falle der Nervenläsion ein wichtiger Mediator des Überlebenssignals durch

CNTF und LIF sein könnte.

Nach der Durchtrennung des Fazialisnervs in 4 Wochen alten Mäusen (das gleiche Alter wie in den vorangegangenen Experimenten bei CNTF/LIF doppelt defizienten Tieren; Sendtner et al., 1996), trat ein signifikanter Verlust von Motoneuronen von NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen auf, der bei NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Geschwistertieren nicht gefunden wurde (Abbildung 3.3.3). Zwei Wochen nach der Läsion überlebten in den NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen nur 57 ± 6 % der Fazialismotoneurone auf der lädierten Seite (n=6, p <0,001 gegen Kontrollseite). Dieser Verlust entspricht etwa dem, der in CNTF^{KO}/LIF^{KO} Mäusen gefunden wurde (Sendtner et al., 1996).

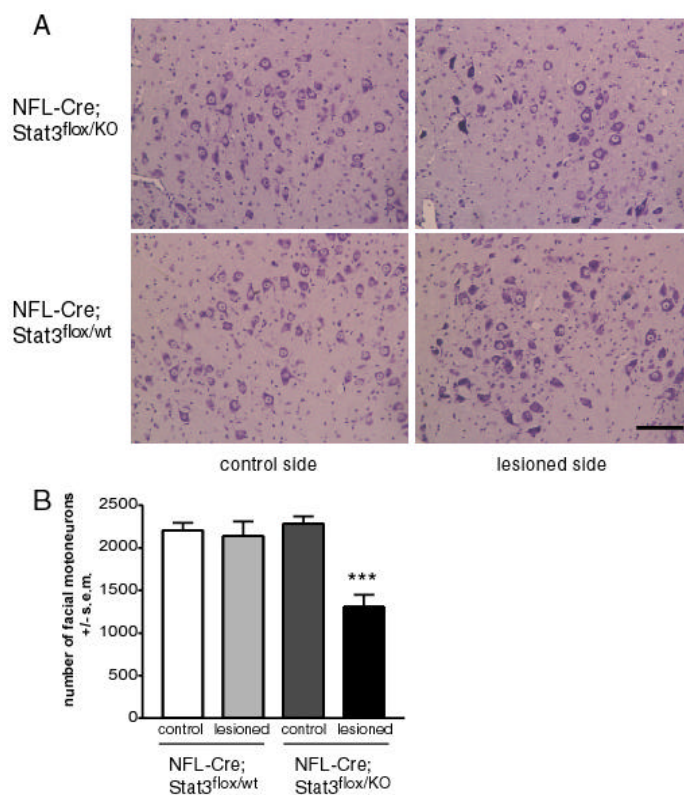


Abbildung 3.3.3: Das Fehlen von funktionalem Stat3 Protein führt zu Axotomie-induziertem Zelltod von Motoneuronen bei der erwachsenen Maus. (A) Cresylviolett-gefärbte Schnitte durch den Fazialiskern zwei Wochen nach der Nervenläsion zeigen den Verlust von Motoneuronen in NFL-Cre;Stat3^{flox/KO} Mäusen auf der Läsionsseite. Die Kontrollseite erscheint völlig unauffällig. (B) Auszählen der Motoneurone in Serienschnitten zeigt einen Verlust von 43 % der Motoneurone auf der lädierten Seite in NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen. (***)p<0.001; ANOVA). Maßstab 100 µm.

3.2.6 Motoneurone ohne funktionelles Stat3 können nach Läsion mit neurotrophen Faktoren gerettet werden

Die Durchtrennung des Fazialisnervs bei neugeborenen Mäusen führt zur Degeneration von mehr als 80 % der entsprechenden Motoneurone. Diese Neurone können aber durch die Applikation neurotropher Faktoren gerettet werden (Sendtner et al., 1990; Sendtner et al., 1992; Henderson et al., 1994). Um herauszufinden, ob die Motoneurone von NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen nach Axotomie generell unfähig sind auf neurotrophe Faktoren zu

reagieren, wurden nach der Fazialisläsion GDNF und BDNF lokal auf den Nervenstumpf appliziert. GDNF war der potenteste neurotrophe Faktor und erhöhte das Überleben der Motoneurone in NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Tieren auf $86 \pm 2 \%$ (n=4, p<0,01 verglichen mit unbehandelter Kontrolle) zwei Wochen nach der Läsion (Abbildung 3.3.4). Die Applikation von BDNF führte zu einer Erhöhung der Anzahl überlebender Neurone von $57 \pm 6 \%$ (n=6) auf $67 \pm 6 \%$ (n=5), die allerdings keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 3.3.4). CNTF wurde ebenfalls auf den proximalen Nervenstumpf in NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen appliziert. In diesem Falle kam es ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate der Motoneurone auf $79 \pm 2 \%$ (n=4, p<0,01 gegenüber unbehandelter Kontrolle). Das bedeutet, daß CNTF auch in Abwesenheit der Stat3 Signaltransduktion einen Überlebenseffekt bei lädierten Motoneuronen besitzt.

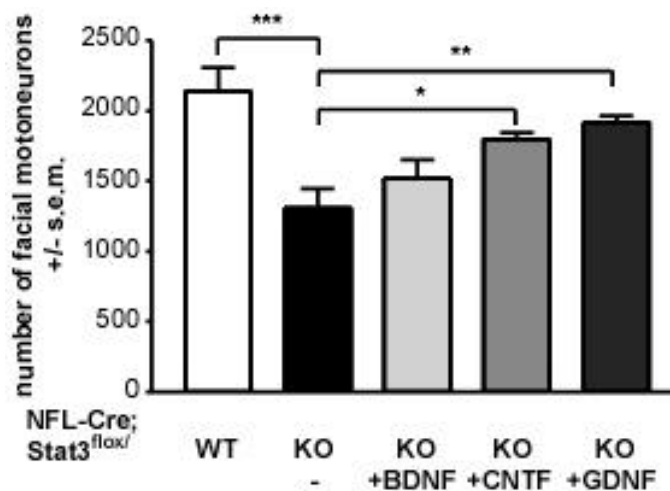


Abbildung 3.3.4: Axotomierte Motoneurone von NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen können durch Applikation von neurotrophen Faktoren am Leben gehalten werden. CNTF und GDNF waren in der Lage, mehr als die Hälfte der sonst degenerierenden Motoneurone bei lädierten NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen zu retten. der Effekt von BDNF war nicht signifikant. (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ANOVA mit Bonferroni's post-hoc Test. Aus Schweizer et al., 2002).

3.2.7 Die Expression von Reg-2 und Bcl-xL wird Stat3 abhängig in lädierten Motoneuronen induziert

Reg-2 wurde als transkriptionell reguliertes Gen in axotomierten sensorischen Neuronen identifiziert. Es zeigte sich, daß es mitogene Wirkung für Schwanzzellen besitzt (Livesey et al., 1997) und in spinalen Motoneuronen nach CNTF Zugabe exprimiert wird (Nishimune et al., 2000). Reg-2 kann bei isolierten Motoneuronen als Überlebensfaktor in autokriner und parakriner Weise wirken (Nishimune et al., 2000). Der Reg-2 Promotor enthält drei Stat3

Bindestellen und wird Stat3 abhängig aktiviert (Duseti et al., 1995). Die Stat3 Phosphorylierung erreicht ihren Höchstwert zwei Tage nach der Läsion von Fazialismotoneuronen (Schwaiger et al., 2000). Deshalb wurde dieser Zeitpunkt gewählt, um die Expression von Reg-2 im Fazialiskern mit semiquantitativer RT-PCR zu bestimmen. Nach der Fazialisläsion bei NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Mäusen steigt die Menge an Reg-2 mRNA 11,1 ± 4,67-fach im Fazialiskern auf der lädierten Seite. Reg-2 wird also ebenfalls in Fazialisneuronen läsionsabhängig induziert wie auch in spinalen Motoneuronen (Livesey et al., 1997). In den NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen steigt die Reg-2 mRNA Menge nur 3,82 ± 2,6-fach (Mittelwert aus 3 Experimenten). Die Reg-2 mRNA Menge im lädierten Fazialiskern in NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} beträgt nur 34 % der Menge in NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Mäusen (n=4-5, p<0,05; Abbildung 3.3.5A). Offensichtlich ist also die Erhöhung der Reg-2 Expression nach Läsion von Motoneuronen Stat3 abhängig. Um sicherzugehen, daß auch tatsächlich Motoneurone Reg-2 exprimieren und nicht etwa reaktive Astrozyten, wurde eine in-situ Hybridisierung für Reg-2 in Gehirnschnitten durchgeführt (Abbildung 3.3.5B).

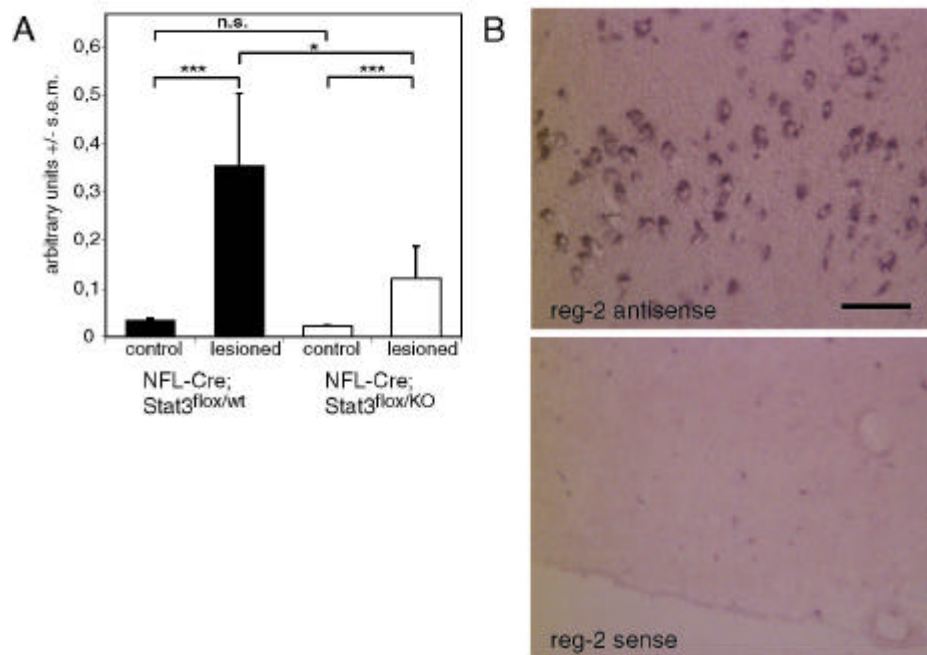


Abbildung 3.3.5: Die Expression von Reg-2 wird in axotomierten Motoneuronen Stat3-abhängig induziert. (A) Semiquantitative RT-PCR mit Gesamt-RNA aus akut isolierten Fazialiskernen zeigte einen Anstieg der Reg-2 Expression nach Fazialisläsion. In NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen erreicht die Reg-2 Expression nur 34 % des Wertes bei NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Geschwistertieren (n=5; ANOVA mit Bonferroni's Test). (B) In situ Hybridisierung offenbart, daß die Expression von Reg-2 auf Motoneurone beschränkt ist. Die untere Abbildung zeigt zum Vergleich die Negativkontrolle mit sense-Sonde. Maßstab 100 µm.(Schweizer et al., 2002).

Man kann annehmen, daß nach der Axotomie eine ganze Reihe von Genen aktiviert wird, von denen vermutlich mehrere Teile von anti-apoptotischen Signalwegen sind. Bcl-xL ist in verschiedenen Regionen des Nervensystems stark exprimiert (Motoyama et al., 1995), unter anderem in Motoneuronen des Fazialiskerns (Hamner et al., 1999; Abbildung 3.3.6B). Mittels semiquantitativer RT-PCR kann man feststellen, daß in NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Mäusen die Expression von Bcl-xL zwei Tage nach der Läsion $8,13 \pm 2,02$ -fach induziert wird. In NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Tieren beträgt die Induktion von Bcl-xL dagegen nur $5,3 \pm 0,46$ -fach (Mittelwerte aus 3 Experimenten). Das bedeutet, daß die Bcl-xL Expression in Motoneuronen mit inaktiviertem Stat3 nur 64 % des Normalwertes beträgt (n=3-4; p<0,05) und Stat3 folglich an der Induktion der Genexpression von Bcl-xL nach Nervenläsion beteiligt ist (Abbildung 3.3.6A).

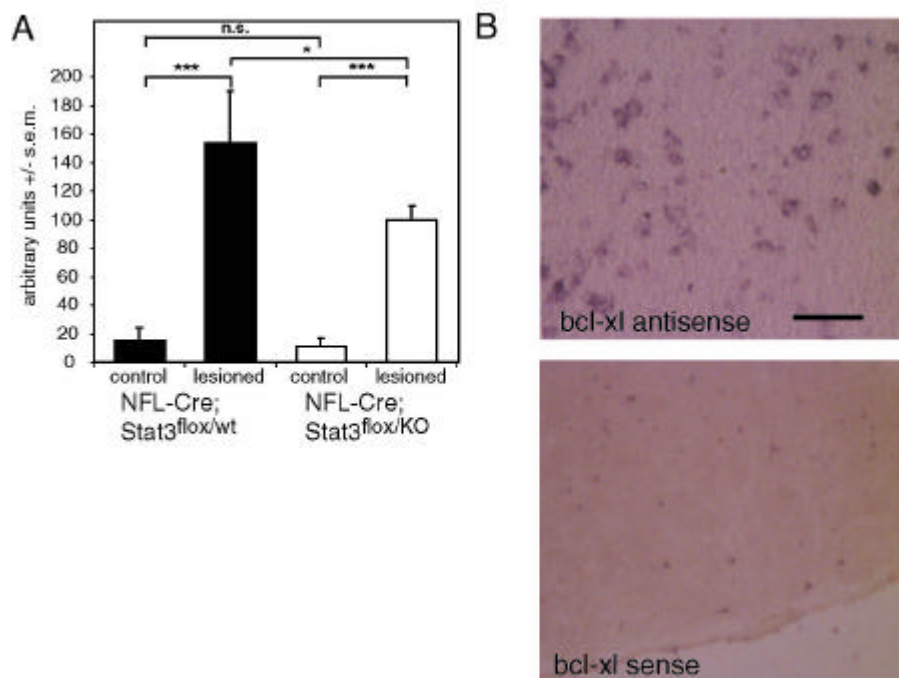


Abbildung 3.3.6: Die Bcl-xL Expression wird in axotomierten Motoneuronen Stat3-abhängig induziert (A) Semiquantitative RT-PCR mit Gesamt-RNA aus akut isolierten Fazialiskernen zeigte einen Anstieg der Bcl-xL Expression nach Fazialisläsion. In NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen erreicht die Bcl-xL Expression nur 65 % des Wertes bei NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Geschwister-tieren (n=5; ANOVA mit Bonferroni's Test). (B) In situ Hybridisierung offenbart, daß die Expression von Bcl-xL auf Motoneurone beschränkt ist. Die untere Abbildung zeigt zum Vergleich die Negativkontrolle mit sense-Sonde. Maßstab 100 µm. (Schweizer et al., 2002).

Im Nervensystem werden noch weitere Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie exprimiert: Bcl-2 und Bcl-W. Aus diesem Grunde wurden auch ihre Transkripte mit RT-PCR quantifiziert, wobei

allerdings keine Induktion nach Läsion sowie keine Abhängigkeit von Stat3 gefunden wurde (Tabelle 3.3.3). Man kann spekulieren, daß die transkriptionelle Aktivierung von anti-apoptotischen Genen der Bcl-2 Familie nur notwendig ist, wenn gleichzeitig eine Aktivierung von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie stattfinden würde, welche antagonisiert werden muß. Aus diesem Grunde wurde die Expression von Bax mittels RT-PCR untersucht. Dabei wurde jedoch keinerlei transkriptionelle Regulation nach Axotomie festgestellt (Tabelle 3.3.3). Es wurde auch versucht, die Expression von anderen pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern zu untersuchen. Harakiri (hrk) wird in PC12 Zellen bei NGF Entzug transkriptionell induziert (Imaizumi et al., 1999). Leider konnte mit den PCR Primern aus dieser Veröffentlichung kein Produkt erhalten werden, weil vermutlich die veröffentlichte Sequenz spezifisch für die Ratte ist. Ein weiterer Kandidat ist Noxa. Dieses Gen wird allerdings p53-abhängig reguliert und ist daher eher für die Induktion der Apoptose nach DNA Schädigung verantwortlich (Huang und Strasser, 2001).

3.2.8 Die Expression von Genen für IAPs wird nicht nach Läsion in Motoneuronen induziert

In embryonalen Neuronen sind die IAP Proteine (Deveraux et al., 1998) essentielle Komponenten der Signaltransduktionswege der neurotrophen Faktoren (Wiese et al., 1999; Wiese et al., 2001). Um zu testen, ob diese Gene in die Regulation des Axotomie-induzierten Zelltods eingreifen, wurde die Expression von IAP-1, IAP-2 und XIAP mittels RT-PCR in Fazialiskernen von NFL-Cre; floxed Stat3 Mäusen nach Fazialisläsion untersucht. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme, also 48 Stunden nach der Fazialisläsion, konnte keine Induktion von IAPs nachgewiesen werden. Es gab auch keinen Unterschied zwischen NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} und NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen (Tabelle 3.3.3).

