

**Identifizierung
differenziell exprimierter Transkripte
im olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio***

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Verena D. Oehlmann

aus Stade

Köln
2002

Berichterstatter: Prof. Dr. Sigrun Korsching

Prof. Dr. Maria Leptin

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2002

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Sigrun Korsching betreut worden.

Köln, den 4. Dezember 2001



Verena Oehlmann

Teilpublikationen

A. Celik, V. Oehlmann, C. Brennan, S. I. Korsching (1999). Pathfinding in the zebrafish olfactory system. Posterbeitrag. EMBO Workshop: Axon guidance and neural plasticity, Varenna, Italy.

V. Oehlmann, H. Korte, S. I. Korsching (2000). Use of suppression subtractive hybridization strategy for discovery of differentially expressed sequences in the zebrafish olfactory bulb. Posterbeitrag. Forum of European Neuroscience, Brighton, UK.

Danksagung

Für die Überlassung der Thematik, das Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die große Unterstützung bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching.

Frau Prof. Dr. Maria Leptin danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Michael Melkonian danke ich für die Übernahme des Vorsitzes und Herrn Dr. Matthias Cramer für die Schriftführung während meiner Disputation.

Mein besonderer Dank gilt Frau Jun Li, Frau Arzu Celik und Herrn Stefan Fuss für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für die Wegbegleitung während der letzten vier Jahre.

Herrn Henning Korte und Frau Christina Sterner danke ich sehr herzlich für ihre engagierte Mitarbeit an dem Projekt.

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs „Genetik zellulärer Systeme“ möchte ich für die freundliche Aufnahme und den regen Informationsaustausch während der GK Seminare danken.

Bei Herrn Dr. Klaus Rohr bedanke ich mich sehr für hilfreiche Diskussionen über die Entwicklung des Nervensystems im embryonalen Zebrafisch.

Allen Mitgliedern des Instituts für Genetik, insbesondere Frau Silke Argo, Frau Sandra Berger, Frau Arzu Celik, Herrn Hans-Ulrich Fried, Herrn Stefan Fuss, Frau Dorothea Homeier, Frau Elke Kiehlmann, Herrn Henning Korte, Frau Annette Kraus, Herrn Sunil Kumar, Frau Jun Li, Frau Bettina Lieberoth, Herrn Andreas Rummrich, Herrn Mehmet Saltürk, Frau Tordis Tesmer und Herrn Markus Wendeler danke ich für die freundliche Aufnahme, die jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft und das nette Arbeitsklima.

Der Uni Schwimm-Mannschaft danke ich für viele schöne Abende im und ausserhalb des Wassers, die mir einen guten Ausgleich verschafften.

Ganz besonders herzlich möchte ich Bernhard Winterfeld danken, der mir nicht nur während des Schreibens dieser Arbeit mit viel Geduld zur Seite stand.

1	ZUSAMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Funktionaler Aufbau des olfaktorischen Systems	4
2.1.1	Die primäre Sinneswahrnehmung im olfaktorischen Epithel	4
2.1.2	Die Repräsentation der Geruchswahrnehmung im olfaktorischen Bulbus	5
2.2	Regeneration und Neurogenese im olfaktorischen System	7
2.2.1	Regeneration im olfaktorischen Epithel	7
2.2.2	Neurogenese im olfaktorischen Bulbus	8
2.3	Axonale Wegfindung im olfaktorischen System	8
2.3.1	Axonale Wegfindungsmechanismen und involvierte Moleküle	8
2.3.2	Prinzipien in der Zielführung olfaktorischer Axone und beteiligte Moleküle	9
2.4	Die olfaktorische Sinneswahrnehmung in <i>Danio rerio</i>	12
2.4.1	Der Zebrafisch als Modellsystem für Untersuchungen am olfaktorischen System	12
2.4.2	Aufbau des olfaktorischen Systems in <i>Danio rerio</i>	13
2.4.3	Entwicklung des olfaktorischen Systems	17
2.5	Isolierung von differentiell exprimierten Wegfindungsmolekülen im olfaktorischen System	18
2.5.1	Möglichkeiten, Wegfindungsmoleküle im olfaktorischen System zu identifizieren	18
2.5.2	Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Molekülen	19
2.5.3	Die <i>Suppression</i> subtraktive Hybridisierung (SSH)	21
2.6	Aufgabenstellung	23
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Geräte und Materialien	25
3.1.1	Geräte	25
3.1.2	Materialien	27
3.1.3	Herstellung von Lösungen	28
3.2	Arbeiten mit <i>Danio rerio</i>	28
3.2.1	Verwendete Stämme von <i>Danio rerio</i>	28
3.2.2	Haltung und Aufzucht	28
3.2.3	Isolierung der olfaktorischen Epithelien und Bulbi	29
3.2.4	Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneurone mit Zinksulfat	29
3.3	Gewebeschnitte am Kryostaten	30
3.3.1	Histologische Schnitte von Embryonen und von olfaktorischen Bulbi und Epithelien aus adulten <i>Danio rerio</i>	30
3.3.2	Präparative Schnitte zur Gewinnung von lateral und medial gelegenen Gewebe des <i>Bulbus olfactorius</i>	31
3.4	In situ Hybridisierungen	32
3.4.1	<i>In situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten	32
3.4.2	<i>In situ</i> Hybridisierung an <i>whole mount</i> Präparaten	32
3.4.3	<i>In situ</i> Hybridisierung an <i>whole mount</i> Embryonen	32

3.5	Färbungen	32
3.5.1	Immunohistochemische Detektion der Axone der Rezeptorneurone im <i>whole mount Bulbus olfactorius</i> mit dem Zns-2 Antikörper	32
3.5.2	Färbungen mit dem lipophilen Membranfarbstoff DiI und quantitative Analyse des regenerierenden glomerulären Musters	33
3.5.3	Immunohistochemische Detektion des Hu-Proteins an Schnitten	35
3.5.4	Immunohistochemische Detektion von „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) an Schnitten	35
3.5.5	TUNEL Färbung an Gewebeschnitten	36
3.6	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	38
3.6.1	Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme	38
3.6.2	Anzucht und Konservierung von Bakterien	38
3.6.3	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation durch Elektroporation	38
3.6.4	Arbeiten mit bakteriellen cDNA-Bibliotheken	38
3.7	Isolierung von Nukleinsäuren	39
3.7.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren	39
3.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	40
3.7.3	Präparation von Gesamt-RNA und DNase-Verdau	40
3.7.4	Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA	40
3.7.5	Reinigung von Nukleinsäuren	41
3.8	In vitro Arbeiten mit Nukleinsäuren	42
3.8.1	Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen	42
3.8.2	Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.8.3	Amplifikation von cDNAs mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR)	42
3.9	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren	44
3.9.1	<i>In vitro</i> Transkription und nicht-radioaktive Markierung von RNA	44
3.9.2	Markierung von DNA durch Auffüllreaktionen	44
3.9.3	Transfer von Plasmiden, cDNA und RNA auf Membranen	45
3.9.4	Hybridisierung von Nukleinsäuren	46
3.9.5	PCR Cycle Sequenzierung und Sequenzanalyse	47
3.10	cDNA Synthese und Amplifikation mit Hilfe des „SMART[®] PCR cDNA Synthesis Kits“ (Clontech)	47
3.10.1	Übersicht	47
3.10.2	cDNA Erst-Strang Synthese	49
3.10.3	cDNA Amplifikation mit <i>Long Distance</i> PCR	49
3.10.4	Herstellung von cDNA Blots für die „cDNA Southern“ Hybridisierung	50
3.11	Herstellen von subtrahierten cDNA-Bibliotheken mit Hilfe des „CLONTECH PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit“ (Clontech)	51
3.11.1	Übersicht	51
3.11.2	Herstellung der Adapter-ligierten „Tester“ cDNAs	52
3.11.3	Erste und zweite Hybridisierung	54
3.11.4	Subtraktive „Suppression PCR“ Amplifikation	54
3.11.5	Ligation und Transformation der cDNA-Bibliothek	55
3.12	Screening der subtrahierten cDNA-Bibliotheken	56
3.12.1	Übersicht	56
3.12.2	Vorbereitung der cDNA-Sonden und der negativen Hybridisierungskontrollen	57
3.12.3	Herstellung von Dot Blots für das differentielle <i>Screening</i>	57
3.12.4	Hybridisierung der Dot und „cDNA Southern“ Blots sowie die Auswertung der Hybridisierungssignale	59

3.13	Allgemeine Computer gestützte Verfahren	59
3.13.1	Sequenzanalyse und phylogenetische Analyse	59
3.13.2	Präparataufnahmen und deren Digitalisierung	60
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Untersuchung der Regeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen nach Zinksulfat vermittelter Degeneration und des regenerierenden glomerulären Musters	61
4.1.1	Eine Zinksulfat-Behandlung reduziert die neuronale Population im olfaktorischen Epithel und erhöht die Anzahl TUNEL-positiver Zellen	62
4.1.2	DiI ist ein geeigneter Farbstoff, um die Regeneration des glomerulären Musters zu beobachten	66
4.1.3	Zeitverlauf der Regeneration in Folge der Zinksulfat-vermittelten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen	69
4.1.4	Etwa acht Tage nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration ist das Einwachsen der Axone der regenerierten Rezeptorneuronen in den Bulbus maximal	72
4.1.5	Apoptose und Proliferation im olfaktorischen Bulbus an Tag 7 nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration	74
4.2	Optimierung der Gewebe- und RNA-Gewinnung aus kleinen definierten Abschnitten des Bulbus olfactorius für die Erstellung subtrahierter cDNA-Bibliotheken	76
4.2.1	Die Gefriereinbettung in TissueTek® ermöglicht die zuverlässige Gewinnung der lateralen und medialen Kappen des <i>Bulbus olfactorius</i> und die Isolierung intakter RNA	76
4.2.2	Aus in TissueTek® eingebetteten kompletten <i>Bulbi olfactorii</i> wird mit dem „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ intakte cDNA amplifiziert	78
4.2.3	Die Anzahl der für eine erfolgreiche cDNA-Amplifikation benötigten <i>Bulbus olfactorius</i> Kappen konnte abgeschätzt werden	79
4.3	Bereitstellung von cDNA für die subtraktive Hybridisierung mit Hilfe des „SMART[®] PCR cDNA Synthesis Kits“ (Clontech)	80
4.3.1	Gewinnung von Gesamt-RNA	80
4.3.2	cDNA wurde mit Hilfe des „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits“ synthetisiert und amplifiziert	81
4.4	Erstellung der subtrahierten cDNA Bibliotheken mit Hilfe des „CLONTECH PCR-Select[®] cDNA Subtraction Kits“	82
4.4.1	Für den Einsatz in die subtraktive Hybridisierung werden die cDNAs in kleinere Fragmente gespalten und mit Adaptoren ligiert	83
4.4.2	In zwei subtraktiven Hybridisierungen und zwei „Suppression“ PCRs wird <i>baktin</i> in den subtrahierten Bibliotheken reduziert	84
4.5	Differentielles Screening der subtrahierten cDNA-Bibliotheken	87
4.5.1	Experimentelles Vorgehen beim differentiellen <i>Screening</i>	88
4.5.2	Differentielles <i>Screening</i> der subtrahierten „Regenerations“- cDNA-Bibliothek	89
4.5.3	Differentielles <i>Screening</i> der subtrahierten „lateralen“ cDNA Bibliothek führte zu 28 Kandidaten _{Plasmid}	90
4.5.4	Differentielles <i>Screening</i> der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek führte zu 18 Kandidaten _{Plasmid}	92
4.6	Charakterisierung der Kandidaten_{Plasmid} aus der „lateralen“ cDNA-Bibliothek	94
4.6.1	In der subtrahierten „lateralen“ cDNA-Bibliothek wurden zehn unabhängige Kandidaten _{Plasmid} identifiziert	95
4.6.2	Die Analyse der Kandidaten _{Plasmid} wurde auf <i>Ependymin</i> beschränkt	97
4.6.3	Der Anteil differentiell exprimierter Sequenzen lag unter einem Prozent	97

4.7	Charakterisierung der Kandidaten_{plasmid} aus der „medialen“ cDNA-Bibliothek	98
4.7.1	Die Kandidaten _{plasmid} der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek setzten sich aus 15 unabhängigen Sequenzen zusammen	98
4.7.2	Fünf Fragmente der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek zeigten im „cDNA Southern“, dass sie differentiell exprimiert werden	100
4.7.3	Der Anteil differentiell exprimierter Sequenzen lag unter einem Prozent	100
4.7.4	Aus anderen subtrahierten cDNA-Bibliotheken stammende cDNA-Fragmente	101
4.8	Charakterisierung der differentiell exprimierten Kandidaten	102
4.8.1	Zusammenstellung der isolierten differentiell exprimierten mRNAs	102
4.8.2	Das Glykoprotein Ependymin ist differentiell exprimiert	105
4.8.3	Das differentielle cDNA-Fragment 8G11 konnte keinem bekannten Gen zugeordnet werden	107
4.8.4	Die differentiell verteilten cDNA-Fragmente 5D10 und 10G2 entsprechen der Histonacetyltransferase TIP60	110
4.8.5	Das differentielle cDNA-Fragment 7F5 entspricht Beta-5 Tubulin	112
4.8.6	Das differentielle cDNA-Fragment 7A10 entspricht der neutralen Endopeptidase NEP II	116
4.8.7	Das differentielle cDNA-Fragment 7C9 entspricht dem Opioidprohormon Proenkephalin	121
4.8.8	Das differentielle cDNA-Fragment M1 entspricht dem Vorläuferprotein des Neuropeptids Gonadotropin Releasing Hormone	127
4.8.9	Das differentielle cDNA-Fragment M10 entspricht einem RFamid Vorläuferprotein	129
4.8.10	Zusammenfassende Darstellung der analysierten differentiell verteilten Transkripte	135
5	DISKUSSION	137
5.1	Sechs im olfaktorischen Bulbus differentiell exprimierte Transkripte wurden identifiziert	137
5.1.1	Für die Isolierung von Transkripten mit einer geringen Differenz zwischen den Expressionsniveaus ist die <i>Suppression</i> subtraktive Hybridisierung nicht geeignet	139
5.1.2	Die Komplexität des neuronalen Gewebes vermindert die Anreicherung von differentiell exprimierten Transkripten in der subtraktiven Hybridisierung	140
5.1.3	Die Amplifikation der cDNA-Populationen vor der subtraktiven Hybridisierung reduziert die Effizienz der subtraktiven Hybridisierung	141
5.1.4	Eine erhöhte Stringenz begünstigt die Anreicherung von einigen differentiellen cDNA-Fragmenten, aber reduziert die Komplexität der Subtraktion	141
5.1.5	Das differentielle <i>Screening</i> bestimmt die Anzahl der zu untersuchenden Kandidaten	142
5.1.6	Differentiell exprimierte Transkripte werden im „cDNA Southern“ und <i>in situ</i> Hybridisierungen verifiziert	143
5.1.7	Die Voraussetzungen, differentiell exprimierte Transkripte zu isolieren, waren in beiden Ansätzen verschieden	144
5.2	Charakterisierung der Regeneration des glomerulären Musters nach der Zinksulfat-Behandlung des olfaktorischen Epithels	146
5.2.1	Die Wirkung von Zinksulfat ist auf den sensorischen Abschnitt des olfaktorischen Epithels beschränkt und betrifft die neuronale Zellpopulation	147
5.2.2	Das glomeruläre Muster erholte sich nach der Behandlung des olfaktorischen Epithels mit 3%iger Zinksulfatlösung wieder vollständig	148
5.2.3	Der Zeitverlauf der Regeneration könnte spezifisch für Teleostier sein	149
5.3	Bedeutung der differentiell exprimierten Gene im olfaktorischen System und Einordnung der neuartigen <i>D. rerio</i> Sequenzen	150
5.3.1	TIP60 und das unbekanntes Transkript	150
5.3.2	Ependymin im olfaktorischen System von <i>Danio rerio</i>	151
5.3.2.1	Die Funktion von Ependymin	151
5.3.2.2	Ependymin wird in der <i>Leptomeninx</i> um die olfaktorischen Bulbi exprimiert	152
5.3.2.3	Die Redundanz von <i>ependymin</i> in der subtrahierten cDNA-Bibliothek war sehr hoch	152
5.3.3	Beta 5 Tubulin im olfaktorischen System von <i>Danio rerio</i>	152
5.3.3.1	Die Funktion der Beta-Tubulin Genfamilie	152

5.3.3.2	Beta 5 Tubulin wird während des Wachstums und der Differenzierung von neuronalem Gewebe exprimiert	153
5.3.4	Das Neprilysin/ Enkephalinsystem im olfaktorischen System von <i>Danio rerio</i>	153
5.3.4.1	Die Funktionen von Neprilysinen und Enkephalinen	153
5.3.4.2	Im olfaktorischen wird NEP II in der gesamten Körnerzellschicht exprimiert, während Proenkephalin nur in einer Subpopulation nachgewiesen wurde	154
5.3.4.3	In Teleostier ist NEP II das zweite identifizierte Mitglied der Neprilysin-Like Endopeptidasen Genfamilie	155
5.3.4.4	NEP II wird im olfaktorischen Bulbus in verschiedenen Isoformen exprimiert	155
5.3.4.5	Die Expression im olfaktorischen Bulbus und in anderen Gehirnregionen unterscheidet sich von den bekannten Expressionsmustern aus Säugetieren	155
5.3.4.6	Das Leu-Enkephalin im Proenkephalin unterstreicht die „frühe“ Entwicklung des Met- und Leu-Enkephalin enthaltenden Vorläuferpeptids	157
5.3.4.7	Die Expression von Proenkephalin stimmt in Teilaspekten mit den beschriebenen Expressionen in Säugetieren und Fischen überein	157
5.3.5	sGnRH und RFamid Neuropeptid im olfaktorischen System von <i>Danio rerio</i>	158
5.3.5.1	Die Funktionen von GAP, sGnRH und RFamid-ähnlichen Peptiden	158
5.3.5.2	In den Ganglien des terminalen Nervs werden das sGnRH und RFamid Vorläuferprotein coexprimiert	159
5.3.5.3	Die Expression von sGnRH und RFamid Vorläuferprotein weisen darauf hin, dass die GnRH-exprimierenden Neuronen im Hypothalamus nicht aus der olfaktorischen Plakode stammen	161
5.3.5.4	Das Einfügen eines Nukleinsäurerestes in M1 ermöglicht das Ablesen von funktionellem GnRH und GAP	162
5.3.5.5	Das <i>Danio rerio</i> RFamide-Like Neuropeptid kodiert für ein Teleostier Homolog zum Neuropeptid FF Vorläufer	163
5.4	Ausblick	163
6	LITERATUR	164
7	ANHANG	177

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	Vergleich der Repräsentation der Sinneswahrnehmungen: Sehen, Hören, Riechen.	5
Abb. 2-2:	Schematische Darstellung der Kräfte in der Wegfindung von Axonen.	9
Abb. 2-3:	Axonale Wegfindung der Riechsinneszellen in den olfaktorischen Bulbus.	10
Abb. 2-4:	Das olfaktorische System des Zebrafischlings.	13
Abb. 2-5:	Morphologischer und funktionaler Aufbau des olfaktorischen Epithels.	14
Abb. 2-6:	Schematische Darstellung der horizontalen Schnitte durch den olfaktorischen Bulbus und das Telencephalon (entnommen aus Wullimann <i>et al.</i> , 1996).	16
Abb. 2-7:	Schematische Darstellung der „PCR-Select cDNA Subtraction“.	22
Abb. 3-1:	Vergleich von zwei Applikationstechniken für 3 %-iger Zinksulfatlösung.	30
Abb. 3-2:	Ausrichtung des olfaktorischen Bulbus zur Gewinnung der lateralen und medialen Gewebeabschnitte.	31
Abb. 3-3:	Optimierung der DiI-Applikation mit Hilfe des „DiI-Bades“.	34
Abb. 3-4:	Optimierung des TUNEL-Protokolls für Gefrierschnitte des olfaktorischen Bulbus und Epithels.	37
Abb. 3-5:	Schematische Darstellung der Primer- und <i>Insert</i> -Orientierungen in der 5'-RACE Reaktion.	43
Abb. 3-6:	Schematische Darstellung der cDNA Synthese mit Hilfe des „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits“ (Clontech, Heidelberg).	48
Abb. 3-7:	Optimierung der PCR-Parameter für die Amplifikation von cDNA aus dem lateralen Bulbusabschnitt.	51
Abb. 3-8:	Sequenzen der Adaptoren und der PCR Primer in der SSH.	52
Abb. 4-1:	TUNEL-Färbung am olfaktorischen Epithel zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneurone.	63
Abb. 4-2:	Immunohistochemische Detektion neuronaler Zellen im olfaktorischen Epithel mit dem Hu-Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneurone.	65
Abb. 4-3:	Färbung des glomerulären Musters mit Hilfe des „DiI-Bades“ und anschließende immunohistochemische Reaktion mit dem Zns-2 Antikörper beispielhaft an Tag 3 nach Zinsulfat-Behandlung.	67
Abb. 4-4:	Zeitverlauf der Regeneration des glomerulären Musters visualisiert mit anterograder DiI-Färbung.	70
Abb. 4-5:	Regenerationskurve des glomerulären Musters.	72
Abb. 4-6:	TUNEL-Färbung und immunohistochemische Detektion von PCNA an Gefrierschnitten des <i>Bulbus olfactorius</i> an Tag 7 nach Zinksulfat vermittelter Degeneration.	74
Abb. 4-7:	Northern Blot Membran mit Gesamt-RNA von eingefrorenem Gehirn, das in TissueTek® eingebettet wurde.	76
Abb. 4-8:	Analyse zur Integritätsabschätzung der cDNA und zur Optimierung der PCR-Parameter.	77
Abb. 4-9:	Schematische Darstellung der medialen und lateralen Bulbuskappe als Kugelabschnitte.	78