Tabelle 3.3.3: Zusammenfassung der Genexpressionsprofile für die Bcl-2 und IAP Genfamilien in NFL-Cre; floxed Stat3 Mäusen. Faktor der Änderung der Genexpression im lädierten Fazialiskern im Vergleich zur Kontrollseite mit S.E.M.

	NFL-Cre; Stat3 ^{flox/wt}	NFL-Cre; Stat3 ^{flox/KO}
Bcl-2	1,0 ± 0,30	0,75 ± 0,45
Bcl-w	1,1 ± 0,34	1,1 ± 0,32
Bax	1,0 ± 0,09	1,0 ± 0,10
IAP-1	1,0 ± 0,24	1,2 ± 0,34
IAP-2	1,2 ± 0,34	1,5 ± 0,38
XIAP	0,9 ± 0,16	1,5 ± 0,20

3.2.9 Mäuse mit Inaktivierung des Stat3 Gens in Neuronen erleiden größere Infarkte im Ischämiemodell als Mäuse mit funktionellem Stat3

Aus den oben beschriebenen Experimenten könnte man schließen, daß Stat3 besonders für eine Form der Streßantwort bei Neuronen für das Überleben wichtig ist. Deshalb sollte getestet werden, ob Stat3 generell als positiver Regulator des neuronalen Überlebens unter pathophysiologischen Umständen eine Rolle spielt. Neben der Axotomie bei Nervenverletzung ist die transiente Ischämie klinisch von hoher Relevanz. NFL-Cre; floxed Stat3 Mäuse wurden deshalb in Zusammenarbeit mit Dr. A. Meisel, am Institut für Experimentelle Neurologie, Prof. Dirnagl, Humboldt Universität Berlin, in einem transienten Ischämiemodell untersucht. Dabei wird unter Narkose ein Filament in eine Halsarterie eingeführt und in Richtung Kopf vorgeschoben, um die Arterie Cerebri media durch das Filament transient zu verschließen. Dabei kommt es zu einem Infarkt im Bereich des Striatums und angrenzenden Cortex, ganz ähnlich der Situation beim Menschen bei den häufigen Infarkten im Bereich der Capsula interna. Im Standardmodell verstarben 80 % der NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Tiere, im Gegensatz zu keinem der NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Tiere. Um die Infarktgröße bestimmen zu können, mußte deshalb ein milderes experimentelles Paradigma gewählt werden. In diesem Paradigma ist bei NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Tieren der Infarkt tatsächlich signifikant größer als bei Kontrollen mit Stat3 in Neuronen (93 mm³ vs. 65 mm³; p=0,001 Student's t-Test; Abb. 3.3.7).

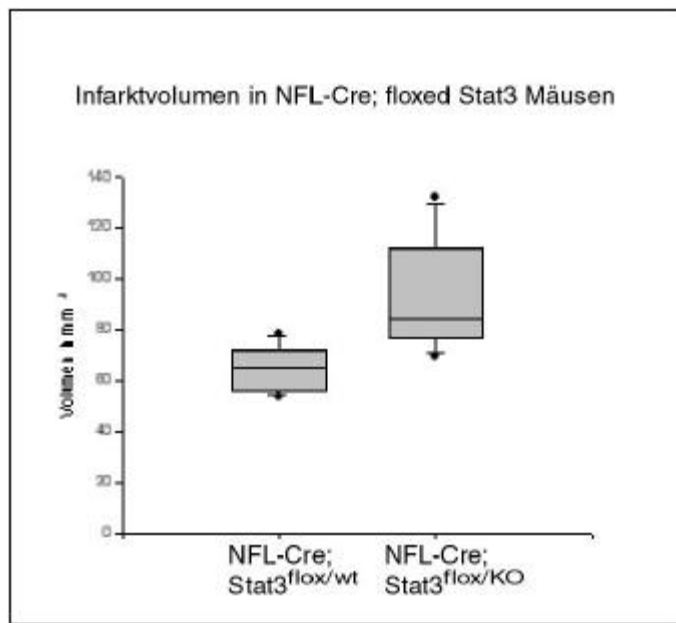


Abbildung 3.3.7: Infarkt volumen in NFL-Cre; Stat3 Mäusen. Die Infarkte sind in NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Mäusen (rechts) erheblich größer als in NFL-Cre; Stat3^{flox/wt} Mäusen (links). Dargestellt sind jeweils der Median und der Bereich zwischen dem 25% und 75% Perzentil im Kasten. Punkte repräsentieren jeweils die größten und kleinsten Einzelwerte. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Meisel, Experimentelle Neurologie, Humboldt Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Experimente zur Untersuchung der Genexpression im Infarktgewebe und in der ischämischen Penumbra, z.B. von Bcl-xL, in diesen Tieren sind im Moment noch nicht abgeschlossen.

3.2.10 Spielt Stat3 auch bei der genetisch bedingten Neurodegeneration eine Rolle ?

Es wird im Moment noch in einem weiteren Paradigma der Neurodegeneration die Rolle von Stat3 untersucht. Wir haben Mäuse, die als Transgen ein menschliches SOD1 Gen tragen, das in familiärer ALS auftritt (SOD1^{G93A}), mit NFL-Cre; floxed Stat3 Mäusen verkreuzt. Wir wissen aus der Arbeit von Dr. Ralf Giess in unserer Gruppe, daß Mäuse mit dieser SOD1 Mutation früher an einer Motoneurondegeneration erkranken, wenn bei ihnen das CNTF Gen ausgeschaltet wurde (Giess et al., 2002). Es stellte sich also die Frage, ob Stat3 an der CNTF-vermittelten Verzögerung des Krankheitsverlaufs beteiligt ist. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Überlebenseffekt von CNTF in diesem Modell tatsächlich auf Stat3 zurückzuführen sein könnte. Während in hSOD1^{G93A} transgenen Mäusen die Krankheit im Alter von $37,08 \pm 2,08$ Wochen auftritt, bewirkt die genetische Inaktivierung von CNTF in hSOD1^{G93A} transgenen Mäusen einen früheren Beginn der Krankheit ($26,72 \pm 3,36$ Wochen). Die ersten 50 % der NFL-Cre; Stat3^{flox/KO}; hSOD1^{G93A} transgenen Mäuse starben innerhalb von 224 Tagen (32 Wochen; Abbildung 3.3.8).

Dieses Ergebnis ist mit der Hypothese vereinbar, daß der CNTF-vermittelte Überlebenseffekt in diesem Krankheitsmodell auf der Stat3 abhängigen Aktivierung eines besonderen

Genexpressionsprogramms beruht. Sicherlich sind mehr Experimente nötig, um diese Arbeitshypothese weiter zu untermauern.

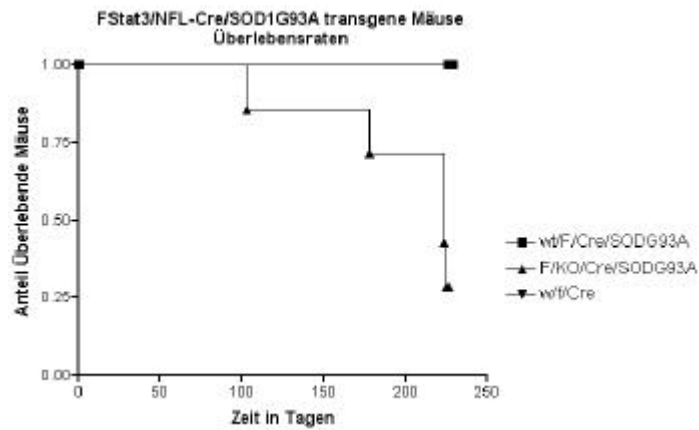


Abbildung 3.3.8: Die Lebenszeit von NFL-Cre; Stat3^{flox/KO}; hSOD1^{G93A} transgenen Mäusen ist signifikant verkürzt. Vorläufiges Ergebnis, n=6 für jeden Genotyp.

3.4 Gerichtete Mutagenese des LIF-Rezeptor Gens in ES-Zellen

3.4.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Zielsetzung war es, durch gerichtete Mutagenese in der Keimbahn der Maus gezielt einzelne Signalwege, die am LIFR beginnen, auszuschalten, um ihre jeweilige Rolle für das Überleben und die Regeneration von Motoneuronen zu untersuchen. Durch Substitution von Tyrosin durch Phenylalanin sollte die Phosphorylierung von SH2-Bindestellen für SHP-2 (YIDV) und STAT3 (YQPQ, YKPY, YRPQ) im LIFR ausgeschaltet werden. Dazu wurde zuerst ein Bereich des Gens für den LIFR der Maus kloniert. Nach Einführung von gezielten Punktmutationen wurden Targeting-Vektoren für die Hit&Run Methode kloniert und elektroporiert. Die Integration (“Hit”) der entsprechenden Konstrukte verlief mit hoher Ausbeute. Leider wurden bei der anschließenden Reversion (“Run”) zwar viele Revertanten gefunden, diese hatten jedoch alle zum Wildtyp revertiert. An dieser Stelle war unklar, ob es sich um ein technisches Problem handelte oder ob die Mutanten in embryonalen Stammzellen einen dominant negativen Effekt hatten. Deshalb wurde ein alternativer “knock-in” Ansatz mit konventionellen Replacement-Vektoren verfolgt. Diese Vektoren wurden in embryonale Stammzellen elektroporiert. Das Screening auf die gewünschten Rekombinanten dauert noch an. Dieselben Mutationen wurden auch in die cDNA für den LIF-Rezeptor eingeführt und diese in verschiedene bicistronische Expressionsvektoren kloniert, um die Voraussetzung zu schaffen, bei Bedarf neurale Stammzellen von LIFR^{-/-} Embryonen zu transfizieren.

3.4.2 Einführung der Punktmutationen mit der Hit&Run Methode

Für die gezielte Einführung von Punktmutationen in das Genom der Maus stehen mehrere Methoden zur Verfügung: Hit&Run (Hasty et al., 1991), Tag&Exchange (Askew et al., 1993) und “knock-in” Methoden mit cDNA oder genomischen Fragmenten entsprechend der klassischen “knock-out” Strategie (Thomas und Capecchi, 1987). Alle diese Methoden besitzen spezifische Vor- und Nachteile. Der besondere Vorteil der Hit&Run Methode liegt darin, daß es außer der gewünschten Punktmutation zu keinen weiteren Veränderungen im Genom kommt, sodaß man keine Beeinträchtigung der Genregulation durch “übrig gebliebene” DNA zu befürchten muß. Aus diesem Grund wurde diese Methode verfolgt, obwohl erst relativ wenige mutierte Mauslinien damit erzeugt wurden. Ein weiterer Vorteil der Hit&Run Methode ist die Verwendung eines Integrationsvektors, die eine hohe Ausbeute an transgenen Klonen erwarten läßt (Abb. 3.4.1).

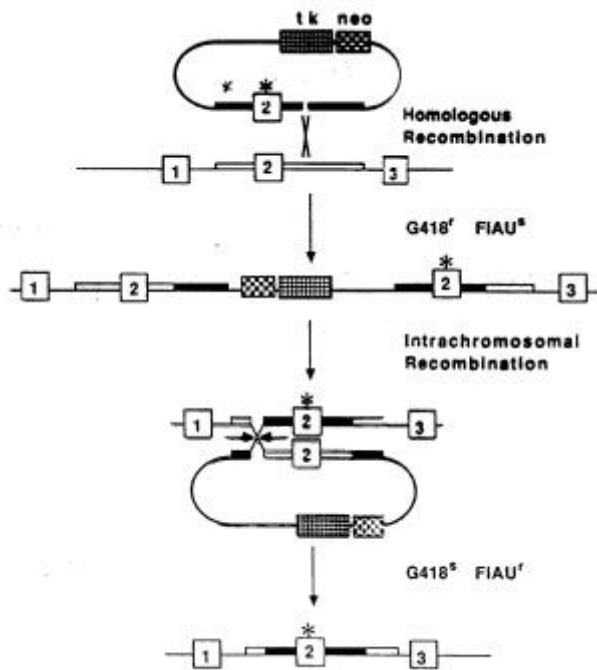


Abbildung 3.4.1: Das Prinzip der Hit&Run Methode aus Hasty et al., 1991. Ein Integrationsvektor wird innerhalb des homologen Bereichs linearisiert, um eine einfache homologe Rekombination zu erzwingen. Dabei kommt es zu einer Verdopplung des homologen Bereiches. Transgene Klone werden durch positive Selektion angereichert. Bei der intrachromosomalen Rekombination wird die Verdopplung des Allels wieder aufgelöst. Die revertierten Klone werden durch negative Selektion angereichert. Bei der Reversion kommt es mit gleicher Wahrscheinlichkeit zum Verlust des mutierten Allels oder des Wildtypallels.

3.4.2.1 Klonierung eines Teils des Gens für den LIF-Rezeptor

Grundvoraussetzung für den Bau eines Hit&Run Vektors ist ein Stück genomischer DNA des LIF-Rezeptors der Maus. Wir erhielten einen λ -Klon (λ M2) von Dr. Ian Chambers (Centre for Genome Research, Edinburgh; Chambers et al., 1997), der die letzten drei Exone und Introne des Gens für den LIFR enthält. Die anvisierten Mutationen befinden sich alle im letzten Exon (Exon 21). Von diesem Gen war damals aber nur die Exon-Intron Struktur sowie die Sequenz der cDNA bekannt. Aus diesem Grunde wurde nach der Vermehrung des Phagen zuerst eine grobe Restriktionskarte erstellt. Ein PCR Produkt aus Exon 21 (mit den Primern mLIFRe21fwd und mLIFRe21rev) diente als Sonde. Dabei wurden die BamHI Schnittstellen (Chambers et al., 1997) bestätigt. Eine der beiden Schnittstellen liegt in Exon 21, sodaß ausgehend von dieser Information eine vorläufige Restriktionskarte abgeleitet werden konnte. Da ich mich zur Einführung der Punktmutationen für das Altered Sites System von Promega entschieden hatte, war ich bei der Auswahl von Schnittstellen für die Klonierung von genomischen Fragmenten in den pALTER-MAX Vektor beschränkt. Weiterhin sollten die mutierten Fragmente später in pPNT (Tybulewicz et al., 1991) kloniert werden, um den Targeting Vektor zu erhalten. Nach Berücksichtigung dieser Bedingungen entschied ich mich für eine Strategie, in der ein PCR-Fragment mit einer synthetischen EcoRI Schnittstelle 5' und der bekannten BamHI Schnittstelle 3' (im Exon 21) sowie das 4,5 kb BamHI Fragment mit dem Rest von Exon 21 und dem 3'-UTR des Gens in den Mutagenesevektor kloniert werden sollten. Die entsprechenden Mutationen sollten also getrennt in beiden Fragmenten

durchgeführt werden. Danach sollten beide Fragmente in pPNT kombiniert werden. Die Klonierungsstrategie (ohne Mutagenese) ist in Abb. 3.4.2 nochmals schematisch zusammengefaßt.

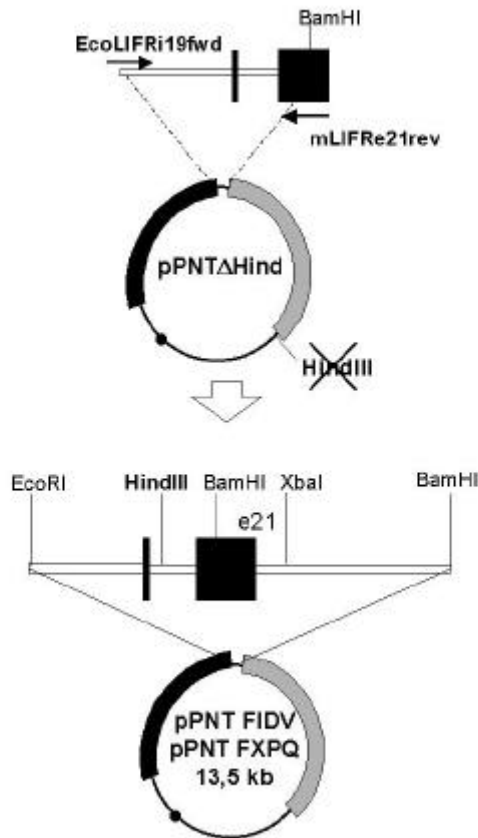


Abbildung 3.4.2: Die Klonierungsstrategie zur Herstellung der Integrationsvektoren zur Einführung von Punktmutationen in das Gen für den LIF-Rezeptor der Maus. Der homologe Bereich enthält nur zwei Exons (e20 und e21). Die Mutationen befinden alle sich in Exon 21 und wurden vorher getrennt in beide Fragmente eingeführt. In Intron 20 befindet sich die diagnostische XhoI Schnittstelle, die durch Mutation aus einer XbaI Schnittstelle hervorgegangen ist. Dort befindet sich auch die einzige HindIII Schnittstelle, an der der Vektor zur Einleitung der homologen Rekombination linearisiert werden kann (siehe unten).