Abb. 4-10:	Analyse zur Optimierung der PCR-Parameter für die cDNA, die aus dem lateralen und medialen Abschnitt des olfaktorischen Bulbus gewonnen wurde.	80
Abb. 4-11:	Ligationseffizienzanalyse am Beispiel der experimentellen „Tester“ <i>Medial_{T-1}</i> und <i>Medial_{T-2}</i> , <i>Lateral_{T-1}</i> und <i>Lateral_{T-2}</i> .	83
Abb. 4-12:	Produkte der ersten <i>Suppression</i> PCR von den Kontrollen <i>Muskel/174-Bib</i> (Spur 1), „PCR Control Subtracted cDNA“ (Spur 2), und <i>Muskel/174-C</i> (Spur 3).	84
Abb. 4-13:	PCR-Produkte der experimentellen Bibliotheken nach der primären und sekundären „Suppression“ PCR in einem 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt.	85
Abb. 4-14:	Semiquantitative PCR zur Analyse der Subtraktionseffizienz am Beispiel von A) <i>Lateral-Bib</i> und B) <i>Medial-Bib</i> .	85
Abb. 4-15:	Schematische Darstellung des subtraktiven <i>Screenings</i> .	87
Abb. 4-16:	Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek <i>Reg-Bib</i> mittels PCR-Produkt Blot am Beispiel von PCR Dot Blot 9.	88
Abb. 4-17:	Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek <i>Reg-Bib</i> mittels PCR-Produkt Blot am Beispiel von Dot Blot 10.	89
Abb. 4-18:	Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek <i>Lateral-Bib</i> am Beispiel der Kolonie Dot Blot Filter 4.	90
Abb. 4-19:	Überprüfung der im Kolonie Dot Blot differentiell hybridisierenden Klone durch einen Plasmid Dot Blot.	91
Abb. 4-20:	Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek <i>Medial-Bib</i> mittels Kolonie Dot Blot.	91
Abb. 4-21:	Überprüfung der im Kolonie Dot Blot differentiell hybridisierenden Klone durch einen Plasmid Dot Blot.	92
Abb. 4-22:	Ergebnis der „cDNA Southern“ Analyse für die cDNA-Fragmente, die mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondieren.	102
Abb. 4-23:	Schematische Darstellung der mit <i>ependymin</i> korrespondierenden cDNA-Fragmente.	103
Abb. 4-24:	Lokalisation der <i>ependymin</i> -Transkripte im olfaktorischen Bulbus von adulten Zebrabärblingen mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierung.	104
Abb. 4-25:	Schematische Darstellung des 8G11 cDNA-Fragments und homologer Sequenzen	105
Abb. 4-26:	Lokalisation der mit 8G11 korrespondierenden Transkripte im adulten und embryonalen Zebrabärbling mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierungen.	107
Abb. 4-27:	Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 5D10/10G2 (TIP60).	109
Abb. 4-28:	5'-RACE des zu 7F5 korrespondierenden Transkripter und Überprüfung der RACE-Produkte in einer Hybridisierung	111
Abb. 4-29:	Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 7F5 (Beta-5 Tubulin).	112
Abb. 4-30:	Lokalisation des <i>beta-5 tubulin</i> Transkriptes im adulten und embryonalen Zebrabärbling mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierungen.	113
Abb. 4-31:	Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 7A10 (NEP II).	116
Abb. 4-32:	Lokalisation des <i>NEP II</i> Transkriptes im adulten und embryonalen Zebrabärbling mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierungen.	118
Abb. 4-33:	Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 7C9 (Proenkephalin).	121
Abb. 4-34:	Lokalisation des <i>proenkephalin</i> Transkriptes im adulten und embryonalen Zebrabärbling mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierungen.	122

Abb. 4-35:	Lokalisation der NEP II und der <i>proenkephalin</i> Transkriptes im adulten Zebrabärbling mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierungen.	124
Abb. 4-36:	Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von M1 (sGnRH Vorläuferprotein).	126
Abb. 4-37:	Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von M10 (RFamid Vorläuferprotein).	129
Abb. 4-38:	Lokalisation der <i>sGnRH</i> und <i>RFamid Vorläuferprotein</i> Transkripte im olfaktorischen System von adulten Zebrabärblingen mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierungen.	131
Abb. 4-39:	Lokalisation der <i>sGnRH</i> und <i>RFamid Vorläuferprotein</i> Transkripte in <i>whole mount</i> Präparaten.	131
Abb. 4-40:	Lokalisation der <i>sGnRH Vorläuferprotein</i> Transkripte in 48 und 72 hpf Zebrabärblingen mit Hilfe von <i>whole mount in situ</i> Hybridisierungen.	132
Abb. 4-41	Lokalisation der <i>RFamid Vorläuferprotein</i> Transkripte in 48 und 72 hpf Zebrabärblingen mit Hilfe von <i>whole mount in situ</i> Hybridisierungen.	132
Abb. 5-1	Schematische Darstellung zur Wirkung der E.nkephaline.	153
Abb. 5-2	Schematische Darstellung des Verlaufs des terminalen Nervs im Vorder- und Mittelhirn von <i>Danio rerio</i> in der ventralen Ansicht und hypothetisches Modell zur Wirkung von GnRH am terminalen Nerv.	153

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1	Vergleichende Übersicht zu den Dot Blot Verfahren, die im differentiellen Screening verwendet werden.	58
Tab. 4-1	Ergebnis der Nukleinsäure Sequenzanalyse für die Kandidaten _{plasmid} aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek <i>Lateral-Bib</i> .	94
Tab. 4-2	Vorkommen bzw. Funktion der lateralen Kandidaten _{plasmid} .	93
Tab. 4-3	Zusammenstellung der in den einzelnen Schritten analysierten cDNA-Fragmente aus der subtrahierten „lateralen“ cDNA-Bibliothek.	96
Tab. 4-4	Ergebnis der Nukleinsäure Sequenzanalyse für die Kandidaten _{plasmid} aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek <i>Medial-Bib</i> .	97
Tab. 4-5	Vorkommen bzw. Funktion der medialen Kandidaten _{plasmid} .	98
Tab. 4-6	Zusammenstellung der Effizienzen während der Identifizierung differentiell exprimierter Sequenzen aus der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek.	99
Tab. 4-7	Ergebnis der Homologiesuche auf Proteinebene für die differentiell exprimierten Transkripte.	101

1 Zusammenfassung

Das olfaktorische System unterscheidet sich durch seine nicht-topologischen Projektionen grundlegend von anderen sensorischen Systemen. Riechsinneszellen, die den gleichen olfaktorischen Rezeptor exprimieren, liegen verteilt im olfaktorischen Epithel, aber ihre Fortsätze konvergieren im olfaktorischen Bulbus in sphärischen Neuropilstrukturen, den Glomeruli. Diese sind stereotyp und invariant zwischen Individuen einer Spezies angeordnet und „übersetzen“ so Geruchsinformation in ein räumliches Aktivitätsmuster. Bisher ist nur bekannt, dass die olfaktorischen Rezeptorproteine selbst instruktiv an der axonalen Wegfindung beteiligt sind, aber nicht die einzigen Faktoren sein können. Es wird angenommen, dass zumindest einige an der Wegfindung beteiligte Moleküle differentiell verteilt sein sollten. Der Teleostier *Danio rerio* verfügt im Vergleich zu Säugetieren über ein qualitativ vergleichbares jedoch quantitativ reduziertes olfaktorisches System und ist deswegen ein gutes Modellsystem.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe der *Suppression* subtraktiven Hybridisierung differentiell exprimierte Transkripte des olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* identifiziert werden. Der erste Ansatz sollte zu Transkripten führen, die während der Regeneration der glomerulären Projektionen hochreguliert werden. Im Rahmen dieses Teils wurde die Zinksulfat-vermittelte Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen charakterisiert. Im olfaktorischen Epithel erreichte sie ihren Höhepunkt etwa acht Stunden nach der Applikation. Die Degeneration des glomerulären Musters erwies sich als reversibel, so dass es acht Tage nach der Behandlung zu 50% und nach 28 Tagen vollständig wiederhergestellt war. Die Analyse der subtrahierten „Regenerations“ cDNA-Bibliothek ergab, dass sie nur sehr wenige differentiell exprimierte Transkripte enthielt.

Für den zweiten Ansatz wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, dass die Isolierung von intakter RNA aus sehr kleinen definierten Bereichen des olfaktorischen Bulbus erlaubte. Es wurden zwei subtrahierte cDNA-Bibliotheken konstruiert, die laterale bzw. mediale Transkripte angereichert hatten. vermehrt im lateralen Bulbusabschnitt exprimiert wurden, und in der anderen welche, die häufiger im medialen Bulbusabschnitt vorkamen. Es gelang hier, sechs differentiell exprimierte Transkripte zu identifizieren und mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen zu charakterisieren. Darunter waren das Glykoprotein Ependymin, das in der Leptomenix exprimiert wird, die aus morphologischen Gründen zu einem größeren Anteil in der lateralen Gewebefraktion vorliegt. Das Transkript Beta-5 Tubulin wurde in der ventrikulären Proliferationszone und in den Körnerzellen detektiert. NEP II wurde ebenfalls in den Körnerzellen nachgewiesen. Das Prohormon Proenkephalin wurde in einer medial orientierten Subpopulation der Körnerzellen exprimiert und zeigte, dass die subtraktive Hybridisierung in der Lage war, auch seltene differentiell exprimierte Transkripte zu identifizieren. Darüber hinaus wurden sGnRH und RFamid, die aus einem vergleichbaren Ansatz stammten (Korte, 2001), in den Ganglienzellen des terminalen Nervs lokalisiert. Unter den identifizierten differentiell exprimierten Transkripten waren zwar keine Wegfindungsmoleküle, aber Moleküle, die bisher noch nicht für den Zebraäbbling beschrieben worden waren, und die an der Modulation der synaptischen Aktivierung durch Geruchsstoffe und der Neurogenese der Körnerzellen beteiligt sind.