3.4.2.2 PCR-Klonierung eines genomischen 3 kb EcoRI/BamHI Fragmentes mit HF-PCR

Für die PCR Klonierung eines Fragmentes aus dem 5 kb BamHI Fragment, mußte zuerst ausreichende Sequenzinformation beschafft werden. Von Exon 20 und Exon 21 aus wurden deshalb beide Plasmide auf insgesamt 4 kb sequenziert. Daraufhin konnte in Intron 19 ein Primer mit EcoRI Schnittstelle abgeleitet werden (EcoLIFRi19fwd), der zusammen mit einem Primer aus Exon 21 (mLIFRe21rev) zur Vervielfältigung und Klonierung des 3,5 kb Fragmentes eingesetzt wurde. Für diese Reaktion wurde die "Advantage" high-fidelity Taq-Polymerase von Clontech verwendet. Zwei Klone dieser PCR Klonierung sowie der Ausgangsklon (5 kb BamHI Fragment in pBluescript) wurden parallel sequenziert. Beide Klone stimmten in ihrer Sequenz vollständig mit dem Ausgangsklon überein und konnten daher für die Mutagenese verwendet werden. Die Sequenzierung lieferte außerdem zwei potentielle Polyadenylierungsstellen im 3'-UTR.

3.4.2.3 Ortsspezifische Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese wurde mit Oligonukleotiden statt PCR durchgeführt, da diese Methode 1.) die Mutagenese großer genomischer Fragmente erlaubt, 2.) mehrere Mutationen gleichzeitig eingeführt werden können und 3.) keine Punktmutationen durch die Taq-Polymerase zu befürchten sind, welche man durch Sequenzierung ausschließen müßte. Weiterhin konnten mit derselben Methode die gleichen Mutationen in die cDNA eingeführt werden. Neben den Mutationen der SH2-Bindestellen (YIDV zu FIDV für die SHP-2 Bindestelle und YXPQ zu FXPQ für die drei STAT3 Bindestellen) konnte auch eine diagnostische Schnittstelle in Intron 20 eingeführt werden, die die Genotypisierung der transgenen Stammzellen sowie der Mäuse später erleichtern sollte. Zu diesem Zweck wurde die XbaI Schnittstelle in Intron 20 durch zwei Basenpaaraustausche in eine XhoI Schnittstelle umgewandelt. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. In Abbildung 3.4.3 sind repräsentative Sequenzen der entsprechenden Bereiche im LIFR gezeigt.

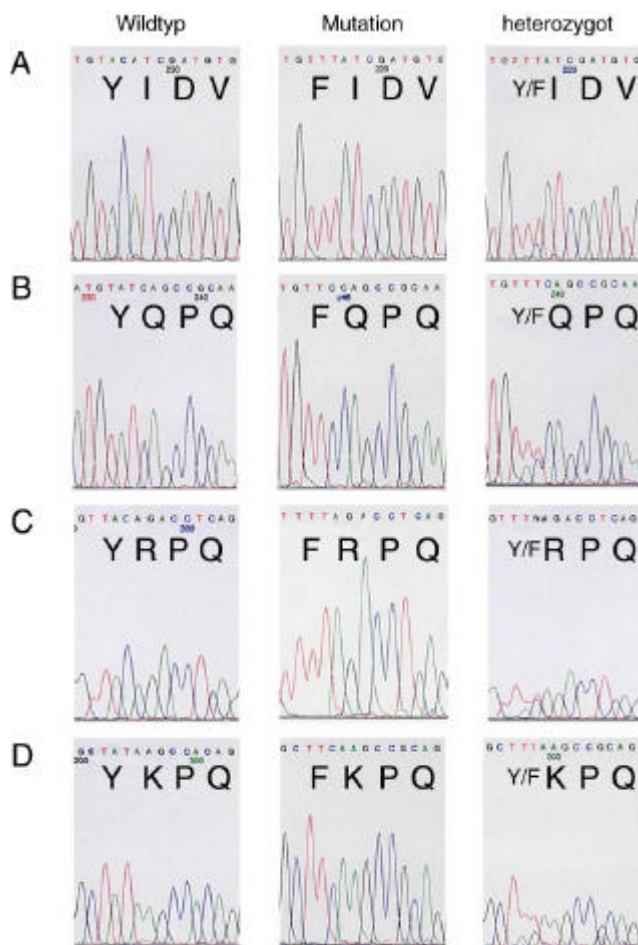


Abbildung 3.4.3: Sequenzen im LIFR. Mit “Wildtyp” ist jeweils die genomische Sequenz des LIFR im Ausgangsklon bezeichnet. Die Sequenzen im entsprechenden Targetingvektor sind mit “Mutation” beschriftet und die Sequenzen der heterozygoten Stammzellen nach der Integration des Vektors mit “heterozygot”. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist ebenfalls angegeben. (A) Mutagenese der SHP-2 Bindestelle YIDV zu FIDV. Das Tyrosincodon TAC wurde in TTC mutiert. (B) Mutagenese der Stat3 Bindestelle YQPQ zu FQPQ. Dabei wurde das Tyrosincodon TAT in TTC mutiert. Es wurden immer zwei Basenpaare ausgetauscht, um die Mutationen leichter detektierbar zu machen. (C) Mutation der Stat3 Bindestelle YRPQ analog zu (B). (D) Mutation der Stat3 Bindestelle YKPK analog zu (B). Ein stiller Basenpaaraustausch im Prolincodon von CCA zu CCG wurde ebenfalls eingeführt, um die Bildung einer Haarnadelstruktur des verwendeten Oligonukleotids zu vermeiden.

3.4.2.4 Zusammenbau des Insertionsvektors

Bevor der Insertionsvektor vollendet werden konnte, mußte eine singuläre Schnittstelle im LIFR Genfragment gefunden werden, an der man den Vektor vor der Elektroporation linearisieren kann. Diese Schnittstelle sollte aber in etwa 1 kb Entfernung von der gewünschten Mutation liegen, um die Wahrscheinlichkeit einer “Heteroduplex-Reparatur” nach “branch-migration” zu minimieren (Hasty et al., 1991). In Intron 20 liegt eine geeignete HindIII Schnittstelle. Allerdings tragen sowohl der Vektor pPNT als auch das 4,5 kb BamHI Fragment je eine HindIII Schnittstelle. Diese Schnittstellen wurden durch Schneiden mit HindIII, Auffüllen und Religation in NheI Schnittstellen umgewandelt. Dazu wurde zuerst die HindIII Schnittstelle aus pBluescript auf dem selben Weg zerstört (pBS Δ Hind). In diesen Vektor wurde dann das 4,5 kb Fragment inkloniert und ebenfalls die HindIII Schnittstelle entfernt. Schließlich konnte das 3 kb EcoRI/BamHI Fragment in pPNT Δ Hind kloniert werden, gefolgt vom 4,5 kb Fragment ohne HindIII Schnittstelle, um die Hit&Run Vektoren pPNT FIDV und pPNT FXPQ zu ergeben.

3.4.2.5 Homologe Integration der Hit&Run Vektoren in das Gen für den LIFR in ES-Zellen

Beide Targetingvektoren (pPNT FIDV und pPNT FXPQ) wurden an der HindIII Schnittstelle linearisiert, jeweils in E14 ES-Zellen elektroporiert und jeweils 480 G418 resistente Klone gepickt. Von diesen wurden jeweils zuerst 288 Klone per PCR auf homologe Integration getestet. Dazu wurden die Primer mLIFRe20fwd und diagnFIDVrev bzw. diagnFRPQrev verwendet, um ein 720 bp Produkt zu erhalten. Die Primer liegen beiderseits der HindIII Schnittstelle – ein Produkt wird nur erwartet, wenn das mutierte Allel durch Rekombination an der richtigen Stelle in das Genom eingefügt wird. Transgene mit Zufallsintegration sollten kein Produkt liefern. Um die richtige Integration zu bestätigen, wurde außerdem das PCR Produkt mit XhoI geschnitten. Wenn die Integration an der richtigen Stelle stattgefunden hat, sollte das Produkt durch XhoI geschnitten werden, da diese Schnittstelle als diagnostische Schnittstelle in Intron 20 eingeführt wurde (s.o.). Schließlich beweist eine Spaltung des PCR Produkts durch HindIII, daß die Rekombination an dieser Stelle auf das Basenpaar genau stattgefunden hat. Für die FIDV Mutation wurden 13 Klone expandiert und für die FXPQ Mutation wurden 16 Klone expandiert. Die Kandidaten wurden per Southern Blot analysiert (Abb. 3.4.4).

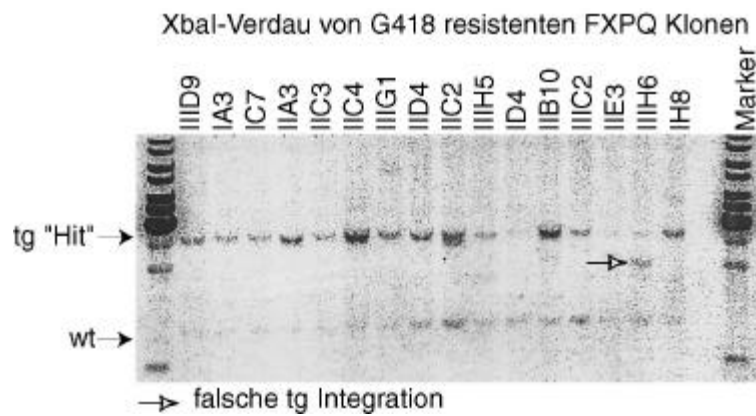


Abbildung 3.4.4: Southern Blot Analyse von Klonen nach der Integration des Hit&Run Vektors. Von 16 Kandidaten nach PCR haben mindestens 11 Klone den Vektor richtig integriert. Bei Verdau mit XbaI erhält man bei homologer Rekombination ein 2,6 kb Fragment und ein 1,3 kb Wildtyp Fragment vom Wildtypallel. Analog erhält man umgekehrt bei Verdau mit XhoI ein neues 10 kb Fragment bei homologer Rekombination (nicht gezeigt). Für die FIDV bzw. FXPQ Mutationen konnten 10 bzw. 11 korrekt integrierte Klone identifiziert werden (Ausbeute ~4 %).

Von diesen ES-Zell Klonen wurde jeweils der Bereich von Exon 21 sequenziert, um die Gegenwart der gewünschten Mutationen zu verifizieren. Alle Klone waren heterozygot für die gewünschten Mutationen, d.h. es ist nicht zu "branch-migration" und "Heteroduplex-Repair" gekommen.

3.4.2.6 Reversion der "Hit"-Klone durch Gegenselektion mit Gancyclovir

Die ES-Zell Klone mit Integration des Targetingvektors tragen das Vektorrückgrat mit Neomycinphosphotransferase und HSV-Thymidinkinase. Durch Gegenselektion mit Gancyclovir kann man spontane Revertanten anreichern, die durch intrachromosomale homologe Rekombination das Vektorrückgrat in Umkehrung der Integration eliminieren. Diese Reversion führt theoretisch bei der Hälfte der Klone zur Retention der Mutation und bei der anderen Hälfte zurück zum Wildtyp (Hasty und Bradley, 1993). Bei der Reversion wurde jeweils ein Klon mit korrekter Integration in Gegenwart von G418 expandiert und dann bei geringer Zelldichte ohne G418, aber in Gegenwart von Gancyclovir mehrere Tage kultiviert, um Revertanten zu selektieren. Gancyclovir resistente Klone wurden dann gepickt und per Southern Blot und Sequenzierung auf Reversion bzw. Retention der Mutation untersucht. Mit Klon IIIIE11 (FIDV) wurden 16 Klone erhalten, von denen 3 Revertanten waren, die allerdings alle die Mutation verloren hatten. Nach Reversion von Klon IID4 (FXPQ) wurden 21 Kandidaten gefunden, von denen 20 echte Revertanten waren, die ebenfalls alle die Mutation verloren hatten und zum Wildtyp revertiert waren.

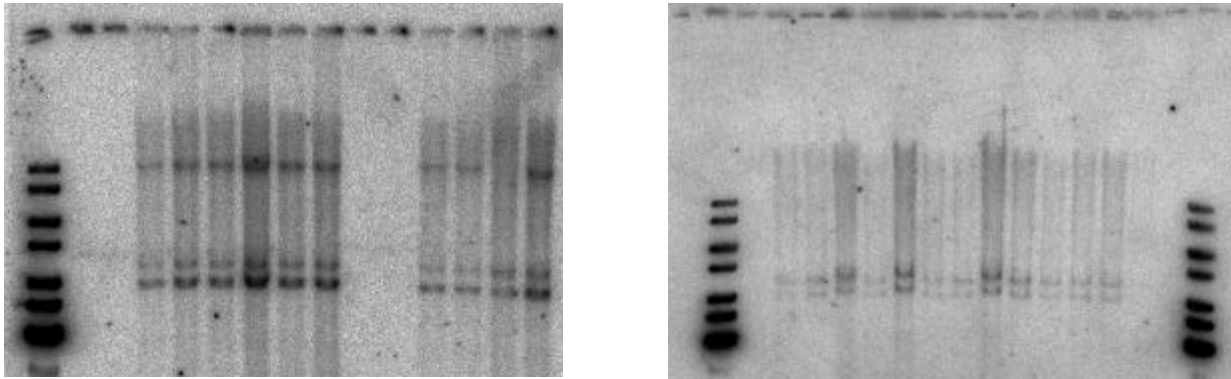


Abbildung 3.4.5: Southern Blots von genomischer DNA aus embryonalen Stammzellklonen nach Reversion. Die DNA wurde mit BamHI geschnitten und die LIFR Fragmente mit der Exon 21 Sonde detektiert. Im Beispiel links sieht man 9 von 10 Klonen nicht revertiert (Vektorbande bei 11 kb; Ausgangsklon III E11). Rechts sind alle Klone tatsächlich revertiert (Banden nur bei 4,0 und 4,5 kb; Ausgangsklon IID4), d.h. sie haben das Vektorrückgrat verloren. Diese Klone stellten sich aber nach Sequenzierung als Wildtypen heraus, hatten also alle das mutierte Allel verloren.

Es stellte sich die Frage, ob das Fehlen von Revertanten mit Mutationen darauf beruht, daß die ES-Zellen in Gegenwart von LIF kultiviert wurden. Es wäre denkbar, daß die Punktmutationen schon als heterozygote Mutationen die LIF Signaltransduktion beeinträchtigen. In den "Hit"-Klonen (die mit LIF gehalten werden können) befinden sich zwei Selektionskassetten, die eventuell das transgene Allel inaktivieren, bis sie durch Reversion entfernt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Reversionsexperimente nochmals in Gegenwart von IL-6/IL-6R α durchgeführt. Diesem Experiment lag die Überlegung zugrunde, daß ES-Zellen auch durch IL-6 im pluripotenten Zustand gehalten werden können, daß IL-6 aber nur gp130 Dimere engagiert und somit nicht durch LIFR Mutationen beeinflusst werden sollte.

Die Reversionsexperimente wurden in Gegenwart von IL-6/IL-6R α mit Klon IIG11 (FIDV) und Klon IID4 (FXPQ) wiederholt. Von zusammen 37 Kandidatenklonen waren 21 korrekt revertiert, aber wiederum hatten alle Revertanten die Mutationen verloren. An dieser Stelle war unklar, ob ein technisches Problem vorlag (Dickinson et al., 2000; Höllrigl et al., 2001) oder die Mutationen im LIFR irgendwie mit der Beibehaltung des Stammzellcharakters der Zellen interferieren. Ein zelllinienabhängiger Heterozygoteneffekt wurde z.B. für die Mutation von Stat3 in ES-Zellen beschrieben (Raz et al., 1999). Diese Fragen klar zu beantworten, mag eventuell sehr zeitaufwendig sein und geht über das Ziel dieses Projektes hinaus. Daher wurde die Strategie geändert, um technische Probleme mit der Hit&Run Methode auszuschließen. Jetzt sollten die Mutationen mit einem Replacementvektor durch doppelt homologe Rekombination in ES-Zellen eingeführt werden. Um die Regulation des LIFR Lokus möglichst wenig zu beeinträchtigen, sollte statt cDNA dieselbe genomische

DNA des LIFR wie für Hit&Run verwendet werden und die notwendige Selektionskassette über Cre/loxP vermittelte Rekombination nach Integration wieder entfernt werden.