Abstract

The olfactory system differs from other sensory systems by its non-topological projections. The processes of olfactory receptor neurons that do express the same olfactory receptor protein are scattered within the olfactory epithelium but converge as they project to the olfactory bulb in spherical neuropile structures, the glomeruli. They are stereotyped and invariant between individuals of one species and therefore „translate“ information about odorants into a spatial code of activity. So far, it is only the olfactory receptor proteins themselves have been shown to play an instructive role in the axonal guidance process. It is assumed that some of the cues present are expressed in gradients. The olfactory system of the teleost *Danio rerio* is qualitatively comparable but quantitatively reduced compared to that of mammals, so that it serves as a good model.

During this thesis differentially expressed transcripts which are present in the olfactory bulb of zebrafish should be identified using suppression subtractive hybridization. In the first set of experiments transcripts should be identified which are up-regulated during the regeneration of the glomerular structures. Using zincsulfat mediated degeneration of the olfactory receptor neurons the maximum of the degeneration in the olfactory epithelium was shown to be eight hours after treatment. In the olfactory bulb, the degeneration of the glomerular pattern appeared to be reversible and was recovered 50% eight days after treatment and completely restored after 28 days. The analyses of the constructed subtracted cDNA library contained only very few differentially expressed sequences.

In the second set of experiments, first, a procedure has been established which allows to isolate intact mRNA from very small but defined regions of the olfactory bulb. Two subtracted libraries were constructed, that each was enriched by laterally or medially expressed sequences, respectively. Six sequences which show a differential expression were further characterized by *in situ* hybridization. Among them the glycoprotein ependymin was found, which is expressed in the leptomeninx that occurred stronger in the lateral portion for morphological reasons. The transcripts of beta-5 tubulin were detected in the granule cells and the zone where they originate, the ventricular proliferation zone. NEP II was also prominent in the granule cells. The propeptide proenkephalin was expressed in a small medially located subpopulation of the granule cells. Its identification showed that the subtractive hybridization is also able to isolate rarely expressed sequences. Moreover, sGnRH and RFamid precursor proteins, both originally isolated by H. Korte (2001) in a similar approach, were shown to colocalize in the ganglions of the terminal nerve. Among the identified differentially expressed sequences there were no guidance cues identified, but molecules which have not been described before for the zebrafish. Some of them might be involved in the modulation of the synaptic activation in the olfactory bulb and in the neurogenesis of the granule cells.

2 Einleitung

Die Repräsentation der Geruchsinformation unterscheidet sich grundlegend von der Informationsweiterleitung des Sehens, Hörens und Tastens. In diesen sensorischen Systemen wird die periphere sensorische Sinneswahrnehmung unter Beibehaltung der Nachbarschaftsbeziehungen der beteiligten Neuronen in das zentrale Nervensystem übermittelt (zusammengefasst in Kandel *et al.*, 2000). Im olfaktorischen System dagegen wird die Anordnung der peripheren olfaktorischen Sinneszellen nicht beibehalten. Hier liegen verschiedene Riechsinneszelltypen vermischt im olfaktorischen Epithel, während die Projektionen von Riechsinneszellen eines Typs im olfaktorischen Bulbus, der ersten Schaltstelle im zentralen Nervensystem, an bestimmten Positionen konvergieren (Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994). Die Etablierung der definierten, nicht-topologischen Projektionen von bis zu 1000 verschiedenen Riechsinneszelltypen in Säugetieren stellt eine interessante Herausforderung an den Wegfindungsmechanismus dar. Eine wichtige Funktion während der axonalen Wegfindung konnte überraschenderweise für die olfaktorischen Rezeptorproteine selbst nachgewiesen werden (Mombaersts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Wie sie molekular Einfluss auf die Wegfindung der Riechsinneszellfortsätze nehmen und welche Wegfindungsmoleküle im olfaktorischen Bulbus als Liganden beteiligt sind, ist zur Zeit nicht bekannt und Gegenstand der aktuellen olfaktorischen Forschung (zusammengefasst in Mombaerts, 1999).

Das olfaktorische System von *Danio rerio* ist zwar mit seinen etwa 100 verschiedenen olfaktorischen Rezeptoren in der Komplexität reduziert (Barth *et al.*, 1996), muss jedoch prinzipiell das gleiche Wegfindungsproblem lösen. Deswegen ist es ein geeignetes Modellsystem, um Moleküle zu identifizieren, die an der Wegfindung beteiligt sind (Korsching *et al.*, 1997).

An der Wegfindung beteiligte Moleküle sollten im olfaktorischen Bulbus differentiell exprimiert werden. Daher könnte die Suche nach differentiell exprimierten Transkripten zur Identifizierung von Wegfindungsmolekülen führen und zum Verständnis der positionskonservierten Projektionen beitragen. In der vorliegenden Studie sollten zur Isolierung von differentiell exprimierten Molekülen im olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* zwei Ansätze verfolgt werden. In einem ersten Ansatz sollte die Regulation und in einem zweiten die differentielle Lokalisation der hypothetischen Wegfindungsmoleküle genutzt werden, indem entsprechend subtrahierte cDNA-Bibliotheken erstellt wurden. Unter den differentiell exprimierten Transkripten wurde ein erhöhter Anteil von Molekülen, die in die Wegfindung involviert sind, erwartet.

2.1 Funktionaler Aufbau des olfaktorischen Systems

2.1.1 Die primäre Sinneswahrnehmung im olfaktorischen Epithel

Die primären Sinneszellen des olfaktorischen Systems sind die olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN). Sie sind im olfaktorischen Epithel lokalisiert und stellen mit ihren Cilienbesetzten Dendriten einen Kontakt mit der Außenwelt her, während ihre Axone in den *Bulbus olfactorius* projizieren. Neben dem olfaktorischen Epithel gibt es bei höheren Vertebraten mit dem vomeronasalen Epithel ein weiteres Geruchstoff-wahnehmendes Epithel, dessen Sinneszellen an ihren Dendriten Mikrovilli tragen und in den akzessorischen Bulbus projizieren.

Im olfaktorischen Epithel wird die Geruchswahrnehmung molekular durch die olfaktorischen Rezeptorproteine vermittelt, die zu der Familie der G-Protein-gekoppelten sieben Transmembrandomänen Rezeptoren gehören (Buck und Axel, 1991). Die Genfamilie der olfaktorischen Rezeptorproteine umfasst bei den Säugern etwa 1 % des gesamten Genoms (z.B. etwa 1000 in der Ratte) und ist dadurch die größte bisher im Vertebratengenom identifizierte Familie (zusammengefasst in Buck, 2000).

Einzelne Aspekte der Geruchsstoffmoleküle werden vermutlich innerhalb des Transmembranbereiches erkannt (Singer und Shephard, 1994). Diese Aspekte beinhalten allgemeine Struktureigenschaften wie die Ladung und die Form (Araneda *et al.*, 2000). Die hohe Anzahl unterschiedlicher olfaktorischer Rezeptoren spiegelt vermutlich die Diversität der detektierbaren Strukturen wider. Durch die für jeden Geruchstoffs spezifischen Kombinationen aus aktivierten Rezeptoren ist die Anzahl der differenziert wahrnehmbaren Geruchstoffe außerordentlich hoch (zusammengefasst in Buck, 2000).

Die Bindung von Geruchstoffen führt über die Riechzell-spezifischen Signaltransduktionsmoleküle $G\alpha_{olf}$ -Protein und Adenylatzyklase Typ III zur Aktivierung des CNG-Kanals, wodurch die Membrandepolarisation eingeleitet wird (zusammengefasst in Firestein, 1992).

Aufgrund der Ergebnisse aus *in situ* Hybridisierungsstudien (Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993) und *RT PCR*-Experimenten an einzelnen Riechsinneszellen (Malnic *et al.*, 1999) wird allgemein angenommen, dass jede Riechsinneszelle nur einen (oder wenige) Geruchsrezeptor(en) exprimiert (zusammengefasst in Mombaerts, 1999). Der Auswahlmechanismus ist nicht bekannt; allerdings deutet die Expression von nur einem Allel (Chess *et al.*, 1994) und die Organisation der Rezeptorproteine in Clustern (Glusman *et al.*, 2000) auf Parallelen zum Immunsystem hin (zusammengefasst in Mombaerts, 1999).

Das olfaktorische Epithel von Säugetieren ist in vier Zonen (1 bis 4) aufgeteilt, in denen nicht-überlappende Teilmengen der Geruchsrezeptoren exprimiert werden (Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993; Sullivan *et al.*, 1996). Innerhalb einer Zone sind die ORN eines Typs stochastisch verteilt und projizieren in eine der vier Zonen (I bis IV) des olfaktorischen Bulbus (Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; vgl. 2.3.2). Dort konvergieren die Axone aller ORN

Axone eines Typs an zwei Positionen in funktionalen Einheiten, den Glomeruli, und bilden mit den sekundären Projektionsneuronen Synapsen (Mombaerts *et al.*, 1996; vgl. 2.3.2).

Die kontinuierliche Regeneration der ORN (Graziadei und Monti Graziadei, 1979) führt dazu, dass sowohl die Auswahl der olfaktorischen Rezeptoren in den ORN als auch die axonale Wegfindung der ORN in den olfaktorischen Bulbus Prozesse sind, die lebenslang im Tier stattfinden. Für eine retrograde Spezifizierung der Rezeptoren gibt es keine Hinweise, denn sie werden auch in Abwesenheit des olfaktorischen Bulbus ausgewählt (Sullivan *et al.*, 1995).

Das vomeronasale System verfügt mit der V1R- und der V2R-Genfamilie über zwei Klassen von Geruchsstoffrezeptoren (Dulac und Axel, 1995; Matsunami und Buck, 1997). Die Riechsinneszellen in diesem System tragen dendritische Mikrovilli und sind in einer oberen und einer unteren Zone organisiert. Die VR1-Rezeptorproteine werden gemeinsam mit den G α i2-Proteinen in der oberen Zone exprimiert und die VR2-Rezeptorproteine mit den G α o-Proteinen in der unteren Zone (Halpern *et al.*, 1995). Auch im vomeronasalen System wird angenommen, dass in jeder Riechsinneszelle nur ein Rezeptorproteintyp exprimiert wird. Im Gegensatz zum olfaktorischen System projizieren die Riechsinneszellen eines Typs hier jedoch in 10 bis 30 Glomeruli des akzessorischen Bulbus und einzelne Glomeruli werden von verschiedenartigen ORN innerviert (Belluscio *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999).

2.1.2 Die Repräsentation der Geruchswahrnehmung im olfaktorischen Bulbus

Bei der Repräsentation der Geruchsinformation im olfaktorischen Bulbus fällt im Gegensatz zum visuellen und auditorischen System der Verlust der Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den ORN während der Projektion in den olfaktorischen Bulbus auf (Abb. 2-1; zusammengefasst in Kandel, 2000).

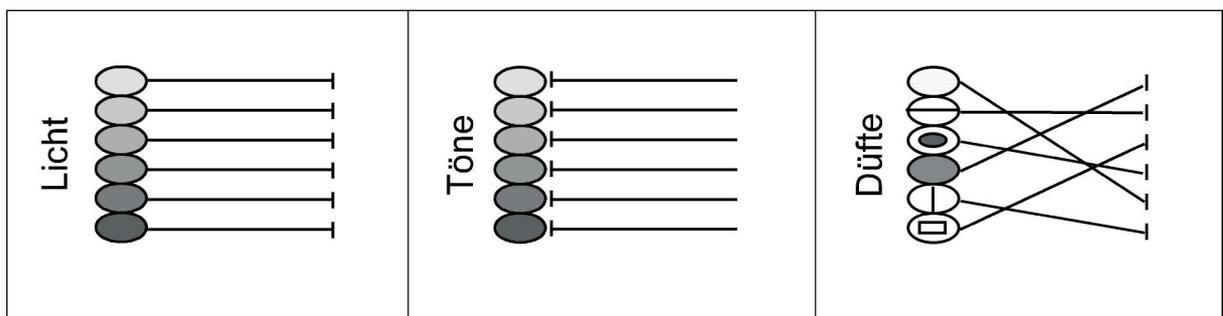


Abbildung 2-1: Vergleich der Repräsentation der Sinneswahrnehmungen: Sehen, Hören, Riechen. Im visuellen System wird die räumliche Information in der Retina zweidimensional wahrgenommen und topologisch in das zentrale Nervensystem weitergeleitet. Im auditorischen System erregt der Stimulus gemäß seiner Frequenz die primären Sinneszellen der Cochlea maximal an einer bestimmten Position. Die Cochlea ist topologisch innerviert. Im olfaktorischen System ist der Stimulus multidimensional und aktiviert im olfaktorischen Epithel verteilt liegende Sinneszellen. Die Projektionen in das ZNS sind nicht-topologisch.

Während im visuellen und auditorischen System die Position der aktivierten Sinneszellen Informationen über den Stimulus enthält, ist die Position eines ORN stochastisch geprägt und trägt keine Geruchsinformation. Bei der olfaktorischen Wahrnehmung entsteht erst auf der Ebene des olfaktorischen Bulbus durch die Anordnung der Glomeruli eine räumliche Information bzw. Informationen enthaltene glomeruläre Nachbarschaftsbeziehungen.

Die Axone der ORN projizieren durch den olfaktorischen Nerv in den in Zellschichten organisierten olfaktorischen Bulbus, wo sie in der äußeren Nervenschicht bis zu ihren Terminationsorten laufen. In der darunter liegenden Schicht bilden sie dann mit Mitralzellen synaptische Verschaltungseinheiten, die sogenannten Glomeruli. In der Ratte finden sich etwa 1800 Glomeruli im olfaktorischen Bulbus (zusammengefasst in Kandel, 2000). Die neuropilen Glomeruli sind morphologisch separate Strukturen, die in höheren Vertebraten von Glia und periglomerulären Zellen umgeben sind und neben den Mitralzellen von den Pinselzellen innerviert werden. Die Mitralzellen wiederum projizieren in den olfaktorischen Cortex. Ihr Signal wird durch die Verschaltung mit Körnerzellen, die in der innersten Schicht des olfaktorischen Bulbus zu finden sind, modifiziert (zusammengefasst in Mori, 1999).

Die Axone von allen ORN eines Typs konvergieren auf jedem der beiden olfaktorischen Bulbi in ein bis drei Glomeruli, die entlang einer imaginären Achse spiegelbildlich zueinander liegen (Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts *et al.*, 1996). Dabei wird die Zonenzugehörigkeit der ORN durch die Lokalisierung der Glomeruli in einer der vier Zonen im olfaktorischen Bulbus entlang der dorso-ventralen Achse wiedergespiegelt (Abb. 2-3). Aber nicht nur die Projektionszone ist determiniert, sondern auch die relativen Positionen der Glomeruli untereinander sind auf drei bis vier Glomerulusdurchmesser festgelegt (Schaefer *et al.*, 2001; Strotmann *et al.*, 2001), so dass eine interindividuell invariante topographische Karte für die Geruchsinformation entsteht (Baier und Korsching, 1994; Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994). Sie transformiert auf der Ebene des olfaktorischen Bulbus die Geruchsinformation in eine räumliche Information, die an höhere cortikale Zentren weitergeleitet wird.

Bisher ist wenig über die axonale Wegfindung der olfaktorischen Rezeptorneuronen und die Etablierung der präzisen und nicht-topologischen Karte bekannt. Neben der Zonenzugehörigkeit besitzen die olfaktorischen Rezeptorproteine selbst eine wichtige Rolle, indem sie die anterior-posteriore Position der Glomeruli bestimmen (Mombaerts *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Die Identifizierung von weiteren Wegfindungsmolekülen im olfaktorischen Bulbus könnte zur Aufklärung des Mechanismus beitragen.

2.2 Regeneration und Neurogenese im olfaktorischen System

2.2.1 Regeneration im olfaktorischen Epithel

Die kontinuierliche Regeneration

Eine Besonderheit des olfaktorischen Systems ist, dass die sensorischen Neuronen kontinuierlich von den basal im Epithel liegenden Vorläuferzellen („globöse“ Basalzellen) nachgebildet werden (Graziadei und Monti Graziadei, 1979; Caggiano *et al.*, 1994). Sie reifen auf ihrem vertikalen Weg zur sensorischen Zellschicht (Farbman, 1990; Graziadei and Monti Graziadei, 1979). Reife ORN exprimieren das olfaktorische Markerprotein (OMP) und besitzen über ihren apikalen Dendriten Kontakt mit der Umwelt sowie über ihr unverzweigtes Axon synaptischen Kontakt mit dem olfaktorischen Bulbus (Farbman und Margolis, 1980).

Die Lebensspanne der ORN und ihre Neurogenese hängen von Umwelteinflüssen ab (Calof *et al.*, 1996; Hinds *et al.*, 1984). Sie sind eng miteinander verknüpft, so dass von einem Regenerationsprozeß ausgegangen wird (zusammengefasst in Murray und Calof, 1999). Die kontinuierliche Neubildung von ORN weist daraufhin, dass Wegfindungsmoleküle, die an der korrekten Zielfindung im olfaktorischen Bulbus beteiligt sind, auch im adulten Tier exprimiert werden.

Die Regeneration wird durch chemische Störung des olfaktorischen Systems induziert

Die regenerative Kapazität des olfaktorischen Epithels wurde in vielen Studien nach chemischer Schädigung (Zinksulfat, Triton X-100: z.B. Verhaagen *et al.*, 1990) oder Methylbromid (z.B. Schwob *et al.*, 1995), nach der Axotomie des olfaktorischen Nervs (Graziadei und Graziadei, 1979), nach Unterbrechung der synaptischen Kontakte durch Entfernung des olfaktorischen Bulbus (Holocomb *et al.*, 1995) oder dem Entzug des sensorischen Signals durch einen Verschluss der Nasenöffnung untersucht (Farbman *et al.*, 1988).

Um das Einwachsen von neu gebildeten Nervenfortsätzen der ORN in den olfaktorischen Bulbus zu beobachten, bieten sich die chemische Läsion und das Durchtrennen des olfaktorischen Nervs an, da beide zu einer Stimulierung der Proliferation führen (Schwob *et al.*, 1995; Schwarz Levey *et al.*, 1991). Allerdings kann das glomeruläre Muster nach der Axotomie verändert sein (Costanzo, 2000), während es sich nach der reversiblen chemischen Läsion wieder vollständig erholt (Cummings *et al.*, 2000).

Durch die chemische Behandlung sterben die meisten ORN ab und werden anschließend, sofern die Basalzellen unbeschädigt sind, mit einer erhöhten Proliferationsrate wieder hergestellt (Schwob *et al.*, 1995). Da die neu gebildeten Axone der ORN ohne die Vorlage von vorhandenen axonalen Verbindungen das glomeruläre Muster im olfaktorischen Bulbus wieder aufbauen, wird vermutet, dass sie von Wegfindungsmolekülen geleitet werden (Cummings *et al.*, 2000). Wie oben beschrieben, werden diese Moleküle vermutlich während der gesamten Lebensspanne der Tiere exprimiert, könnten jedoch während der induzierten Regeneration besonders hochreguliert werden.

Da während der Regeneration eine große Anzahl ORN-Terminalien in den olfaktorischen Bulbus einwächst, ähnelt die Situation im olfaktorischen Bulbus der Ontogenese. Dieses wird durch die erhöhte Expression von β -Amyloid Vorläuferprotein in den Mitralzellen und die Induktion der Neurestin-Expression in den Pinselzellen bestätigt, die auch während der Entwicklung dort vorliegt (Otaki *et al.*, 1999; Struble *et al.*, 1998).

2.2.2 Neurogenese im olfaktorischen Bulbus

Im olfaktorischen Bulbus von Säugetieren werden die Interneuronen (Körnerzellen und periglomeruläre Zellen) kontinuierlich nachgebildet (Kaplan *et al.*, 1985). Sie gehen aus Vorläufern hervor, die in der subventrikulären Zone (SVZ) gebildet werden und mit dem rostralen Wanderungsstrom in die Körnerzellschicht des olfaktorischen Bulbus wandern (Lois und Alvarez-Buylla, 1994). Die Gesamtzahl der Interneuronen wird im olfaktorischen Bulbus über den programmierten Zelltod der Körner- und periglomerulären Zellen reguliert (Kaplan *et al.*, 1985). Da jedoch bisher nicht gezeigt werden konnte, dass die Anzahl der Körnerzellen im olfaktorischen Bulbus die Proliferation in der SVZ beeinflusst, wird die Bildung neuer Körnerzellen als Neurogenese und nicht als Regeneration eingestuft (zusammengefasst in Murray und Calof, 1999).

2.3 Axonale Wegfindung im olfaktorischen System

2.3.1 Axonale Wegfindungsmechanismen und involvierte Moleküle

Neuronale Wachstumskegel überbrücken entlang spezifischer Pfade lange Distanzen, um in ihren Zielregionen Synapsen zu bilden (zusammengefasst in Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Sie exprimieren dazu ein bestimmtes Rezeptorrepertoire und können so Wegfindungsmoleküle detektieren, die ein verändertes Wachstumsverhalten induzieren. Bildlich gesehen werden sie gleichzeitig „abgestoßen“, „angezogen“ und auf bestimmte Bahnen „beschränkt“, abhängig davon, ob der Stimulus anziehend, repulsiv, permissiv oder inhibitorisch wirkt und ob er im Gewebe frei oder gebunden vorliegt (Abb. 2-2).