3.4.3 Klonierung der Replacement-Vektoren

Die Strategie für den Zusammenbau der Replacement-Vektoren war, in die singuläre HindIII Schnittstelle eine loxP-flankierte Neomycin-Resistenzkassette (floxed-neo) einzufügen, die, wie oben ausgeführt, durch in vitro Cre Expression später entfernt werden kann. Dazu wurde aus den Hit&Run Vektoren ein 2 kb XbaI/BamHI Fragment ausgeschnitten (enthält die FIDV und FQPQ Mutationen) und in pBSΔHind kloniert. Danach wurde das entsprechende 4,5 kb BamHI Fragment (Wildtyp bzw. mit FKPQ und FRPQ Mutationen; mit zerstörter HindIII Schnittstelle, s.o.) dahinter inkloniert und die Orientierung mit durch XbaI Verdau überprüft (2,7 kb und 6,8 kb Fragmente). Die resultierenden Vektoren wurden mit HindIII linearisiert und eine 2,2 kb floxed-neo Kassetten eingeführt. Diese Kassetten war von Dr. Sibylle Jablonka in unserem Labor hergestellt worden und wurde mir freundlicherweise überlassen. Durch BamHI Verdau ließ sich die Orientierung der floxed-neo Kassetten bestimmen und es wurden Klone selektiert, bei denen die Transkriptionsrichtungen von Neomycinphosphotransferase und LIFR entgegengesetzt waren. Dadurch konnte für das PCR Screening der Primer 3'-neo verwendet werden. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.4.6 zusammengefaßt.

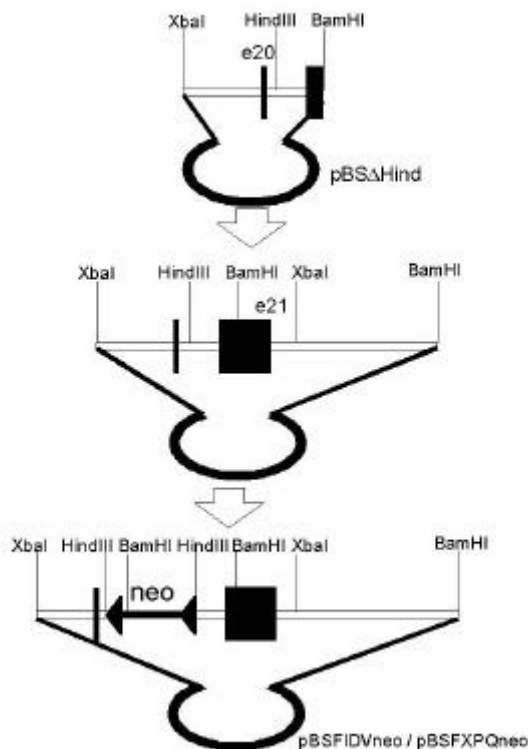


Abbildung 3.4.6: Klonierungsstrategie für die Replacementvektoren zur Einführung von Punktmutationen in das Gen für den LIF-Rezeptor der Maus. Der homologe Bereich enthält nur zwei Exons (e20 und e21). Alle Mutationen befinden sich in Exon 21. Zwischen neo und Exon 21 befindet sich die diagnostische XhoI Schnittstelle, die durch Mutation aus einer XbaI Schnittstelle hervorgegangen ist. Außerdem erlaubt die BamHI Schnittstelle in der neo Kassetten eine Genotypisierung per Southern Blot nach BamHI Verdau von genomischer DNA. Bei Verwendung der Sonde aus Exon 21 erhält man ein 2,2 kb Fragment statt des 5 kb Fragmentes. Das 4,5 kb BamHI Fragment bleibt durch die Mutation unverändert.

Ein weiterer Vektor als Positivkontrolle wurde ebenfalls kloniert, um die Screening PCR optimieren zu können. Für diesen Vektor wurden die EcoRI/BamHI und BamHI Fragmente in pBSΔHind kloniert und die floxed-neo Kasette in die HindIII Schnittstelle eingesetzt. Ein Vektor, bei dem die Transkriptionsrichtungen von Neomycinphosphotransferase und LIFR entgegengesetzt waren, wurde nach diagnostischem Restriktionsverdau mit BamHI ausgewählt. Die Screening PCR wurde mit den Primern EcoLIFRi19fwd und 3'-neo in Gegenwart von genomischer DNA optimiert.

3.4.4 Herstellung von Punktmutanten der LIFR cDNA

Ein Klon der murinen LIFR cDNA in pBSII wurde uns freundlicherweise von Dr. Ian Chambers, Centre for Genome Research, Edinburgh, zur Verfügung gestellt. Aus diesem Vektor konnte man die cDNA mit EcoRI und NotI ausschneiden und in pALTER-MAX umklonieren. Dort wurde die ortsspezifische Mutagenese mit den gleichen Oligonukleotiden durchgeführt wie bei den genomischen Fragmenten. Außerdem wurde die BamHI Schnittstelle in der kodierenden Region durch eine stille Mutation zerstört, um später in der Lage zu sein, nach Transfektion in Wildtypzellen die relative Menge von endogener und mutierter mRNA nach RT-PCR abschätzen zu können.

3.4.5 Umklonierung der LIFR cDNA in bicistronische Expressionsvektoren

Um die Transfektion auf Einzelzellebene verfolgen zu können, wurde der konstante Teil der cDNAs in pIRES2-EGFP (Clontech) mit EcoRI/SacI umkloniert. Der c-terminale Teil mit allen Mutationen wurde als SacI Fragment aus pALTER-MAX ausgeschnitten und in pIRES2-EGFP-LIFR eingefügt. Die Orientierung wurde wiederum durch PCR und Sequenzierung überprüft. Um die Möglichkeit zu erhalten, transfizierte Zellen durch Selektion anzureichern, wurden alle LIFR cDNAs außerdem in pIRES-puro2 (Clontech) umkloniert. Zur Untersuchung der LIFR Signaltransduktion wurden folgende cDNAs von Dr. Ian Chambers zur Verfügung gestellt: SHP-2 (wt, Y>F, C>S); STAT3 (wt, STAT3D, STAT3F). Diese Klone wurden teilweise in die gleichen Expressionsvektoren wie die LIFR Mutanten umkloniert (Tabelle 3.4.1).

Es gibt inzwischen Hinweise, daß Zytokine wie LIF und CNTF nicht nur bei der astrozytären Differenzierung von neuronalen Stammzellen eine Rolle spielen (Johe et al., 1996), sondern auch an der Regulation des Stammzellcharakters beteiligt sind (Shimazaki et al., 2001). Es wäre daher interessant, diese Mutanten zukünftig in neurale Stammzellen von LIFR^{-/-} Tieren

einzubringen, um die den oben genannten Beobachtungen zugrunde liegende Signaltransduktion zu untersuchen.

Tabelle 3.4.1:

pALTER-MAX	pIRES2-EGFP	pIRES-puro2
LIFR: wt	LIFR: wt	LIFR: wt
LIFR: FIDV	LIFR: FIDV	LIFR: FIDV
LIFR: FQPQ; FKQPQ; FRPQ	LIFR: FQPQ; FKQPQ; FRPQ	LIFR: FQPQ; FKQPQ; FRPQ
LIFR: FIDV; FQPQ;FKQPQ;FRPQ	LIFR: FIDV; FQPQ;FKQPQ;FRPQ	LIFR: FIDV; FQPQ;FKQPQ;FRPQ
LIFR:FQPQ;FRPQ	LIFR:FQPQ;FRPQ	LIFR:FQPQ;FRPQ
		SHP-2: wt
		SHP-2: Y>F (DN für Grb2)
		SHP-2: C>S (DN für Enzym)
		STAT3: wt
		STAT3: STAT3D
		STAT3: STAT3F

Diese Konstrukte stehen in den angegebenen Vektoren für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

4. Diskussion

4.1 Inaktivierung des somatischen Cytochrom C Gens in der Maus

4.1.1 Zur Zielsetzung der Arbeit

Die Regulation des programmierten Zelltods während der Entwicklung unterscheidet sich in wenigstens einem Punkt grundlegend zwischen dem Nematoden *C. elegans* und den Säugetieren: In Säugetieren stellt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien einen kritischen Schritt bei der Bildung des Apoptosoms aus Cytochrom C, Caspase 9 und Apaf-1 dar, in dem es zur Autoprozessierung und Aktivierung der Caspase 9 kommt (Kluck et al., 1997; Li et al., 1997a; Li et al., 1997b). Die Relevanz der Cytochrom C Freisetzung beim neuronalen Zelltod konnte durch die Arbeitsgruppe um Eugene Johnson in St. Louis unterstrichen werden, indem gezeigt wurde, daß die Mikroinjektion von Cytochrom C in kultivierte sympathische Neuronen unter bestimmten Umständen dosisabhängig Zelltod induziert (Deshmukh und Johnson, 1998). Nachdem man fand, daß die Wirkung von Bcl-2 und verwandten Proteinen zumindest teilweise auf der Verhinderung der Cytochrom C Freisetzung beruht (Yang et al., 1997; Li et al., 1997a), rückte Cytochrom C ins Zentrum des Interesses an der Regulation der Apoptose.

Wie erwartet, führt die genetische Inaktivierung der anderen beiden Komponenten des Apoptosoms zu einer Reduktion des neuronalen Zelltods und damit zur Hyperplasie des Gehirns von Caspase 9^{-/-} (Kuida et al., 1998) bzw. Apaf-1^{-/-} Mäusen (Yoshida et al., 1998; Cecconi et al., 1998). Interessanterweise ist aber z.B. die apoptotische Elimination des interdigitalen Gewebes bei Caspase 9^{-/-} Embryonen unverändert (Kuida et al., 1998), während bei Apaf-1 defizienten Mäusen dieser apoptotische Vorgang verringert ist (Cecconi et al., 1998). Zusammengenommen bedeutet dies, daß es gewebespezifische Unterschiede bei der Exekution der Apoptose gibt, die noch weiter untersucht werden müssen. Ein weiteres Beispiel in diesem Sinne ist die Fas-induzierte Apoptose, bei der man sogenannte Typ I und Typ II-Zellen unterscheidet, abhängig davon, ob zur Initiation des Zelltods ein mitochondrialer oder ein direkter Weg aktiviert wird (Scaffidi et al., 1998; Nagata, 1999). Inwiefern der physiologische Zelltod z.B. von Motoneuronen abhängig von Cytochrom C ist, war unklar, sodaß wir uns entschlossen, die Rolle von Cytochrom C bei der neuronalen Apoptose in vivo durch die genetische Inaktivierung in der Maus zu untersuchen.

4.1.2 Genetische Inaktivierung in Mäusen zur Erforschung der Apoptose von Nervenzellen

Es herrscht Einigkeit darüber, daß der Mechanismus der Apoptose eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielt. Durch die genetische Deletion von Bax wurde gezeigt, daß Bax sowohl am durch Faktorentzug induzierten Zelltod von sympathischen und Motoneuronen (Deckwerth et al., 1996) als auch am entwicklungsabhängigen Zelltod im Gehirn beteiligt ist (White et al., 1998). Interessanterweise kommt es bei diesen Mäusen jedoch nicht zu der Hyperplasie des Vorderhirns, welche für Caspase 9 und Apaf-1 defiziente Embryonen beschrieben wurde (Kuida et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Bei Caspase 3 defizienten Embryonen kommt es ebenfalls zu einer Hyperplasie des Vorderhirns, die aber stärker ist als bei den beiden vorher beschriebenen Mutanten (Kuida et al., 1996; Kuan et al., 2000). Man nimmt daher an, daß Caspase 3 für einen früheren Schritt der Elimination von Vorläuferzellen im sich entwickelnden Großhirn wichtig ist, bei dem Caspase 9 und Apaf-1 keine Rolle spielen (Kuan et al., 2000). Man geht gerne von einem biochemischen “Weg” der Apoptose aus, bei dem eine klare Abfolge von molekularen Ereignissen zur Ausführung des Zelltodes führt (siehe Einleitung; Abb. 1.1). Entsprechend gibt es Versuche, epistatische genetische Wege für die neuronale Apoptose aufzustellen (Roth et al., 2000). Umso auffälliger ist, daß die verfügbaren Daten aus Genablationsexperimenten dieser Auffassung zumindest teilweise widersprechen: Die genetische Inaktivierung des Bcl-x Gens in der Maus führt zur verstärkten Apoptose von frühen postmitotischen Neuronen im Gehirn (Motoyama et al., 1995), während die gleichzeitige Inaktivierung von Bcl-2 und Bcl-x zum Zelltod der entsprechenden Vorläuferzellen führt (Shindler et al., 1998; Kuan et al., 2000). Die gleichzeitige Elimination von Bcl-x und Bax, dem “Gegenspieler” von Bcl-xL, verhindert zwar den erhöhten Zelltod von frühen postmitotischen Neuronen in Bcl-x defizienten Embryonen, trotzdem kommt es wie oben ausgeführt in Bax defizienten Embryonen nicht zur Hyperplasie des Gehirns (siehe oben; Kuan et al., 2000).

Man kann also festhalten, daß, anders als ein fester “Apoptoseweg” es nahelegen würde, die Phänotypen von Mäusen mit genetischer Inaktivierung von “Apoptosegenen” nicht identisch sind, sondern jedes Gen in jedem Zelltyp und zu jeder Zeit in einem anderen physiologischen Umfeld funktioniert. Das bedeutet, daß es einen allgemeinen “Apoptoseweg” in der selben Form wie bei *C. elegans* bei Säugern nicht gibt.

4.1.3 Genetische Inaktivierung von Cytochrom C

Die Ausführungen oben erklären, weshalb die genetische Inaktivierung von Cytochrom C in der Maus trotz der vorhandenen Daten aus Caspase 9 und Apaf-1 Knockout Mäusen nicht redundant war. Natürlich war uns die entscheidende Rolle von Cytochrom C bei der Oxidativen Phosphorylierung bewußt, sodaß der letztlich von uns und anderen gefundene frühe Entwicklungsdefekt nicht völlig unerwartet kam (Li et al., 2000). Unerfreulicherweise wurde aber die genetische Inaktivierung von Cytochrom C in der Maus von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert, als wir gerade die Linie etabliert hatten (Abb.3.1.5). Die andere Arbeitsgruppe präsentierte neben der hinreichend bekannten Rolle von Cytochrom C bei der Bildung des Apoptosoms nur Daten zur Apoptose, die mit Hilfe einer uncharakterisierten, möglicherweise embryonalen Stammzellen ähnlichen Zelllinie erhalten wurden (Li et al., 2000). Das Ziel der genetischen Manipulation von Mäusen liegt aber darin, die Auswirkungen der Mutation im Organismus oder wenigstens in differenzierten Zellen zu untersuchen. Da wir beobachtet hatten, daß in manchen Geweben die Menge an Cytochrom C in heterozygoten Tieren reduziert ist (Abb.3.1.6), entschieden wir uns, die Auswirkungen der heterozygoten Inaktivierung von Cytochrom C in differenzierten Zellen zu untersuchen. Diesen Experimenten lag die Hypothese zugrunde, daß zur Initiation der Apoptose möglicherweise ein gewisser Schwellenwert von Cytochrom C im Cytosol erreicht werden muß, entsprechend der Beobachtungen von Deshmukh et al. (1998). Man kann in diesem Falle jedoch nicht davon ausgehen, daß bei reduzierter Cytochrom C Gendosis die Ausführung der Apoptose vollständig unterbunden sein kann. Vielmehr war die zu testende Hypothese, daß bei Verringerung der Menge an Cytochrom C das Erreichen dieses Schwellenwertes zeitlich verzögert sein könnte.

Mäuse mit heterozygoter Inaktivierung des Cytochrom C Gens erscheinen äußerlich phänotypisch völlig normal. Das heißt jedoch nicht, daß es im Detail, gerade im Ausmaß oder der Geschwindigkeit der Apoptose keinen Effekt der Cytochrom C Dosisreduktion geben kann. Motoneuronen sind ein etabliertes Modell des physiologischen, embryonalen Zelltods. Aus diesem Grunde wurde die Anzahl von Fazialismotoneuronen in Cytochrom C^{+/+} und ^{+/-} Mäusen am Tage ihrer Geburt bestimmt. Im Falle einer klaren Verzögerung des späten embryonalen Zelltods von Motoneuronen hätte man eine Erhöhung der Anzahl von Motoneuronen erwartet, die jedoch nicht beobachtet wurde. Ein anderes Modell zur Induktion der Apoptose von Motoneuronen in vivo ist die perinatale Fazialisläsion. Dabei gehen mehr als 95 % der lädierten Neurone innerhalb einer Woche unter. Da wir eine Verlangsamung der Apoptose erwarteten, wurden die Tiere schon fünf (statt acht) Tage nach der Läsion

analysiert. Zu diesem Zeitpunkt fanden wir keinen Unterschied zwischen Cytochrom C^{+/-} und ^{+/+} Mäusen (Abb. 3.1.7). Es besteht natürlich die Möglichkeit, zu einem früheren Zeitpunkt, z.B. nach zwei oder drei Tagen die Motoneuronen auszuzählen, um einen eventuellen Unterschied auszumachen. Inzwischen wurde aber gezeigt, daß die genetische Inaktivierung von Caspase 9 und Apaf-1 keinen Einfluß auf den entwicklungsabhängigen Zelltod von Motoneuronen hat (Oppenheim et al., 2001). Es scheint daher eher unwahrscheinlich, daß dann eine Gendosisreduktion von Cytochrom C einen solchen Einfluß hat. Interessant ist allerdings, daß Caspase 9 und Apaf-1, die offensichtlich an der Regulation der Apoptose von embryonalen Neuronen beteiligt sind, den physiologischen Zelltod von Motoneuronen (in entsprechenden Knockout Mäusen) nicht beeinflussen. In diesem Zusammenhang muß man weiterhin bedenken, daß in transgenen Tieren oft das Fehlen eines Gens durch Änderungen der Regulation von anderen Genen kompensiert wird. Gerade im Falle der Caspasen ist inzwischen bekannt, daß bei genetischer Inaktivierung von Caspasen 3 und 9 andere Caspasen, z.B. Caspasen 6 und 7, kompensatorisch hochreguliert werden (Zheng et al., 2000).

Neben der Neurotrophen Hypothese, die besagt, daß zum Beispiel spinale Motoneurone während der Phase des physiologischen Zelltods untergehen, weil sie nicht ausreichend mit neurotrophen Faktoren versorgt werden (um die sie konkurrieren), gibt es die Hypothese, daß der neuronale Zelltod genetisch programmiert ist. Man hat daher spekuliert, daß ein genetisches Programm die Expression von "Todesgenen" wie Fas und Fas-Ligand reguliert, die trotz der Verfügbarkeit neurotropher Faktoren zum Tod von bestimmten Neuronenpopulationen führen (Raoul et al., 1999; Raoul et al., 2000). Tatsächlich kann in etwa 50% von isolierten spinalen Motoneuronen der Maus in Gegenwart von neurotrophen Faktoren durch die Zugabe von Fas-Ligand die Apoptose induziert werden (Raoul et al., 1999). Dieser Anteil entspricht genau dem Anteil von Motoneuronen, die die Phase des physiologischen Zelltods überleben (Raoul et al., 2000). Wir haben den Einfluß der Cytochrom C Gendosis in diesem Modell untersucht und gefunden, daß die Dosis-Wirkungskurve für den Fas-Liganden bei Motoneuronen mit reduzierter Cytochrom C Gendosis verschoben ist (Abb.3.1.8). Das würde bedeuten, daß Motoneurone in Bezug auf Fas-vermittelte Apoptose sogenannte Typ-II Zellen sind (Scaffidi et al., 1998), die den mitochondrialen Signalweg benutzen. Es wurde schon von anderen gezeigt, daß während der Entwicklung des Nervensystems eine vermehrte Expression von Fas und FasL stattfindet (Park et al., 1998; Cheema et al., 1999) ebenso wie nach Ischämie (Matsuyama et al., 1994; Sakurai et al., 1998). Ob der Fas-vermittelte Zelltod eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielt, ist allerdings umstritten, da weder

bei Caspase 8- noch bei Bid-defizienten Mäusen bisher ein Einfluß auf die neuronale Apoptose beschrieben wurde (Kuan et al., 2000).

Bei Caspase 9 defizienten Thymozyten wurde eine Verringerung der Apoptose nach γ -Bestrahlung und Dexametasonbehandlung beobachtet, während die Fas-induzierte Apoptose durch das Transgen unbeeinflusst blieb (Kuida et al., 1998). Bei der induzierten Apoptose von Thymozyten zeigte sich tatsächlich eine Verzögerung des Zelltods (gemessen als Zusammenbruch der Integrität der Zellmembran) bei Cytochrom C^{+/-} Zellen (Abbildungen 3.1.9-11B), während ein früher Marker der Apoptose (der Verlust der Membranasymmetrie) nicht oder kaum durch den Cytochrom C Genotyp beeinflusst war (Abb. 3.1.9-11A). Dieses Ergebnis ist allerdings insofern überraschend, daß man bisher die Rolle von Cytochrom C bei der Apoptose eher bei der Induktion der Apoptose gesehen hat (Reed, 1997). Auch Kuida et al. (1998) beobachteten eine reduzierte der Annexin-V Färbung bei Caspase 9 defizienten Thymozyten, während in unseren Experimenten diese frühe Phase der Apoptose unbeeinflusst von Cytochrom C erscheint und statt dessen die Apoptose bei einem späteren Schritt verzögert ist. Es gibt allerdings aus Untersuchungen zur Aktivierung von Caspasen Ergebnisse, die eine späte, mitochondriale "Verstärkerphase" bei der Exekution der Apoptose nahelegen (Desagher und Martinou, 2000; Chen et al., 2000). Im Lichte dieser Berichte sprechen die vorliegenden Ergebnisse dafür, daß die Freisetzung von Cytochrom C bei der Induktion der Apoptose nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, wohl aber bei der Exekution. In diesem Zusammenhang gewinnen auch bisher schwer einzuordnende Ergebnisse Bedeutung. Sie zeigen, daß z.B. die genetische Inaktivierung des BH-3 only Proteins Bim die Apoptose von axotomierten Neuronen zwar verzögert, aber nicht verhindert (Putchá et al., 2001). Nach allem, was man bisher weiß, ist aber die einzige Aufgabe von BH-3 only Proteinen die Freisetzung von Cytochrom C, die sogar durch Peptide aus der BH-3 Domäne alleine veranlaßt werden kann (Polster et al., 2001). Möglicherweise gibt es parallele Signalwege, die letztlich unabhängig von der Bildung des Apoptosoms zum Zelltod führen (man denke an die hier nicht weiter berücksichtigten (Stress-)Kinasen), bisher aber nicht in das hier besprochene "kanonische" Modell der Apoptose integriert sind.

Die hier präsentierten Ergebnisse weisen den Weg für zukünftige Untersuchungen zur Rolle von Cytochrom C in einer späten Phase des Zelltods. Man kann spekulieren, daß der hier beschriebene Effekt auf einer reduzierten Energieladung der Zellen beruhen könnte (noch nicht gemessen), die die Balance zwischen Apoptose und Nekrose beeinflusst (Nicotera et al., 1999).

4.2 Analyse der Expression von Cre in der NFL-Cre transgenen Maus

4.2.1 NFL-Cre als Werkzeug für die Untersuchung von Genen im Gehirn von Mäusen

In dieser Arbeit wurde die Expression von Cre Rekombinase unter Kontrolle des humanen Neurofilament-L Promotors in transgenen Mäusen untersucht. Diese Vorarbeiten waren Voraussetzung für die Verwendung der NFL-Cre Maus für die konditionale Inaktivierung von Stat3 im Nervensystem von Mäusen (Abschnitte 3.3 und 4.3). Es konnte gezeigt werden, daß die Expression spezifisch für bestimmte Neurone ist. Eine detailliertere Analyse ergab, daß Cre in verschiedenen Strukturen des Gehirns spezifisch exprimiert wird. So findet man zwar Cre-Expression in Purkinjezellen, aber nicht in cerebellären Körnerzellen; in spinalen Motoneuronen, aber nicht in Interneuronen des Rückenmarks; und in hippocampalen und kortikalen Pyramidenzellen, jedoch nicht in Körnerzellen des Gyrus dentatus.

Drei Eigenschaften machen unsere NFL-Cre Maus zu einem wertvollen und bisher einzigartigen Werkzeug für die konditionale Inaktivierung von Genen im Gehirn:

- 1) Die Expression von Cre in spinalen und cranialen Motoneuronen erlaubt die Analyse von Genfunktionen in Motoneuronen *in vivo*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde NFL-Cre zur Analyse der Rolle von Stat3 in Motoneuronen bereits erfolgreich eingesetzt (Abschnitte 3.2 und 3.3; Schweizer et al., 2002).
- 2) Die Expression von Cre in hippocampalen Pyramidenzellen, aber nicht in Körnerzellen im Gyrus dentatus. Diese Eigenschaft wäre für elektrophysiologische Untersuchungen im Hippocampus von besonderem Interesse, da die Funktion eines Gens für die LTP spezifisch auf der postsynaptischen Seite ausgeschaltet werden könnte, während die präsynaptische Seite weiterhin das Gen exprimiert.
- 3) Da Parvalbumin-positive GABAerge Interneurone scheinbar nicht NFL-Cre exprimieren, kann man die Funktion von Genen gezielt in Pyramidenneuronen im Cortex oder Hippocampus untersuchen, ohne eine gleichzeitige Beeinträchtigung von Interneuronen berücksichtigen zu müssen.

4.2.2 Zur Regulation des NFL-Cre Transgens

Der NF-L Promotor wurde aus zweierlei Gründen ausgewählt, um eine neuronspezifische Cre Mauslinie zu etablieren. Zum einen wurde der NF-L Promotor sowohl des Menschen als auch von Nagern ausführlich untersucht (Schlaepfer und Bruce, 1990; Beaudet et al., 1992; Leconte et al., 1994; Charron et al., 1995). Dabei zeigte sich, daß NF-L in praktisch allen Neuronen exprimiert wird, jedoch erst nach der letzten Mitose. Zum zweiten wurde der NF-L Promotor

bereits verwendet, um heterologe Gene in transgenen Mäusen neuronspezifisch zu exprimieren (Leconte et al., 1994; Akassoglou et al., 1997).

Das Expressionsmuster von NFL-Cre entspricht nicht exakt der Expression von NF-L. Gründe dafür mögen sein, daß Transgene, die zufällig ins Genom integrieren, oft unter die Kontrolle von starken Enhancern oder Silencern fallen, die mit der Expression des Transgens interferieren. So kommt es z.B. in einer GFAP-Cre transgenen Maus nicht wie erwartet zur astrozytenspezifischen Cre Expression, sondern zur Expression von Cre in ganz bestimmten neuronalen Subklassen (Kwon et al., 2001). Dieser Effekt ist bereits als "position variegation effect" beschrieben (Opsahl et al., 2002). Verantwortlich hierfür ist die Chromatinstruktur, die wiederum durch DNA-Methyltransferasen wie Su(var)3-9 (suppressor of variegation effect 3-9; Schotta et al., 2002) reguliert wird. Diese methylierungsabhängigen Effekte breiten sich von den Enhancern ausgehend entlang der DNA aus, bis sie durch sogenannte Isolatorelemente ("insulators") gestoppt werden (Filippova et al., 2001; Szabo et al., 2002). Solche Isolarelemente befinden sich oft in den MARs ("matrix attachment regions"), welche die Chromatindomänen im Kern voneinander trennen (Gasser und Laemmli, 1986; Jenuwein et al., 1997). Leider wurde bei der Konstruktion des NFL-Cre Transgens ein 3 kb Fragment vom humanen NF-L Gen entfernt, welches eine MAR enthielt (Charron et al., 1995).

Bei Genen mit neuronspezifischer Expression befinden sich Enhancerelemente häufig innerhalb der Introns (Ingraham und Evans, 1986; Evans und Chen, 1989). Auch beim NF-L Gen fand man regulatorische Sequenzen in den Introns (Beaudet et al., 1992; Hsu et al., 1995). Aus diesem Grunde wurden die Introns des humanen NF-L Gens bei der Konstruktion des NFL-Cre Transgens beibehalten. Allerdings werden diese Introns nicht transkribiert, da sie jenseits des Polyadenylierungssignals liegen. Diese Lage beeinflußt die Funktion der Enhancer jedoch nicht. Allerdings enthält das Cre-Transgen kein exprimiertes Intron, welches für eine effiziente Expression von Säugergenen wichtig ist (Brinster et al., 1988; Palmiter et al., 1991; Maniatis und Reed, 2002). Es ist also durchaus möglich, daß ein Grund für die fehlende (oder nicht detektierbare) Expression von NFL-Cre in manchen Zelltypen schlicht das Fehlen eines gespleißten Introns ist. Alle oben genannten Überlegungen führten kürzlich zur Einführung einer neuen Methode zur Herstellung Cre-transgener Mauslinien. Dabei wird Cre über homologe Rekombination in den gewünschten Lokus auf einem BAC-DNA-Fragment eingeführt (Casanova et al., 2001). Man erwartet, daß das BAC-Transgen mit 150-250 kb Größe über genügend flankierende regulatorische DNA Sequenzen verfügt, um die Regulation der Expression des veränderten Lokus beizubehalten. Dabei umgeht man zudem noch den einzigen Nachteil eines knock-in Ansatzes, bei dem man Cre direkt in den

gewünschten Locus in der Maus einführt, denn beim knock-in wird das betroffene Gen meist selbst inaktiviert.

4.3 Konditionale Inaktivierung von Stat3 in Neuronen

4.3.1 Die Rolle von Stat3 beim neuronalen Überleben

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor Stat3 für das Überleben von axotomierten Motoneuronen essentiell ist, wohingegen der Stat3 Signalweg in embryonalen Motoneuronen während der Zeit des physiologischen Zelltods verzichtbar ist (Schweizer et al., 2002). Das bedeutet, daß derselbe Zelltyp (hier: Motoneuronen) für dieselbe Entscheidung (hier: Apoptose oder nicht) die Signale aus unterschiedlichen Signalwegen unterschiedlich gewichtet, abhängig von seiner Entwicklungsstufe (hier: embryonal oder adult).

Es wurde gezeigt, daß die genetische Inaktivierung von Stat3 in Mäusen nicht zu einem erhöhten Zelltod von Motoneuronen führt (Tabelle 3.3.1). Allerdings war die Dosis-Wirkungskurve für das Überleben von Motoneuronen mit dem Stat3 aktivierenden neurotrophen Faktor CNTF verschoben (Abb. 3.3.2). Dieser Befund deutet darauf hin, daß Stat3 sehr wohl an der Signaltransduktion von CNTF für das neuronale Überleben beteiligt ist, sein Fehlen aber alleine nicht zum Zelltod führt, solange andere Signale weiter verfügbar oder noch verstärkt sind (Verschiebung der Kurve zu höheren CNTF Dosen). Die Natur dieser anderen Signale wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

Nach der Fazialisläsion bei adulten Mäusen sterben die lädierten Motoneurone nicht, sondern versuchen zu regenerieren. Dabei werden an der Läsionsstelle neurotrophe Faktoren freigesetzt, die zum Überleben und zur Regeneration der Nerven beitragen (Fawcett und Keynes 1990). Werden aber die neuropoetischen Zytokine CNTF und LIF gleichzeitig genetisch inaktiviert, so sterben etwa 40 % der lädierten Motoneurone (Sendtner et al., 1996). Dieses Resultat weist darauf hin, daß diese beiden neurotrophen Zytokine für das Überleben der lädierten Motoneurone in vivo notwendig sind. Wie in der Einleitung ausgeführt, unterscheiden sich beide Zytokine von den anderen neurotrophen Faktoren durch die Aktivierung des JAK/Stat Signalweges. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß für diesen Überlebenseffekt vor allem der Transkriptionsfaktor Stat3 verantwortlich ist, denn alleine seine genetische Inaktivierung führt nach Fazialisläsion zum Untergang von etwa 40 % der lädierten Motoneurone (Abb. 3.3.3) trotz Anwesenheit von CNTF und LIF an der Läsionsstelle. Es stellt sich unmittelbar die Frage, welches denn die überlebensnotwendigen Gene sein könnten, die durch Stat3 nach der Läsion exprimiert werden. Wir konnten zeigen, daß

Reg-2 und Bcl-xL nach Läsion Stat3-abhängig induziert werden (Abb. 3.3.5 und 3.3.6). Von beiden Genen ist bekannt, daß sie am Überleben von Motoneuronen beteiligt sind (Parsadian et al., 1998; Nishimune et al., 2000). Natürlich ist es möglich, daß es noch andere, bisher unbekannte Stat3 abhängige Gene gibt, die das Überleben von lädierten Motoneuronen regulieren. Eine ganze Familie offensichtlicher Kandidaten könnten die IAP Proteine sein. Von ihnen weiß man, daß sie in embryonalen Neuronen in Abhängigkeit von neurotrophen Faktoren transkriptionell aktiviert werden (Wiese et al., 1999; Wiese et al., 2001). Es war insofern interessant zu finden, daß die Transkription von IAP-1, IAP-2 und XIAP nicht durch Nervenläsion in Fazialisneuronen induziert wird (Tabelle 3.3.3). Aus einer teleologischen Perspektive ist dies einsichtig, denn es ist bekannt, daß die Expression von IAP Proteinen das Neuritenwachstum hemmt (Gotz et al., 2000). Das Neuritenwachstum sollte aber geradezu die Essenz der Regeneration eines durchtrennten Nervs sein. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die Überexpression von Bcl-2, einem eng verwandten Homologen von Bcl-xL, die Regeneration von retinalen Ganglienzellaxonen in vivo unterstützt (Chen et al., 1997). Aus dieser Sicht ist es also leicht einsichtig, weshalb die Motoneuronen nach einer Axotomie bevorzugt Bcl-xL im Vergleich zu IAPs exprimieren. Kürzlich wurde gefunden, daß es in Neuronen nach Entzug des neurotrophen Faktors sowie nach Nervenläsion zur Expression des pro-apoptotischen Proteins Bim kommt (Putcha et al., 2001). Es ist also durchaus "sinnvoll", wenn es gleichzeitig zur Aktivierung des Bcl-xL Gens kommt, um den Anstieg der Bim Expression abzufangen. Sicherlich ist diese Sichtweise keine Begründung, wohl aber eine brauchbare Erklärung für den Sprachgebrauch (Monod 1971). Im selben Sinne läßt sich auch die Expression von Reg-2 durch Motoneurone nach Axotomie erklären: Reg-2 ist ein Mitogen für Schwanzzellen (Livesey et al., 1997) und ein Überlebensfaktor für Motoneurone (Nishimune et al., 2000). Da nach der Durchtrennung des Axons sein distaler Anteil inklusive seiner Markscheide abstirbt, müssen sich die übrigen Schwanzzellen wieder teilen, um das regenerierende Axon wieder zu umhüllen. Da die Abwesenheit funktionellen Stat3 Proteins auch nach einem Jahr weder zu einem Verlust von Motoneuronen noch zu einer Beeinträchtigung der motorischen Kontrolle führt (Tabelle 3.3.2), muß man annehmen, daß Stat3 für Motoneurone schlicht nicht wichtig ist, solange sie nicht einer Nervenläsion ausgesetzt sind. In diesem Moment aber wird Stat3 unverzichtbar. Man könnte Stat3 also einen Transkriptionsfaktor nennen, der das genetische Überlebens- bzw. Regenerationsprogramm der Motoneuronen aktiviert und CNTF (und LIF) als seine Signalgeber oder "Läsionsfaktoren" (Sendtner et al., 1997). Es sei am Rande bemerkt, daß man Stat3 auch die Fähigkeit der Repression des Fas Gens zuschreibt (Ivanov et al., 2001).