In die Vermittlung der Wegfindungsmechanismen sind neuronale Zelladhäsionsmoleküle der Immunoglobulin Superfamilie (Ig-CAMs), Netrine mit ihren DCC/UNC-5 ähnlichen Rezeptoren, Semaphorine mit ihren Neuropilin- und Plexin-Rezeptoren, Slits und die Robo-Rezeptoren, Rezeptorprotein Tyrosin-Kinasen mit ihren Liganden und Rezeptorprotein Tyrosin-Phosphatasen involviert (zusammengefasst in Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; van Vector und Flanagan, 1999). Die klassische Rezeptor/Ligand Funktionalität (Signalvermittler/Signal) wird in diesen Molekülklassen nicht streng eingehalten. Stattdessen treten homo- und heterophile Interaktionen, Liganden mit Rezeptoreigenschaften und bidirektionale Sig-

nalweiterleitungen auf (zusammengefasst in Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Mellitzer *et al.*, 2000).

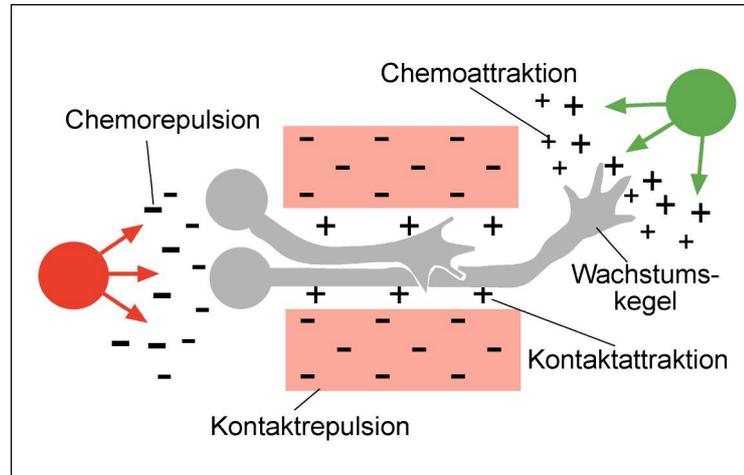


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Kräfte in der Wegfindung von Axonen. Mechanistisch lassen sich die hier wirkenden Kräfte in vier Klassen einteilen: weitreichende Chemorepulsion, weitreichende Chemoattraktion, Kontaktrepulsion und Kontaktattraktion. Die Attraktion umfasst in diesem Modell anziehende und gestattende Signale, während die Repulsion inhibitorische und abstoßende Signale umschreibt. Viele Wegfindungsmoleküle können mehreren Klassen und Funktionen zugeordnet werden. Signale mit kurzer Reichweite können die Axone auf bestimmte Bahnen „beschränken“ und „abstoßende“ Kräfte können das Wachstum in Richtung der Zielregion grob vorgeben. Dort könnten die Wachstumskegel von bestimmten Liganden „angezogen“ werden. Modifiziert nach Tessier-Lavigne und Goodman (1996).

An der axonalen Wegfindung bei der Bildung von topologischen Karten sind besonders die Eph Rezeptorprotein Tyrosin-Kinasen und ihre Ephrin Liganden als Wegfindungsmoleküle involviert (Mellitzer *et al.*, 2000). Durch ihre Expression in Gradienten sind sie in den Aufbau der topologischen Projektionen im retinotectalen System und in anderen zentralen Systemen wie Hippocampus, Thalamus und cerebralem Cortex beteiligt.

2.3.2 Prinzipien in der Zielführung olfaktorischer Axone und beteiligte Moleküle

Die Etablierung der nicht-topologischen, aber trotzdem hoch konservierten Projektionen der Riechsinneszellen in den olfaktorischen Bulbus ist eine interessante Herausforderung an den Wegfindungsmechanismus. Denn 1000 verschiedene ORN-Subgruppen müssen mit 1800 Zielen im olfaktorischen Bulbus verknüpft werden (Lewin, 1994). Bisher wurden zwei Prinzipien, denen diese Projektionen gehorchen, und einige beteiligte Moleküle aufgedeckt.

Das erste Prinzip: Zone-zu-Zone Projektion

Das olfaktorische Epithel und der Bulbus von Nagetieren sind in jeweils vier Zonen aufgeteilt. ORN, die einen bestimmten olfaktorischen Rezeptor exprimieren, werden verteilt innerhalb

einer epithelialen Zone exprimiert, und projizieren in die entsprechende Zone des olfaktorischen Bulbus (Abb. 2-3; Ressler *et al.*, 1993, 1994; Vassar *et al.*, 1993, 1994). Obwohl die biologische Funktion der zonalen Aufteilung bisher nicht geklärt ist, reduziert sie die Komplexität der Projektionen (zusammengefasst in Mombaerts, 1999).

In die Etablierung der Zone-zu-Zone Projektion scheinen Zonen-spezifisch exprimierte Wegfindungsmoleküle, wie zum Beispiel das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül (OCAM) und das Carbohydratantigen CC2, involviert zu sein (Yoshihara *et al.*, 1997; Schwarting und Crandall, 1991). Da die Zonen I bis IV im olfaktorischen Bulbus entlang der ventral-dorsal Achse liegen, bestimmt die Expressionszone eines ORN im Epithel die ventro-dorsale Position seiner Glomeruli im olfaktorischen Bulbus (zusammengefasst in Yoshihara und Mori, 1997).

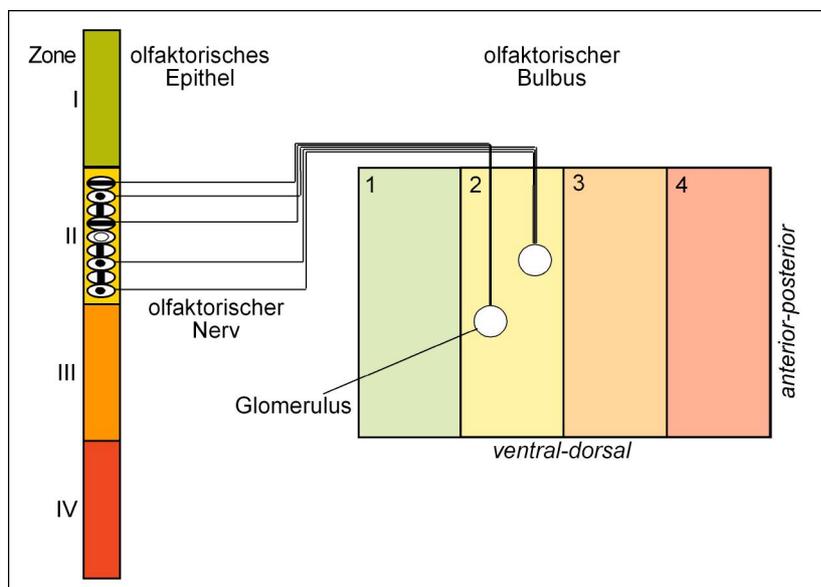


Abbildung 2-3: Axonale Wegfindung der Riechsinneszellen in den olfaktorischen Bulbus. Olfaktorische Rezeptorneuronen, die einen Rezeptortyp exprimieren, sind innerhalb spezifischer Zonen im olfaktorischen Epithel verteilt. Ihre Axone konvergieren jedoch in topografisch fixierten Glomeruli im olfaktorischen Bulbus (nur eine der beiden spiegelbildlichen Achsen ist dargestellt). Die Lokalisation der Glomeruli wird durch die Zonenzugehörigkeit im olfaktorischen Epithel bestimmt und durch das exprimierte olfaktorische Rezeptorprotein. Eine Festlegung der dorso-ventralen Position durch die Expressionszone und der anterior-posterior Achse durch die olfaktorischen Rezeptoren wird vermutet (Wang *et al.*, 1998). Abbildung nach Yoshihara und Mori (1997).

Im vomeronasalen Organ konnten ebenfalls zonal beschränkt exprimierte Wegfindungsmoleküle identifiziert werden. Hier wurden ephrin-A5 und EphA6 komplementär in den beiden Zonen detektiert, die mit der Expression der VR1- bzw. der VR2-Rezeptorproteine korrelieren (Knöll *et al.*, 2001).

Neben diesen Zonen-spezifischen Expressionen wurde kürzlich entdeckt, dass Neuropilin 1 (Zelladhäsionsmolekül und Rezeptor für Semaphorin 3A) exprimierende ORN über alle Zonen im Epithel verteilt sind und in zwei distinkte Gebiete im olfaktorischen Bulbus projizieren, die teilweise mit den Zonen I bis IV überlappen (Nagao *et al.*, 2000). Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, dass bestimmte Positionen oder kleine Gebiete im olfaktorischen Bul-

bus für einwachsende Axone molekular unterscheidbar sind, da in den Gebieten verschiedene Kombinationen von Zelladhäsionsmolekülen (oder anderen) exprimiert werden.

Das zweite Prinzip: Glomeruläre Konvergenz

Während die ORN, die einen bestimmten olfaktorischen Rezeptor exprimieren, innerhalb einer Zone verteilt sind, treffen ihre Axone in ein bis drei Glomeruli im olfaktorischen Bulbus zusammen (Abb. 2-3; Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 2001). Die Konvergenz erhöht die Sensitivität der Geruchswahrnehmung und stellt sicher, dass die Geruchsrepräsentation auf der Ebene des olfaktorischen Bulbus trotz des *turn-overs* der ORN konstant bleibt (zusammengefasst in Buck, 2000).

In Rezeptor-Tausch und -Deletions Experimenten wurde gezeigt, dass die Konvergenz von der Expression der olfaktorischen Rezeptoren abhängt. Dabei stellte sich heraus, dass die Anwesenheit eines funktionalen olfaktorischen Rezeptorproteins für die Bildung der Glomeruli notwendig ist (Wang *et al.*, 1998; vomeronasaler Rezeptorprotein: Belluscio *et al.*, 1999). Wird ein Rezeptor durch einen anderen ausgetauscht, so projizieren die resultierenden ORN in einen Glomerulus mit einer neuen Lokalisation, wenn beide ursprünglichen Rezeptoren in unterschiedlichen Zonen exprimiert werden (Mombaerts *et al.*, 1996). Kommen dagegen beide olfaktorische Rezeptoren aus der gleichen Zone, so wird der resultierende neue Glomerulus in unmittelbarer Nähe zu dem exprimiert, dessen Kodierungsregion in den Genlocus eingefügt wurde (Wang *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Experimente wird vermutet, dass die olfaktorischen Rezeptorproteine für die Festlegung der Projektion entlang der anterior-posterior Achse im olfaktorischen Bulbus verantwortlich sind (Wang *et al.*, 1998).

Wie die olfaktorischen Rezeptorproteine molekular in den Wegfindungsmechanismus involviert sind, ist bisher unklar.

Hypothetische Mechanismen für die Involvierung der olfaktorischen Rezeptorproteine in die Wegfindung der ORN

In dem extremsten Szenario besitzen die olfaktorischen Rezeptorproteine eine Doppelfunktion: sie sind Geruchstoffrezeptor im olfaktorischen Epithel und Wegfindungsmoleküle auf den Wachstumskegeln der ORN (Singer und Shephard, 1994). Sie könnten jedoch auch die sensorischen Eigenschaften der Wachstumskegel direkt oder über die genregulatorische Rekrutierung anderer Wegfindungsmoleküle beeinflussen (Gierer, 1998). Unabhängig von der Art der Wegfindungsmoleküle auf den Wachstumskegeln sind im olfaktorischen Bulbus weitere Landmarken notwendig. Einige Arbeiten schlagen hierzu eine homophilische Interaktion der olfaktorischen Rezeptorproteine vor (Singer *et al.*, 1995). Gegen die spezifische Markierung einer Position mit einem einzelnen Marker spricht die hohe Anzahl der zu erwartenden Moleküle und die Beobachtung, dass die axonalen Fortsätze relativ zielstrebig ihre Glomeruli finden (Mombaerts *et al.*, 1996; Dynes und Ngai, 1998).

Obwohl in anderen sensorischen Systemen aktivitätsabhängige Mechanismen für die Feinregulierung von Projektionen beschrieben wurden, scheinen sie bei der Feinregulierung der Projektionen im olfaktorischen System keine Rolle zu spielen. Olfaktorische Rezeptor-neuronen,

die durch den Verlust des G α olf-Proteins oder des CNG-Kanals nicht auf Geruchsstoffe reagieren, bauen korrekte Verbindungen zu den Glomeruli auf (Belluscio *et al.*, 1998; Brunet *et al.*, 1996). Stattdessen wurde gezeigt, dass die Aktivität für den Erhalt der Projektionen und die Lebensdauer der Rezeptorneuronen ein entscheidender Faktor ist (Zhao und Reed, 2001). In der Embryonalentwicklung sind im Zebrafisch Pionierneuronen beschrieben worden, die den ersten Kontakt zwischen olfaktorischem Epithel und olfaktorischem Bulbus herstellen (Whitlock und Westerfield, 1998). Prinzipiell scheint die Wegfindung der ORN entlang bereits etablierter Verbindungen möglich, aber bisher konnte kein Hinweis auf die Involvierung von Pionierneuronen in die Etablierung des glomerulären Muster in adulten Tieren gefunden werden (Gogos *et al.*, 2000).

Außerdem scheinen die synaptischen Verbindungen zu den sekundären Projektionsneuronen ebenfalls nicht involviert zu sein, denn die topographische Karte entwickelt sich in Abwesenheit der Mitral-, Pinsel-, Körner- und periglomerulären Zellen (Bulfone *et al.*, 1998). Der Befund zeigt auch, dass mögliche Wegfindungsmoleküle im olfaktorischen Bulbus nicht von diesen Zelltypen exprimiert werden, sondern vermutlich auf Gliazellen lokalisiert sind.

2.4 Die olfaktorische Sinneswahrnehmung in *Danio rerio*

2.4.1 Der Zebrafisch als Modellsystem für Untersuchungen am olfaktorischen System

Der Riechsinn des Zebrafisch (*Danio rerio*, Gruppe der Knochenfische) ist gut entwickelt. In Knochenfischen (Teleostier) können Aminosäuren, Gallensäuren, Nukleotide, Prostaglandine und Steroide über das olfaktorische und zum Teil auch über das gustatorische System detektiert werden. Dabei zeichnet sich die Olfaktion durch geringere Schwellenkonzentrationen aus. Da die detektierten Substanzen wasserlöslich sind, ist ihre kontrollierte Applikation gegenüber den flüchtigen Geruchstoffen der Landlebewesen wesentlich einfacher. Hinzu kommt, dass ihre Wirkungen verhaltensbiologisch und neurophysiologisch gut untersucht sind und sie in Verhalten wie Fressen, Wanderung, Paarung und in die Erkennung von Artgenossen und Raubtieren involviert sind (zusammengefasst in Laberge und Hara, 2001).

Der Aufbau des olfaktorischen Epithels und des Bulbus gleicht dem höherer Vertebraten. Allerdings ist die Organisation der verschiedenen Zelltypen in Schichten in beiden Geweben im Zebrafisch weniger ausgeprägt (Epithel: Hansen und Zeiske, 1998; Bulbus: Byrd und Brunjes, 1995). Darüber hinaus besitzen Teleostier kein separates vomeronasales Organ.

Die Anzahl der olfaktorischen Rezeptorproteingene wird in *Danio rerio* auf etwa 100 geschätzt (Barth *et al.*, 1996), während in Nagetieren von bis zu 1000 verschiedenen olfaktorischen Rezeptoren ausgegangen wird (Buck und Axel, 1994). Dementsprechend ist im Zebrafisch die Anzahl olfaktorischer Glomeruli unter Berücksichtigung der Spiegelachse in den

Nagetieren etwa um den Faktor 10 reduziert (Baier *et al.*, 1994; Royet *et al.*, 1988). Insgesamt ist das olfaktorische System des Zebraäbblings damit qualitativ vergleichbar mit dem höherer Vertebraten, jedoch quantitativ reduziert (zusammengefasst in Korsching *et al.*, 1997).

Der kurze Reproduktionszyklus, die große Nachkommenschaft, die einfache Haltung, die schnelle Entwicklung der durchsichtigen Larven außerhalb des Körpers und die Möglichkeit, in großem Maßstab zufällige Mutanten zu generieren und zu untersuchen, transiente und permanente Transgene herzustellen, sowie mit Hilfe von RNA-Injektionstechniken Phänotypen zu untersuchen, haben *Danio rerio* zu einem interessanten Modellorganismus gemacht (zusammengefasst in Wixon, 2000).

2.4.2 Aufbau des olfaktorischen Systems in *Danio rerio*

Das olfaktorische Epithel

Das becherförmige olfaktorische Epithel eines Zebraäbblings besitzt etwa sechs bis zwölf Lamellen, die vom Boden zu beiden Seiten der Mittelraphe aufsteigen (Hansen und Zeiske, 1998). Das sensorische Epithel liegt auf der Oberfläche dieser Lamellen. Es ist zentral von der nicht-sensorischen Mittelraphe und lateral vom nicht-sensorischen Epithel begrenzt (Abb. 2-4).

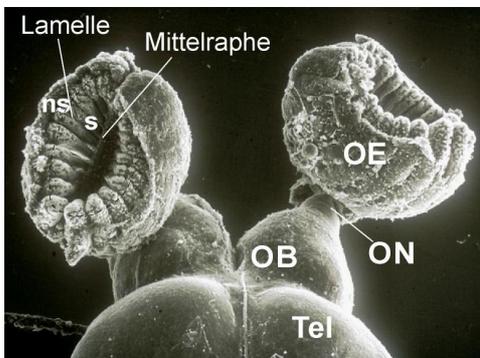


Abbildung 2-4: Das olfaktorische System des Zebraäbblings. Das olfaktorische Epithel (OE) ist über den olfaktorischen Nerv (ON) mit dem olfaktorischen Bulbus (OB) verbunden, der dem rostralen Telencephalon (Tel) anliegt. s: sensorisches Epithel; ns: nicht-sensorisches Epithel. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von S. I. Korsching/H. von Campenhausen zur Verfügung gestellt.

Im sensorischen Epithel sind die Vorläuferzellen der olfaktorischen Rezeptorneuronen basal lokalisiert (Basalzellen), während die Stützzellen mit den Zellkörpern der ORN vermischt vorliegen (Hansen und Zeiske, 1998). Wie in anderen Vertebraten werden in Fischen die ORN kontinuierlich neu gebildet (Graziadei und Metcalf, 1971). Die Zinksulfat oder Triton X-100 induzierte Degeneration (Cancalon, 1982, 1983), das Durchtrennen der olfaktorischen Nerven (Byrd, 2000) und die Entfernung des olfaktorischen Bulbus (Fan und Ngai, 2001) führen zur Regeneration der ORN und bestätigen dadurch die regenerative Kapazität der Riechsinneszellen wie sie aus anderen Vertebraten bekannt ist (vgl. 2.2.1).

In *Danio rerio* ist bisher nur eine Klasse olfaktorischer Rezeptoren identifiziert worden (Barth *et al.*, 1996; Weth *et al.*, 1996), die innerhalb von drei konzentrischen Expressionsdomänen verteilt exprimiert werden (Weth *et al.*, 1996). Ob diese Expressionsdomänen den Epithelzonen der Säugetiere entsprechen, ist unklar.

Im olfaktorischen Epithel der Teleostier werden sowohl cilierte als auch mikrovillierte Rezeptorneuronen nebeneinander exprimiert, während sie in Säugetieren voneinander getrennt im olfaktorischen (ciliert) oder im vomeronasalen Organ (mikrovilliert) vorkommen (siehe unten).

Der olfaktorische Bulbus

Die ORN-Axone bilden ein Nervenbündel, den olfaktorischen Nerv, und projizieren in den olfaktorischen Bulbus (Abb. 2-5). Hier laufen sie innerhalb der olfaktorischen Nervschicht, um dann mit den apikalen Dendriten der Mitralzellen in der darunter liegenden zellarmen glomerulären Schicht etwa 80 stereotype olfaktorische Glomeruli (sphärische Neuropilstrukturen) zu bilden. Von ihnen können 22 in verschiedenen Individuen identifiziert werden (Baier und Korsching, 1994). Neben den distinkten Glomeruli gibt es in *Danio rerio* sogenannte agglomeruläre Plexi (auch laterale Kette und anteriorer Plexus), die kleinere und weniger separierte Terminalstrukturen enthalten (Abb. 2-5).

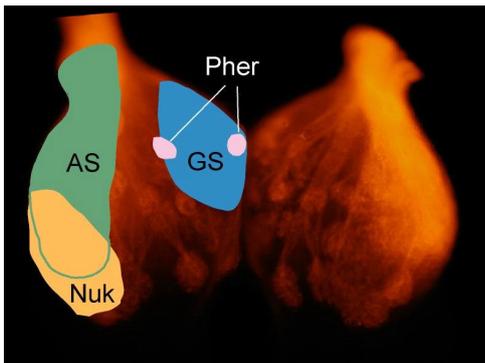


Abbildung 2-5: Morphologischer und funktionaler Aufbau des olfaktorischen Bulbus. Mit dem lipophilen Farbstoff Dil angefärbtes glomeruläres Muster, ventrale Ansicht. Einzelne Glomeruli sind vor allem zentral und medial zu erkennen, während lateral der agglomeruläre Plexus lokalisiert ist. In funktionalen Studien wurden durch Aminosäuren (AS), Nukleotide (Nuk) und Gallensäuren (GS) aktivierte Bereiche identifiziert, während für die Pheromondetektion zwei Glomeruli identifiziert werden konnten. Nach Friedrich und Korsching (1998).