Andere Arbeitsgruppen haben die Aktivierung von Fas als einen Mechanismus der Induktion der Apoptose von Neuronen *in vitro* (Raoul et al., 1999) und *in vivo* (French et al., 1996; Cheema et al., 1999; Martin-Villalba et al., 1999) vorgeschlagen.

4.3.2 Andere Signalwege für das Überleben von Motoneuronen

Schon seit langem ist bekannt, daß Motoneurone wie auch andere Neurone *in vitro* nur auf einem Substrat aus extrazellulären Matrixproteinen (z.B. Laminin) gehalten werden können – unabhängig von der Gegenwart neurotropher Faktoren. Dabei läßt sich ebenso wie für neurotrophe Faktoren eine Dosisabhängigkeit für Laminin finden (Sendtner et al., 1991). Später wurde gezeigt, daß Motoneurone vom Hühnchen allein durch Transfektion mit aktiviertem Ras Protein genauso gut *in vitro* gehalten werden können wie mit Muskelextrakt (Weng et al., 1996). In der Maus konnte durch Inaktivierung der Gene gezeigt werden, daß das Fehlen von B-Raf (aber nicht c-Raf oder A-Raf) sowohl sensorische als auch Motoneurone vollkommen unresponsiv gegenüber neurotrophen Faktoren macht (Wiese et al., 2001). Es stellt sich natürlich die Frage, welches denn die Substrate der B-Raf Kinase sind, die für das Überleben so wichtig sind. Es ist bekannt, daß Raf und Bag-1 interagieren (Wang et al., 1996) und Bcl-2 oder ein anderes Mitglied der Bcl-2 Genfamilie, wie vielleicht Bad, ein B-Raf Substrat sein könnte (S. Wiese und M. Sendtner, unpublizierte Ergebnisse).

Es wurde gezeigt, daß (zumindest in cerebellären Körnerzellen) die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) zur Phosphorylierung von Bad führt (Datta et al., 1997). Diese Phosphorylierung führt zur Interaktion von Phospho-Bad mit cytosolischen 14-3-3 Proteinen und damit zur Inaktivierung des pro-apoptotischen Bad Proteins (Datta et al., 2000). Dieser Signalweg scheint in Motoneuronen jedoch untergeordnet zu sein, da es in der Bad knockout Maus noch immer zum physiologischen Zelltod von Motoneuronen kommt (Kuan et al., 2000; Putcha et al., 2001). Die Aktivierung von PI3-K, einem Aktivator von Akt, ist aber durchaus am Überleben von Motoneuronen beteiligt. So führt z.B. die Inkubation mit dem PI3-K Inhibitor LY294002 oder die Expression von mutierten Proteinen (z.B. DN Ruk), die PI3-K inhibieren, zur Beeinträchtigung des CNTF Überlebenssignals (Nishimune et al., 2000; Alonzi et al., 2001; Dolcet et al., 2001). Stat3 könnte insofern an der Aktivierung von PI3-K beteiligt sein, als Stat3 zur Expression von Reg-2 führt, dessen autokrine Wirkung über PI3-K vermittelt sein soll (Nishimune et al., 2000; Alonzi et al., 2001; Dolcet et al., 2001). Man nimmt an, daß die Aktivierung von NF- κ B durch PI-3K (Romashkova und Makarov 1999) ebenfalls zum neuronalen Überleben beiträgt. So führt die Inaktivierung von NF- κ B durch Expression von I- κ B oder die genetische Inaktivierung von p65 zur Beeinträchtigung des Überlebens-effektes

von CNTF, aber nicht von BDNF (Middleton et al., 2000). Verantwortlich dafür könnte sein, daß zu den Zielgenen von NF- κ B auch die Gene für IAPs gehören (Stehlik et al., 1998).

4.3.3 Die Rolle von Stat3 für das neuronale Überleben in anderen Modellen der Neurodegeneration

Im Rahmen dieser Arbeit stand das Fazialisläsionsmodell im Mittelpunkt der Untersuchung der Rolle des Transkriptionsfaktors Stat3 in Nervenzellen. Die bisherigen Ergebnisse legen die Hypothese nahe, daß es sich bei Stat3 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der besonders wichtig für ein genetisches Überlebensprogramm nach Axotomie der Neurone ist. Es stellte sich daher die Frage, ob Stat3 auch in anderen Fällen von neuronalem Zelluntergang dieselbe Rolle spielt. Deshalb wurden zwei andere Mausmodelle exemplarisch ausgewählt: Die transiente Ischämie als Modell für einen exogenen Apoptosestimulus und das menschliche SOD1^{G93A} Transgen als Modell für eine genetisch bedingte Neurodegeneration. Vorläufige Experimente zeigten, daß Mäuse ohne funktionelles Stat3 in Neuronen (NFL-Cre; Stat3^{flox/KO}) um mindestens 30 % größere Infarkte erleiden und bestätigen eine wichtige Rolle von Stat3 bei der genetischen Streßantwort in Neuronen. Weitere Unterstützung erhält die These der genetischen Schalterfunktion von Stat3 durch erste Daten, die nahelegen, daß das Fehlen von Stat3 in Motoneuronen die Lebenszeit von SOD1^{G93A} transgenen Mäusen fast im gleichen Ausmaß verkürzt wie das Fehlen von CNTF (Giess et al., 2002).

Diese Untersuchungen sollen zukünftig erweitert werden, um die Frage zu erhellen, welcher Art das Genexpressionsprogramm ist, das durch Stat3 gesteuert wird und zum Überleben von Neuronen beiträgt.

4.4 Punktmutationen im LIFR der Maus

Ein Ziel der Arbeit war es, durch gezielte Punktmutationen im LIF-Rezeptor der Maus zu untersuchen, welcher nachgeschaltete Signaltransduktionsweg für das Überleben von Motoneuronen in vivo verantwortlich ist. Beim Versuch, die entsprechenden Mutationen mit Hilfe der Hit&Run Methode in embryonalen Stammzellen zu etablieren, ließ sich die Integration des Vektors mit hoher Effizienz erreichen. Doch trotz einer theoretischen Wahrscheinlichkeit bei der Reversion von 50 % und 44 getesteten Revertanten konnten keine Revertanten mit der gewünschten Mutation gefunden werden, sondern alle Revertanten behielten das Wildtypallel. Es könnte sich hierbei um ein bisher nicht identifiziertes technisches Problem handeln (Dickinson et al., 2000; Höllrigl et al., 2001) oder es interferieren die Mutationen im LIFR irgendwie mit der Beibehaltung des Stammzell-

charakters der Zellen. Ein zelllinienabhängiger Heterozygoteneffekt wurde z.B. für die Mutation von Stat3 berichtet (Raz et al., 1999). Der Jak/Stat Weg wurde ebenfalls mehrfach mit der Selbsterneuerungsfähigkeit von embryonalen (Niwa et al., 1998), neuralen (Shimazaki et al., 2001) und Insekten-(Kiger et al., 2001) Stammzellen in Verbindung gebracht.

Diese Fragen klar zu beantworten, mag eventuell sehr zeitaufwendig sein und geht über das Ziel dieses Projektes hinaus. Aus diesem Grund wurde die Strategie geändert, um technische Probleme mit Hit&Run auszuschließen. Jetzt sollen die Mutationen mit Hilfe eines klassischen "knock-in" Ansatzes über doppelt-homologe Rekombination in embryonale Stammzellen eingeführt werden. Das entsprechende Konstrukt wurde elektroporiert und PCR-positive Kandidatenklone wurden bereits expandiert. Im Moment steht die Verifikation der korrekten Mutation in diesen Klonen noch aus. Im Erfolgsfalle könnten die Zellen direkt zur Etablierung entsprechender Mauslinien verwendet werden.

Möglicherweise ist das einfache Schema der LIFR-abhängigen Signaltransduktion (Abb. 1.3), im Rückblick betrachtet, zu sehr vereinfachend. Wie schon im vorherigen Abschnitt diskutiert, muß die Aktivierung des PI3-K Signalweges als weiterer am LIFR initiiertes Signalweg bedacht werden (Hirano et al., 1997; Nishimune et al., 2000; Alonzi et al., 2001; Dolcet et al., 2001). Doch nicht nur kooperative, sondern auch antagonistische Wechselwirkungen zwischen diesen Signalwegen wurden beschrieben. So beobachteten Ihara et al. (1997), daß Stat3 Aktivierung das Neuritenwachstum in PC12 Zellen hemmt, während Aktivierung des MAPK Weges das Neuritenwachstum fördert. Ein ganzer Bereich der LIFR Signaltransduktion wurde bisher nicht im Hinblick auf die Funktion und Erneuerungsfähigkeit von embryonalen Stammzellen untersucht: Weder die Rolle der SOCS (suppressor of cytokine signalling) Genfamilie sowie der PIAS Proteine, die E3-Ligaseaktivität für die SUMO Modifikation von Zielproteinen besitzen, ist derzeit in Stammzellen geklärt (O'Shea et al., 2002). Vielleicht liegt dort der Schlüssel für das Verständnis des unerwarteten Resultats der Reversionsexperimente von mutierten embryonalen Stammzellen.

4.5 Gedanken zur Kooperativität und Spezifität in der Signaltransduktion

Ein überraschendes Ergebnis dieser Arbeit war, daß auch Motoneurone ohne funktionelles Stat3 Gen nach der Fazialisläsion überlebten, wenn man CNTF auf den Nervstumpf applizierte (Abb. 3.3.4). Man hätte annehmen können, daß die vorherigen Läsionsexperimente gezeigt hätten, daß Stat3 für das Überleben der Motoneurone unverzichtbar ist und daß CNTF der Faktor ist, der Stat3 aktiviert. Wie kann man dieses scheinbar widersprüchliche Ergebnis interpretieren? Auch im Falle der embryonalen Motoneurone in vitro wurde gezeigt, daß Stat3

am CNTF-vermittelten Überlebens-effekt beteiligt ist, daß aber die Abwesenheit von Stat3 durch höhere Dosen CNTF kompensiert werden kann. Man muß also annehmen, daß es mindestens zwei CNTF-abhängige Signalwege für das neuronale Überleben gibt, von denen einer Stat3-abhängig ist. Der andere Signalweg könnte dann der Ras-Raf Weg sein. Diese Annahme ist nicht unbegründet, denn man weiß, daß der CNTF Rezeptorkomplex neben dem Stat auch den Ras Signalweg aktiviert (Davis et al., 1995; Hirano et al., 1997). Betrachtet man den Verlauf der Dosis-Wirkungskurve für das CNTF-abhängige Überleben von Motoneuronen *in vitro* (Abb. 3.3.2), dann fällt auf, daß für die NFL-Cre; Stat3^{flox/KO} Neurone die Kurve nicht einfach verschoben ist, sondern flacher und fast linear verläuft (siehe auch Alonzi et al., 2001). Diesen Kurvenverlauf kann man so interpretieren, daß eine sonst vorhandene Kooperativität zwischen mehreren Signalwegen verloren gegangen ist. Solche Kooperativitäten (oder physikalisch gesprochen: Autokatalyse, feed-forward) sind aber ein Kennzeichen selbstorganisierter und daher aller biologischen Systeme (Monod 1971; Höpfner 1990; Krauss 1997). Der Ausfall einer Komponente führt dann nicht notwendigerweise zum Zusammenbruch des Systems, wohl aber zum teilweisen Verlust von Kooperativität, der sich im vorliegenden Fall darin ausdrückt, daß eine viel (etwa 100-fach) höhere CNTF Konzentration für das Überleben der Motoneurone notwendig wird.

Wie kommt die Kooperativität auf molekularer Ebene zustande? Formal wäre es ausreichend, wenn ein Signalweg z.B. zur Phosphorylierung einer Kinase eines anderen Signalwegs führt und diese dadurch aktiviert (Krauss 1997). Wenn diese Phosphorylierung nicht nur einen Ein-/Aus-Schalter darstellt, sondern zu einer allosterischen Aktivierung, also Erhöhung der Wechselzahl des Enzyms führt, so wäre ein supra-additiver Effekt die Folge. Als ein Beispiel dafür soll die Raf-Kinase dienen, sie wird z.B. durch PKC, PKA und Src Kinasen moduliert (Daum et al., 1994). Natürlich gibt es noch weitere Möglichkeiten, die teilweise in Kapitel 1 beschrieben sind.

Die Daten zur Inaktivierung von Stat3 in Neuronen weisen noch auf ein anderes Prinzip der Signaltransduktion hin – eine mitunter überraschende Spezifität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Jak/Stat Weg immer in einer Weise diskutiert, die nahelegt, daß die Aufgabe von Jak die Aktivierung von Stat Transkriptionsfaktoren ist. Dies ist natürlich nicht der Fall. So führt die genetische Inaktivierung von Jak1 (Rodig et al., 1998) zu einem Phänotyp, der dem von gp130 und LIFR defizienten Mäusen ähnelt (O’Shea et al., 2002), während Stat3^{-/-} Embryonen zur Zeit der Gastrulation sterben (Takeda et al., 1997) und die Inaktivierung aller anderen Stat Homologen nicht letal ist (O’Shea et al., 2002). Es scheint vielmehr so, daß die Rolle von Jak im gp130/LIFR Komplex in embryonalen Motoneuronen in erster Linie die

Aktivierung des Ras/Raf-Weges und des PI3-K Weges ist (Hirano et al., 1997; Nishimune et al., 2000; Dolcet et al., 2001), während der Stat3 Weg in diesen Neuronen sogar verzichtbar ist. Kommt es aber dann zur Läsion, müssen sowohl der Stat3 als auch der Ras-Raf (möglicherweise auch der PI3-K) Weg kooperieren. Es ist in meinen Augen ein Hauptergebnis dieser Arbeit, ein solches Beispiel für Kooperativität und Spezifität innerhalb eines Zelltyps in unterschiedlichen physiologischen Zuständen gefunden zu haben.

5. Literaturliste

- Adrain,C. and Martin,S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends. Biochem. Sci.*, **26**, 390-397.
- Akagi,K., Sandig,V., Vooijs,M., Van,d., V, Giovannini,M., Strauss,M., and Berns,A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic. Acids. Res.*, **25**, 1766-1773.
- Akassoglou,K., Probert,L., Kontogeorgos,G., and Kollias,G. (1997). Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J. Immunol.*, **158**, 438-445.
- Alexander,W.S., Rakar,S., Robb,L., Farley,A., Willson,T.A., Zhang,J.G., Hartley,L., Kikuchi,Y., Kojima,T., Nomura,H., Hasegawa,M., Maeda,M., Fabri,L., Jachno,K., Nash,A., Metcalf,D., Nicola,N.A., and Hilton,D.J. (1999). Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr. Biol.*, **9**, 605-608.
- Alonzi,T., Middleton,G., Wyatt,S., Buchman,V., Betz,U.A., Muller,W., Musiani,P., Poli,V., and Davies,A.M. (2001). Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol. Cell Neurosci.*, **18**, 270-282.
- Arakawa,Y., Sendtner,M., and Thoenen,H. (1990). Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J. Neurosci.*, **10**, 3507-3515.
- Askew,G.R., Doetschman,T., and Lingrel,J.B. (1993). Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4115-4124.
- Barde,Y.A. (1990). The nerve growth factor family. *Prog. Growth Factor Res.*, **2**, 237-248.
- Beaudet,L., Charron,G., Houle,D., Tretjakoff,I., Peterson,A., and Julien,J.P. (1992). Intragenic regulatory elements contribute to transcriptional control of the neurofilament light gene. *Gene*, **116**, 205-214.
- Bibel,M., Hoppe,E., and Barde,Y.A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.*, **18**, 616-622.
- Bonni,A., Brunet,A., West,A.E., Datta,S.R., Takasu,M.A., and Greenberg,M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, **286**, 1358-1362.
- Brinster,R.L., Allen,J.M., Behringer,R.R., Gelinis,R.E., and Palmiter,R.D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 836-840.
- Brooks,B.P. and Fischbeck,K.H. (1995). Spinal and bulbar muscular atrophy: a trinucleotide-repeat expansion neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.*, **18**, 459-461.

- Brunet,A., Bonni,A., Zigmund,M.J., Lin,M.Z., Juo,P., Hu,L.S., Anderson,M.J., Arden,K.C., Blenis,J., and Greenberg,M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**, 857-868.
- Bump,N.J., Hackett,M., Hugunin,M., Seshagiri,S., Brady,K., Chen,P., Ferez,C., Franklin,S., Ghayur,T., Li,P., and . (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, **269**, 1885-1888.
- Casaccia-Bonnet,P., Carter,B.D., Dobrowsky,R.T., and Chao,M.V. (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*, **383**, 716-719.
- Casanova,E., Fehsenfeld,S., Mantamadiotis,T., Lemberger,T., Greiner,E., Stewart,A.F., and Schutz,G. (2001). A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis*, **31**, 37-42.
- Chambers,I., Cozens,A., Broadbent,J., Robertson,M., Lee,M., Li,M., and Smith,A. (1997). Structure of the mouse leukaemia inhibitory factor receptor gene: regulated expression of mRNA encoding a soluble receptor isoform from an alternative 5' untranslated region. *Biochem. J.*, **328**, 879-888.
- Chan,A., Reiter,R., Wiese,S., Fertig,G., and Gold,R. (1998). Plasma membrane phospholipid asymmetry precedes DNA fragmentation in different apoptotic cell models. *Histochem. Cell Biol.*, **110**, 553-558.
- Chao,M.V., Bothwell,M.A., Ross,A.H., Koprowski,H., Lanahan,A.A., Buck,C.R., and Sehgal,A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science*, **232**, 518-521.
- Charron,G., Julien,J.P., and Bibor-Hardy,V. (1995). Neuron specificity of the neurofilament light promoter in transgenic mice requires the presence of DNA unwinding elements. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25739-25745.
- Cheema,Z.F., Wade,S.B., Sata,M., Walsh,K., Sohrabji,F., and Miranda,R.C. (1999). Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J. Neurosci.*, **19**, 1754-1770.
- Chen,D.F., Schneider,G.E., Martinou,J.C., and Tonegawa,S. (1997). Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature*, **385**, 434-439.
- Chen,Q., Gong,B., and Almasan,A. (2000). Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death. Differ.*, **7**, 227-233.
- Curtis,R., Adryan,K.M., Zhu,Y., Harkness,P.J., Lindsay,R.M., and DiStefano,P.S. (1993). Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature*, **365**, 253-255.
- Curtis,R., Scherer,S.S., Somogyi,R., Adryan,K.M., Ip,N.Y., Zhu,Y., Lindsay,R.M., and DiStefano,P.S. (1994). Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron*, **12**, 191-204.

- Datta,S.R., Dudek,H., Tao,X., Masters,S., Fu,H., Gotoh,Y., and Greenberg,M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.
- Datta,S.R., Katsov,A., Hu,L., Petros,A., Fesik,S.W., Yaffe,M.B., and Greenberg,M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell*, **6**, 41-51.
- Daum,G., Eisenmann-Tappe,I., Fries,H.W., Troppmair,J., and Rapp,U.R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci.*, **19**, 474-480.
- Davis,S., Aldrich,T.H., Valenzuela,D.M., Wong,V.V., Furth,M.E., Squinto,S.P., and Yancopoulos,G.D. (1991). The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science*, **253**, 59-63.
- DeChiara,T.M., Vejsada,R., Poueymirou,W.T., Acheson,A., Suri,C., Conover,J.C., Friedman,B., McClain,J., Pan,L., and Stahl,N. (1995). Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell*, **83**, 313-322.
- Deckwerth,T.L., Elliott,J.L., Knudson,C.M., Johnson,E.M., Snider,W.D., and Korsmeyer,S.J. (1996). BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*, **17**, 401-411.
- Desagher,S. and Martinou,J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends. Cell Biol.*, **10**, 369-377.
- Deshmukh,M. and Johnson,E.M.J. (1998). Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron*, **21**, 695-705.
- Deveraux,Q.L., Roy,N., Stennicke,H.R., Van Arsdale,T., Zhou,Q., Srinivasula,S.M., Alnemri,E.S., Salvesen,G.S., and Reed,J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.*, **17**, 2215-2223.
- Deveraux,Q.L. and Reed,J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, **13**, 239-252.
- Dickinson,P., Kimber,W.L., Kilanowski,F.M., Webb,S., Stevenson,B.J., Porteous,D.J., and Dorin,J.R. (2000). Enhancing the efficiency of introducing precise mutations into the mouse genome by hit and run gene targeting. *Transgenic Res.* 9(1), 55-66.
- Dolcet,X., Soler,R.M., Gould,T.W., Egea,J., Oppenheim,R.W., and Comella,J.X. (2001). Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol. Cell Neurosci.*, **18**, 619-631.
- Du,C., Fang,M., Li,Y., Li,L., and Wang,X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [In Process Citation]. *Cell*, **102**, 33-42.
- Duseti,N.J., Ortiz,E.M., Mallo,G.V., Dagorn,J.C., and Iovanna,J.L. (1995). Pancreatitis-associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin-6 response elements in the rat PAP I promoter region. *J. Biol. Chem.*, **270**, 22417-22421.

- Ellis,H.M. and Horvitz,H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, **44**, 817-829.
- 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., and Gascan,H. (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat. Neurosci.*, **3**, 867-872.
- Enari,M., Sakahira,H., Yokoyama,H., Okawa,K., Iwamatsu,A., and Nagata,S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
- Estevez,A.G., Crow,J.P., Sampson,J.B., Reiter,C., Zhuang,Y., Richardson,G.J., Tarpey,M.M., Barbeito,L., and Beckman,J.S. (1999). Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc- deficient superoxide dismutase. *Science*, **286**, 2498-2500.
- Estevez,A.G., Spear,N., Manuel,S.M., Radi,R., Henderson,C.E., Barbeito,L., and Beckman,J.S. (1998). Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J. Neurosci.*, **18**, 923-931.
- Evans,G.A. and Chen,S. (1989). Expression of the Thy-1 gene and Thy-1-derived fusion genes in transgenic mice. *Mol. Biol. Med.*, **6**, 549-556.
- Filippova,G.N., Thienes,C.P., Penn,B.H., Cho,D.H., Hu,Y.J., Moore,J.M., Klesert,T.R., Lobanenkova,V.V., and Tapscott,S.J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat. Genet.*, **28**, 335-343.
- Fawcett,J.W. and Keynes,R.J. (1990). Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, **13:43-60**, 43-60.
- Frade,J.M., Rodriguez-Tebar,A., and Barde,Y.A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*, **383**, 166-168.
- French,L.E., Hahne,M., Viard,I., Radlgruber,G., Zanone,R., Becker,K., Muller,C., and Tschopp,J. (1996). Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J. Cell Biol.*, **133**, 335-343.
- Funakoshi,H., Belluardo,N., Arenas,E., Yamamoto,Y., Casabona,A., Persson,H., and Ibanez,C.F. (1995). Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science*, **268**, 1495-1499.
- Gasser,S.M. and Laemmli,U.K. (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell*, **46**, 521-530.
- Giess,R., Holtmann,B., Braga,M., Grimm,T., Muller-Myhsok,B., Toyka,K.V., and Sendtner,M. (2002). Early Onset of Severe Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with a SOD-1 Mutation: Potential Impact of CNTF as a Candidate Modifier Gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **70**, 1277-1286.

- Ginty,D.D., Bonni,A., and Greenberg,M.E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*, **77**, 713-725.
- Gotz,R., Karch,C., Digby,M.R., Troppmair,J., Rapp,U.R., and Sendtner,M. (2000). The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC12 cells. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2479-2489.
- Green,S.H. and Greene,L.A. (1986). A single Mr approximately 103,000 125I-beta-nerve growth factor-affinity-labeled species represents both the low and high affinity forms of the nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **261**, 15316-15326.
- Grohmann,K., Schuelke,M., Diers,A., Hoffmann,K., Lucke,B., Adams,C., Bertini,E., Leonhardt-Horti,H., Muntoni,F., Ouvrier,R., Pfeufer,A., Rossi,R., Van Maldergem,L., Wilmshurst,J.M., Wienker,T.F., Sendtner,M., Rudnik-Schoneborn,S., Zerres,K., and Hubner,C. (2001). Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat. Genet.*, **29**, 75-77.
- Gu,H., Zou,Y.R., and Rajewsky,K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73**, 1155-1164.
- Haas,C.A., Hofmann,H.D., and Kirsch,M. (1999). Expression of CNTF/LIF-receptor components and activation of STAT3 signaling in axotomized facial motoneurons: evidence for a sequential postlesional function of the cytokines. *J. Neurobiol.*, **41**, 559-571.
- Hake,L.E. and Hecht,N.B. (1993). Utilization of an alternative transcription initiation site of somatic cytochrome c in the mouse produces a testis-specific cytochrome c mRNA. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4788-4797.
- Hakem,R., Hakem,A., Duncan,G.S., Henderson,J.T., Woo,M., Soengas,M.S., Elia,A., de la Pompa,J.L., Kagi,D., Khoo,W., Potter,J., Yoshida,R., Kaufman,S.A., Lowe,S.W., Penninger,J.M., and Mak,T.W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, **94**, 339-352.
- Hamburger,V. (1934). The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J Exp Zool* **68**, 449-494.
- Hamburger,V. (1958). Regression versus peripheral control of differentiation in motor hyperplasia. *Am J Anat* **102**, 365-410.
- Hamburger,V. (1992). History of the discovery of neuronal death in embryos. *J. Neurobiol.*, **23**, 1116-1123.
- Hamburger,V. (1993). The history of the discovery of the nerve growth factor. *J. Neurobiol.*, **24**, 893-897.
- Hamner,S., Skoglosa,Y., and Lindholm,D. (1999). Differential expression of bcl-w and bcl-x messenger RNA in the developing and adult rat nervous system. *Neuroscience*, **91**, 673-684.
- Hanson,M.G., Jr., Shen,S., Wiemelt,A.P., McMorris,F.A., and Barres,B.A. (1998). Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.*, **18**, 7361-7371.

- Hasty,P., Ramirez-Solis,R., Krumlauf,R., and Bradley,A. (1991). Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells [published erratum appears in Nature 1991 Sep 5;353(6339):94]. *Nature*, **350**, 243-246.
- Hempstead,B.L., Martin-Zanca,D., Kaplan,D.R., Parada,L.F., and Chao,M.V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, **350**, 678-683.
- Henderson,C.E., Phillips,H.S., Pollock,R.A., Davies,A.M., Lemeulle,C., Armanini,M., Simmons,L., Moffet,B., Vandlen,R.A., and Simpson,L.C. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, **266**, 1062-1064.
- Hengartner,M.O. and Horvitz,H.R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, **76**, 665-676.
- Hirano,T., Nakajima,K., and Hibi,M. (1997). Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine. Growth Factor. Rev.*, **8**, 241-252.
- Höllrigl,A., Hergovich,A., Gorzer,I., Bader,A., Ellersdorfer,G., Habegger,K., Hammer,E., Enzinger,S., Capetanaki,Y., and Weitzer,G. (2001). High-throughput site-directed mutagenesis in ES cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 289(2), 329-336.
- Hollyday,M. and Hamburger,V. (1976). Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp Neurol.*, **170**, 311-320.
- Hooper,M., Hardy,K., Handyside,A., Hunter,S., and Monk,M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, **326**, 292-295.
- Höpfner, A (1990) Grundlagen der Thermodynamik irreversibler Prozesse, in: Atkins, P.W. (1990). *Physikalische Chemie*. VCH
- Howe,C.L., Valletta,J.S., Rusnak,A.S., and Mobley,W.C. (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron*, **32**, 801-814.
- Hsu,C., Janicki,S., and Monteiro,M.J. (1995). The first intron of the mouse neurofilament light gene (NF-L) increases gene expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **32**, 241-251.
- Huang,D.C. and Strasser,A. (2001). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, **103**, 839-842.
- Ihara,S., Nakajima,K., Fukada,T., Hibi,M., Nagata,S., Hirano,T., and Fukui,Y. (1997). Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6. *EMBO J.*, **16**, 5345-5352.
- Ingraham,H.A. and Evans,G.A. (1986). Characterization of two atypical promoters and alternate mRNA processing in the mouse Thy-1.2 glycoprotein gene. *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2923-2931.
- Imaizumi,K., Morihara,T., Mori,Y., Katayama,T., Tsuda,M., Furuyama,T., Wanaka,A., Takeda,M., and Tohyama,M. (1999). The cell death-promoting gene DP5, which interacts

with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7975-7981.

Jenuwein, T., Forrester, W.C., Fernandez-Herrero, L.A., Laible, G., Dull, M., and Grosschedl, R. (1997). Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature*, **385**, 269-272.

Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., and McKay, R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.*, **10**, 3129-3140.

Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., and Parada, L.F. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, **252**, 554-558.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.

Kiger, A.A., Jones, D.L., Schulz, C., Rogers, M.B., and Fuller, M.T. (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science*, **294**, 2542-2545.

Kluck, R.M., Martin, S.J., Hoffman, B.M., Zhou, J.S., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J.*, **16**, 4639-4649.

Krauss, G. (1997). *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Wiley-VCH.

Kuan, C.Y., Roth, K.A., Flavell, R.A., and Rakic, P. (2000). Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends. Neurosci.*, **23**, 291-297.

Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, **94**, 325-337.

Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, **384**, 368-372.

Kwon, C.H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L.L., Tharp, R., Smeyne, R.J., Eberhart, C.G., Burger, P.C., and Baker, S.J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.*, **29**, 404-411.

La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., and Fischbeck, K.H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, **352**, 77-79.

Leconte, L., Semonin, O., Zvara, A., Boisseau, S., Poujeol, C., Julien, J.P., and Simonneau, M. (1994). Both upstream and intragenic sequences of the human neurofilament light gene direct expression of lacZ in neurons of transgenic mouse embryos. *J. Mol. Neurosci.*, **5**, 273-295.

- Lefebvre,S., Burglen,L., Reboullet,S., Clermont,O., Burlet,P., Viollet,L., Benichou,B., Cruaud,C., Millasseau,P., Zeviani,M., and . (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80**, 155-165.
- Levi-Montalcini,R. and Hamburger,V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* **116**, 321-361.
- Levi-Montalcini,R., Meyer,H., and Hamburger,V. (1954). in vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* **14**, 49-57.
- Li,F., Srinivasan,A., Wang,Y., Armstrong,R.C., Tomaselli,K.J., and Fritz,L.C. (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30299-30305.
- Li,K., Li,Y., Shelton,J.M., Richardson,J.A., Spencer,E., Chen,Z.J., Wang,X., and Williams,R.S. (2000). Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* **2000.**, **101**, 389-399.
- Li,M., Sendtner,M., and Smith,A. (1995). Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature*, **378**, 724-727.
- Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X. (1997b). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- Livesey,F.J., O'Brien,J.A., Li,M., Smith,A.G., Murphy,L.J., and Hunt,S.P. (1997). A Schwann cell mitogen accompanying regeneration of motor neurons. *Nature*, **390**, 614-618.
- Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C., and Wang,X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Lutticken,C., Wegenka,U.M., Yuan,J., Buschmann,J., Schindler,C., Ziemiecki,A., Harpur,A.G., Wilks,A.F., Yasukawa,K., and Taga,T. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, **263**, 89-92.
- Martin-Villalba,A., Herr,I., Jeremias,I., Hahne,M., Brandt,R., Vogel,J., Schenkel,J., Herdegen,T., and Debatin,K.M. (1999). CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.*, **19**, 3809-3817.
- Masu,Y., Wolf,E., Holtmann,B., Sendtner,M., Brem,G., and Thoenen,H. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*, **365**, 27-32.
- Maniatis,T. and Reed,R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, **416**, 499-506.
- Matsuyama,T., Hata,R., Tagaya,M., Yamamoto,Y., Nakajima,T., Furuyama,J., Wanaka,A., and Sugita,M. (1994). Fas antigen mRNA induction in postischemic murine brain. *Brain Res.*, **657**, 342-346.

- Middleton,G., Hamanoue,M., Enokido,Y., Wyatt,S., Pennica,D., Jaffray,E., Hay,R.T., and Davies,A.M. (2000). Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J. Cell Biol.*, **148**, 325-332.
- Monod, J. (1971) . Zufall und Notwendigkeit. Deutsche Ausgabe mit einer Vorrede von Manfred Eigen. Piper.
- Motoyama,N., Wang,F., Roth,K.A., Sawa,H., Nakayama,K., Negishi,I., Senju,S., Zhang,Q., and Fujii,S. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, **267**, 1506-1510.
- Nagata,S. (1999). Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.*, **33:29-55**.
- Nagy,A., Rossant,J., Nagy,R., Abramow-Newerly,W., and Roder,J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 8424-8428.
- Nakashima,K., Wiese,S., Yanagisawa,M., Arakawa,H., Kimura,N., Hisatsune,T., Yoshida,K., Kishimoto,T., Sendtner,M., and Taga,T. (1999). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J. Neurosci.*, **19**, 5429-5434.
- Nicotera,P., Leist,M., and Ferrando-May,E. (1999). Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc. Symp.*, **66**, 69-73.
- Nishimune,H., Vasseur,S., Wiese,S., Birling,M.C., Holtmann,B., Sendtner,M., Iovanna,J.L., and Henderson,C.E. (2000). Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 906-914.
- Niwa,H., Burdon,T., Chambers,I., and Smith,A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.*, **12**, 2048-2060.
- Oppenheim,R.W., Flavell,R.A., Vinsant,S., Prevette,D., Kuan,C.Y., and Rakic,P. (2001). Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.*, **21**, 4752-4760.
- Oppenheim,R.W., Wiese,S., Prevette,D., Armanini,M., Wang,S., Houenou,L.J., Holtmann,B., Gotz,R., Pennica,D., and Sendtner,M. (2001). Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *J. Neurosci.*, **21**, 1283-1291.
- Opsahl,M.L., McClenaghan,M., Springbett,A., Reid,S., Lathe,R., Colman,A., and Whitelaw,C.B. (2002). Multiple effects of genetic background on variegated transgene expression in mice. *Genetics*, **160**, 1107-1112.
- O'Shea,J.J., Gadina,M., and Schreiber,R.D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, **109 Suppl**, S121-S131.
- Palmiter,R.D., Sandgren,E.P., Avarbock,M.R., Allen,D.D., and Brinster,R.L. (1991). Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 478-482.

- Park,C., Sakamaki,K., Tachibana,O., Yamashima,T., Yamashita,J., and Yonehara,S. (1998). Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **252**, 623-628.
- Parsadanian,A.S., Cheng,Y., Keller-Peck,C.R., Holtzman,D.M., and Snider,W.D. (1998). Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J. Neurosci.*, **18**, 1009-1019.
- Pennica,D., Arce,V., Swanson,T.A., Vejsada,R., Pollock,R.A., Armanini,M., Dudley,K., Phillips,H.S., Rosenthal,A., Kato,A.C., and Henderson,C.E. (1996). Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron*, **17**, 63-74.
- Polster,B.M., Kinnally,K.W., and Fiskum,G. (2001). BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37887-37894.
- Purves,D. (1988). *Body and brain: A trophic theory of neural connections*. Harvard University Press.
- Putchu,G.V., Moulder,K.L., Golden,J.P., Bouillet,P., Adams,J.A., Strasser,A., and Johnson,E.M. (2001). Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 2001., **29**, 615-628.
- Raoul,C., Henderson,C.E., and Pettmann,B. (1999). Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J. Cell Biol.*, **147**, 1049-1062.
- Raoul,C., Pettmann,B., and Henderson,C.E. (2000). Active killing of neurons during development and following stress: a role for p75(NTR) and Fas? *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 111-117.
- Raz,R., Lee,C.K., Cannizzaro,L.A.,d'Eustacio, P., and Levy, D.E. (1999). Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 96(6), 2846-2851.
- Reed,J.C. (1997). Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell*, **91**, 559-562.
- Riccio,A., Ahn,S., Davenport,C.M., Blendy,J.A., and Ginty,D.D. (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science*, **286**, 2358-2361.
- Rodig,S.J., Meraz,M.A., White,J.M., Lampe,P.A., Riley,J.K., Arthur,C.D., King,K.L., Sheehan,K.C., Yin,L., Pennica,D., Johnson,E.M.J., and Schreiber,R.D. (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, **93**, 373-383.
- Romashkova,J.A. and Makarov,S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401**, 86-90.
- Rosen,D.R., Siddique,T., Patterson,D., Figlewicz,D.A., Sapp,P., Hentati,A., Donaldson,D., Goto,J., O'Regan,J.P., Deng,H.X., and . (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**, 59-62.
- Roth,K.A., Kuan,C., Haydar,T.F., D'Sa-Eipper,C., Shindler,K.S., Zheng,T.S., Kuida,K., Flavell,R.A., and Rakic,P. (2000). Epistatic and independent functions of caspase-3 and Bcl-X(L) in developmental programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 466-471.

- Sagot, Y., Dubois-Dauphin, M., Tan, S.A., de Bilbao, F., Aebischer, P., Martinou, J.C., and Kato, A.C. (1995a). Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. *J. Neurosci.*, **15**, 7727-7733.
- Sagot, Y., Tan, S.A., Baetge, E., Schmalbruch, H., Kato, A.C., and Aebischer, P. (1995b). Polymer encapsulated cell lines genetically engineered to release ciliary neurotrophic factor can slow down progressive motor neuronopathy in the mouse. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 1313-1322.
- Sagot, Y., Tan, S.A., Hammang, J.P., Aebischer, P., and Kato, A.C. (1996). GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice. *J. Neurosci.*, **16**, 2335-2341.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **391**, 96-99.
- Sakurai, M., Hayashi, T., Abe, K., Sadahiro, M., and Tabayashi, K. (1998). Delayed selective motor neuron death and fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. *Brain Res.*, **797**, 23-28.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, **17**, 1675-1687.
- Shimazaki, T., Shingo, T., and Weiss, S. (2001). The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.*, **21**, 7642-7653.
- Schlaepfer, W.W. and Bruce, J. (1990). Simultaneous up-regulation of neurofilament proteins during the postnatal development of the rat nervous system. *J. Neurosci. Res.*, **25**, 39-494.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., and Reuter, G. (2002). Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.*, **21**, 1121-1131.
- Schwaiger, F.W., Schmitt, G.H., Horvat, A., Hager, G., Streif, R., Spitzer, C., Gamal, S., Breuer, S., Brook, G.A., Nacimiento, W., and Kreutzberg, G.W. (2000). Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 1165-1176.
- Schweizer, U., Gunnarsen, J., Karch, C., Wiese, S., Holtmann, B., Takeda, K., Akira, S., and Sendtner, M. (2002). Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J. Cell Biol.*, **156**, 287-297.
- Sendtner, M. (1999). Neurotrophic Factors and Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: Hefti, F. (ed.) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 134; Neurotrophic Factors. Springer

- Sendtner,M., Arakawa,Y., Stockli,K.A., Kreutzberg,G.W., and Thoenen,H. (1991). Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J. Cell Sci. Suppl*, **15**, 103-109.
- Sendtner,M., Gotz,R., Holtmann,B., Escary,J.L., Masu,Y., Carroll,P., Wolf,E., Brem,G., Brulet,P., and Thoenen,H. (1996). Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr. Biol.*, **6**, 686-694.
- Sendtner,M., Gotz,R., Holtmann,B., and Thoenen,H. (1997). Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J. Neurosci.*, **17**, 6999-7006.
- Sendtner,M., Holtmann,B., Kolbeck,R., Thoenen,H., and Barde,Y.A. (1992a). Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*, **360**, 757-759.
- Sendtner,M., Kreutzberg,G.W., and Thoenen,H. (1990). Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature*, **345**, 440-441.
- Sendtner,M., Pei,G., Beck,M., Schweizer,U., and Wiese,S. (2000). Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res.*, **301**, 71-84.
- Sendtner,M., Schmalbruch,H., Stockli,K.A., Carroll,P., Kreutzberg,G.W., and Thoenen,H. (1992b). Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature*, **358**, 502-504.
- Sendtner,M., Stockli,K.A., and Thoenen,H. (1992c). Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J. Cell Biol.*, **118**, 139-148.
- Sheng,M. and Greenberg,M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, **4**, 477-485.
- Shimazaki,T., Shingo,T., and Weiss,S. (2001). The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.*, **21**, 7642-7653.
- Slee,E.A., Harte,M.T., Kluck,R.M., Wolf,B.B., Casiano,C.A., Newmeyer,D.D., Wang,H.G., Reed,J.C., Nicholson,D.W., Alnemri,E.S., Green,D.R., and Martin,S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9- dependent manner. *J. Cell Biol.*, **144**, 281-292.
- Slee,E.A., Adrain,C., and Martin,S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7320-7326.
- Soler,R.M., Dolcet,X., Encinas,M., Egea,J., Bayascas,J.R., and Comella,J.X. (1999). Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J. Neurosci.*, **19**, 9160-9169.
- Stahl,N., Boulton,T.G., Farruggella,T., Ip,N.Y., Davis,S., Witthuhn,B.A., Quelle,F.W., Silvennoinen,O., Barbieri,G., Pellegrini,S., and . (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, **263**, 92-95.

- Stahl,N., Farruggella,T.J., Boulton,T.G., Zhong,Z., Darnell,J.E.J., and Yancopoulos,G.D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, **267**, 1349-1353.
- Stahl,N. and Yancopoulos,G.D. (1994). The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J. Neurobiol.*, **25**, 1454-1466.
- Stehlik,C., de Martin,R., Kumabashiri,I., Schmid,J.A., Binder,B.R., and Lipp,J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, **188**, 211-216.
- Sugimoto,A., Friesen,P.D., and Rothman,J.H. (1994). Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.*, **13**, 2023-2028.
- Szabo,P.E., Tang,S.H., Reed,M.R., Silva,F.J., Tsark,W.M., and Mann,J.R. (2002). The chicken beta-globin insulator element conveys chromatin boundary activity but not imprinting at the mouse *Igf2/H19* domain. *Development*, **129**, 897-904.
- Takeda,K., Kaisho,T., Yoshida,N., Takeda,J., Kishimoto,T., and Akira,S. (1998). Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell- specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.*, **161**, 4652-4660.
- Takeda,K., Noguchi,K., Shi,W., Tanaka,T., Matsumoto,M., Yoshida,N., Kishimoto,T., and Akira,S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 3801-3804.
- Thomas,K.R. and Capecchi,M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, **51**, 503-512.
- Tuszynski, M.H. and Kordower, J.(ed.), (1999) CNS Regeneration. Basic Science and Clinical Advances. Academic Press.
- Tybulewicz,V.L., Crawford,C.E., Jackson,P.K., Bronson,R.T., and Mulligan,R.C. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*, **65**, 1153-1163.
- Verhagen,A.M., Ekert,P.G., Pakusch,M., Silke,J., Connolly,L.M., Reid,G.E., Moritz,R.L., Simpson,R.J., and Vaux,D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000, **102**, 43-53.
- Vetter,M.L., Martin-Zanca,D., Parada,L.F., Bishop,J.M., and Kaplan,D.R. (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 5650-5654.
- Wang,H.G., Takayama,S., Rapp,U.R., and Reed,J.C. (1996). Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 7063-7068.

- White,F.A., Keller-Peck,C.R., Knudson,C.M., Korsmeyer,S.J., and Snider,W.D. (1998). Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice. *J. Neurosci.*, **18**, 1428-1439.
- Weng,G., Markus,M.A., Markus,A., Winkler,A., and Borasio,G.D. (1996). p21ras supports the survival of chick embryonic motor neurones. *Neuroreport*, **7**, 1077-1081.
- Wiese,S., Digby,M.R., Gunnensen,J.M., Gotz,R., Pei,G., Holtmann,B., Lowenthal,J., and Sendtner,M. (1999a). The anti-apoptotic protein ITA is essential for NGF-mediated survival of embryonic chick neurons. *Nat. Neurosci.*, **2**, 978-983.
- Wiese,S., Metzger,F., Holtmann,B., and Sendtner,M. (1999b). The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1668-1676.
- Wiese,S., Pei,G., Karch,C., Troppmair,J., Holtmann,B., Rapp,U.R., and Sendtner,M. (2001). Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat. Neurosci.*, **4**, 137-142.
- Woo,M., Hakem,R., Soengas,M.S., Duncan,G.S., Shahinian,A., Kagi,D., Hakem,A., McCurrach,M., Khoo,W., Kaufman,S.A., Senaldi,G., Howard,T., Lowe,S.W., and Mak,T.W. (1998). Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.*, **12**, 806-819.
- Xia,Z., Dudek,H., Miranti,C.K., and Greenberg,M.E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J. Neurosci.*, **16**, 5425-5436.
- Xue,D. and Horvitz,H.R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*, **377**, 248-251.
- Yang,J., Liu,X., Bhalla,K., Kim,C.N., Ibrado,A.M., Cai,J., Peng,T.I., Jones,D.P., and Wang,X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- Yang,Y., Hentati,A., Deng,H.X., Dabbagh,O., Sasaki,T., Hirano,M., Hung,W.Y., Ouahchi,K., Yan,J., Azim,A.C., Cole,N., Gascon,G., Yagmour,A., Ben Hamida,M., Pericak-Vance,M., Hentati,F., and Siddique,T. (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.*, **29**, 160-165.
- York,R.D., Yao,H., Dillon,T., Ellig,C.L., Eckert,S.P., McCleskey,E.W., and Stork,P.J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, **392**, 622-626.
- Yoshida,H., Kong,Y.Y., Yoshida,R., Elia,A.J., Hakem,A., Hakem,R., Penninger,J.M., and Mak,T.W. (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, **94**, 739-750.
- Yuan,J., Shaham,S., Ledoux,S., Ellis,H.M., and Horvitz,H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, **75**, 641-652.

Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D.W., Lazebnik, Y., and Flavell, R.A. (2000). Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat. Med.*, **6**, 1241-1247.

6. Lebenslauf und eigene Publikationen

Name: **Ulrich** Eberhard Matthias Schweizer
Geburtsort,-tag Backnang, 15.02.1971

Schulbildung:

1977-1981 Walterich Schule; Grundschule, Murrhardt
1981-1990 Heinrich von Zügel Gymnasium Murrhardt
8.5.1990 Abitur, Note 1,5

1.7.1990-30.6.1992 Wehrdienst. Reserveoffiziersausbildung.

Studium einschließlich akademischer Prüfungen:

1992-1998 Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth
1994 Diplomvorprüfungen:
Anorganische Chemie (1,3); Organische Chemie (1,7); Physikalische Chemie (1,3); Biochemie (1,7); Physik (1,0); Allgemeine Biologie (3,0).

SS 1996 wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biopolymere, Prof. Paul Rösch, Moleküldynamikrechnungen und Protein-NMR

Nov.1996-Nov.1997 Urlaubsemester.
Forschungsaufenthalt an den Nationalen Gesundheitsinstituten der USA in Bethesda, MD, in der Abteilung für Hirnschlag (Stroke Branch, NINDS) unter der Leitung von Dr. John Hallenbeck
Stipendien von Siemens Med-GT, Erlangen, und Hans-Krüger-Stiftung, Berlin.

Frühjahr 1998 Diplomprüfungen:
Biochemie (1,0); Biophysikalische Chemie (2,0); Genetik (1,0); Organische Chemie (1,7).
Studienbegleitendes Fremdsprachenzertifikat der Universität Bayreuth Stufe III (Verhandlungsfähigkeit), Gesamtnote 2,0.

Mai 1998-Dez.1998 Diplomarbeit mit dem Titel „ Biochemische Untersuchungen zur strukturellen Grundlage der Erkennung von DNA-Schäden durch das humane Einzelstrang-DNA-Bindungsprotein RPA“, benotet mit 1,15.
Lehrstuhl für Biochemie, Prof. Krauss, Bayreuth

Jan.1999-Apr.2002 Anfertigung der Doktorarbeit im Institut für Klinische Neurobiologie unter der Anleitung von Prof. Michael Sendtner. Berichterstatter für die biologische Fakultät war Prof. Martin Heisenberg (Lehrstuhl für Genetik).

Mitglied in der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM).

Publikationen:

Karl Pöllmann, Katja Schaller, **Ulrich Schweizer**, M. Hani A. Elgamal, Kamel H. Shaker und Karlheinz Seifert (1998). Triterpenoid Saponins from *Zygophyllum decumbens*. *Phytochemistry* **48(5)**, 875-880.

Irene Ginis, **Ulrich Schweizer**, Michael Brenner, Jie Liu, Nabil Azzam, Maria Spatz und John M. Hallenbeck (1999). TNF- α pretreatment prevents subsequent activation of cultured brain cells with TNF- α and hypoxia via ceramide. *Am J Physiol. 276 (Cell Physiol. 45)*, C1171-C1183.

Ulrich Schweizer, Thomas Hey, Georg Lipps und Gerhard Krauss (1999). Photocrosslinking locates a binding site for the large subunit of human replication protein A to the damaged strand of cisplatin-modified DNA. *Nucleic Acids Res* **27(15)**, 3183-3189.

Michael Sendtner, Geng Pei, Marcus Beck, **Ulrich Schweizer**, Stefan Wiese (2000). Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res* **301**, 71-84.

Ulrich Schweizer, Jennifer M. Gunnensen, Christoph Karch, Stefan Wiese, Bettina Holtmann, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira und Michael Sendtner (2002). Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J Cell Biol* **156**, 287-297.

Ulrich Schweizer (2002). Confused by your data ? Help is at hand !. *J I R* **47(1)**, 32.

Ulrich Schweizer, Jennifer Gunnensen, Stefan Wiese, Bettina Holtmann und Michael Sendtner. Transgenic Cre expression under control of the human NF-L promoter leads to site-specific recombination in hippocampal pyramidal cells but not in the dentate gyrus. (*in Revision*).

Lutz Schomburg, **Ulrich Schweizer**, Bettina Holtmann, Michael Sendtner und Josef Köhrle. Altered growth rate, selenium distribution, and expression of selenoproteins in mice lacking selenoprotein P. (*eingereicht bei EMBO J*).