In Teleostier unterhalten die Mitralzellen, die unterhalb der Glomeruli in der Mitralzellschicht lokalisiert sind, Verbindungen zu mehreren Glomeruli und projizieren axonal in die höheren Zentren des Telencephalons (zusammengefasst in Laberge und Hara, 2001). Periglomeruläre und Pinselzellen sind bisher nicht beschrieben worden.

Die innere Schicht des olfaktorischen Bulbus besteht aus kleinen, dicht gepackten Körnerzellen (Abb. 2-6), die als inhibitorische Interneurone fungieren. Sie sind dendritisch mit den Dendriten, den Somata und Axonwurzeln der Mitralzellen verbunden. Der reziproke Kontakt ist in Richtung Körnerzelle exzitativ und in Richtung Mitralzelle inhibitorisch.

In Teleostier entstehen die Vorläuferzellen der Körnerzellen in der rostralen ventrikulären Proliferationszone 1b, die mit der inneren Zellschicht des olfaktorischen Bulbus und dem rostralen Abschnitt des ventralen Telencephalons assoziiert ist (Ekstrom *et al.*, 2001).

Obwohl in Teleostier molekular bisher nicht gezeigt werden konnte, dass ORN, die einen bestimmten olfaktorischen Rezeptor exprimieren, in einem Glomerulus konvergieren, weisen funktionelle Befunde darauf hin (Friedrich und Korsching, 1998). Es wurde gezeigt, dass zwei Pheromone im olfaktorischen Bulbus jeweils einen einzelnen mittventral liegenden Glomeru-

lus aktivieren. Demgegenüber werden andere Geruchsstoffe und ihre Konzentrationen durch definierte Kombinationen von aktivierten Glomeruli dargestellt (Friedrich und Korsching, 1997, 1998). Aminosäuren induzieren anterior und zentral in der lateralen Kette, Nukleotide im posterior-lateralen und Gallensäuren im anterior-medialen olfaktorischen Bulbus die prominentesten Aktivierungen der interindividuell reproduzierbaren Signalmuster (Abb. 2-5).

Einige Eigenschaften des lateralen Bulbus erinnern an den akzessorischen Bulbus der Säugetiere. Morphologisch gesehen sind die Glomeruli in der lateralen Kette und im akzessorischen Bulbus diffuser voneinander abgegrenzt und kleiner als die Glomeruli im (übrigen) olfaktorischen Bulbus (Baier und Korsching, 1994; Belluscio *et al.*, 1999). Daneben konnte bisher für eine Teleostierspezies deutlich gezeigt werden, dass die laterale Kette, wie der akzessorische Bulbus, von mikrovillierten Neuronen innerviert wird (Hamdani *et al.*, 2001). Dieser Zelltyp liegt im olfaktorischen Epithel der Fische mit den cilierten vermischt vor, während das olfaktorische Epithel der höheren Vertebraten spezifisch den cilierten und das vomeronasale Organ spezifisch den mikrovillierten Typ enthält. Die mikrovillierten Neurone der Teleostier exprimieren außerdem V2R-verwandte Rezeptorproteine und detektieren spezifisch Aminosäuren (Gao *et al.*, 1998; Speca *et al.*, 1999; Sato und Suzuki, 2001), was gut mit der glomerulären Aktivität nach Aminosäurestimuli in der lateralen Kette korreliert (Friedrich und Korsching, 1997). Allerdings wird durch die Detektion der Aminosäuren in der lateralen Kette auch ein entscheidender funktionaler Unterschied zwischen den Säugetieren und Teleostier deutlich: das vomeronasale System dient der Wahrnehmung von Pheromonen während die laterale Kette Aminosäuren detektiert.

Insgesamt sprechen die Befunde aber trotzdem dafür, dass sich der laterale Abschnitt des olfaktorischen Bulbus deutlich von anderen Bulbusregionen unterscheidet und möglicherweise strukturell dem akzessorischen Bulbus entspricht.

Die Mitralzellen projizieren über zwei getrennte Trakte in Teile des Telencephalons

Die Projektionen der sekundären Neuronen des olfaktorischen Bulbus erreichen das Telencephalon über den medialen (MOT) und den lateralen Trakt (LOT). In Goldfisch projizieren durch den medialen Trakt vor allem Mitralzellen, die medial im olfaktorischen Bulbus lokalisiert sind und auf Pheromone antworten, während über den LOT Signale für das Fressverhalten weitergeleitet werden (Stacey und Kyle, 1983). Dadurch wird die im olfaktorischen Bulbus vorhandene lateral/medial Teilung beibehalten. Der LOT projiziert in Teleostier hauptsächlich in den dorsalen Teil des posterioren Telencephalons, während über den MOT das ventrale und dorsale Telencephalon, das präoptische Gebiet und das Diencephalon erreicht werden (Abb. 2-6; zusammengefasst in Laberge und Hara, 2001). Daneben gibt es einige contralaterale Projektionen durch die Kommissuren.

Da die zentralen neuralen Gebiete im olfaktorischen System von Fischen nur gering mit denen aus Säugetieren übereinstimmen, fällt eine Zuordnung der innervierten Strukturen schwer. Für den afrikanischen Lungenfisch ist das dorsale Telencephalon dem Pallium und das ventrale Gebiet dem Subpallium zugeordnet worden. Im Subpallium werden die lateralen Kerne den

Basalganglien *Nucleus caudatus* und *Corpus striatum* (*Putamen* und *Globus pallidus*), und die medialen Kerne dem Septum und dem *Nucleus accumbens* zugeschrieben (Reiner und Northcutt, 1987). Auf *Danio rerio* ist diese Zuordnung nicht pauschal zu übertragen, da in den Teleostier die Hemisphären des Telencephalons evertiert sind (Wullimann *et al.*, 1996). Anhand von neurochemischen Eigenschaften und einer Analyse der Projektionen wurde gezeigt, dass im Zebrafisch der dorsale Kern des ventralen Telencephalons dem *Nucleus accumbens* (Rink und Wullimann, 2001) entspricht. Gemeinsam mit dem ventralen Kern ist er zusätzlich striatalen Strukturen zugeordnet worden.

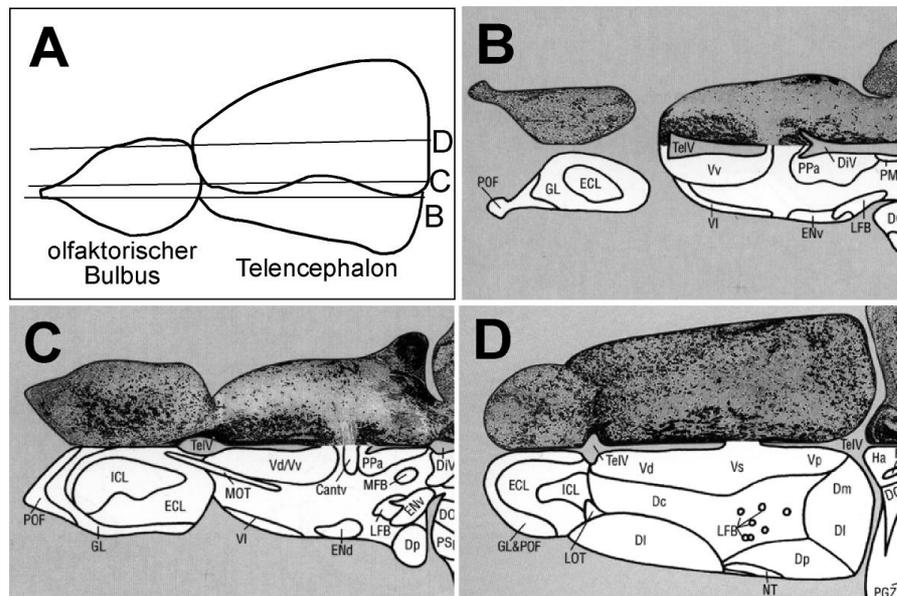


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der horizontalen Schnitte durch den olfaktorischen Bulbus und das Telencephalon (entnommen aus Wullimann *et al.*, 1996). A) Darstellung der Schnittebenen; B) ventraler, C) zentraler und D) dorsaler Schnitt. Verwendete Abkürzungen:

CantV	ventraler Abschnitt der anterioren Kommissur	NT	Nuclea taeniae
D	dorsales Telencephalon	PPa	parvzellularer präoptischer Kern
Dc	zentrale Zone des D	POF	primäre olfaktorischen Nervschicht
DI	laterale Zone des D	Tel V	ventraler Ventrikel
Dm	mediale Zone des D	V	ventrales Telencephalon
ECL	externe Zellschicht	Vd	dorsaler Kern des V
ENv	entopedunculärer Kern, ventraler Teil	VI	lateraler Kern des V
GL	glomeruläre Schicht des olfaktorischen Bulbus	Vp	Kern des V nach der Kommissur
LFB	laterales Vorderhirnbündel	Vs	Kern des V oberhalb der Kommissur
LOT	lateraler olfaktorische Trakt	Vv	ventraler Kern des V
MFB	mediales Vorderhirnbündel		
MOT	medialer olfaktorischer Trakt		

Der terminale Nerv

Der terminale Nerv ist der nullte craniale Nerv, eng an das olfaktorische System assoziiert und vermutlich nicht chemosensorisch, denn seine Dendriten enden rostral in der Basalmembran des olfaktorischen Epithels ohne Kontakt zu der äußeren Umgebung (zusammengefasst in Demski, 1993). Der terminale Nervkomplex besteht in Teleostier aus einem oder mehreren ventro-medial gelegenen Ganglien. Von den Ganglien ziehen Projektionen in das Mittelhirn, das Telencephalon und olfaktoretinal in die Retina (vgl. 5.3.5). Sie werden jeweils von einigen großen Neuronen gebildet, die während der Ontogenese in der olfaktorischen Plakode entstehen (Schwanzel-Fukuda und Pfaff, 1989; aber siehe: Whitlock *et al.*, 2000). In den Ganglienzellen werden Gonadotropin, FMRFamid verwandtes Peptid und Neuropeptid Y coexprimiert (Stell *et al.*, 1984; Chiba *et al.*, 1997).

Die Funktionen des terminalen Nervkomplexes in Teleostier sind vielfältig. Er ist in die Vermittlung von Fortpflanzungstimuli involviert (Parhar *et al.*, 1995) und wirkt neuromodulatorisch auf das optische System von *Danio rerio* (Li und Dowling, 2000) sowie auf olfaktorische Rezeptorzellen (Eisthen *et al.*, 2000, 2001; zusammengefasst in Wirsig-Wiechmann, 2001). Daneben konnte gezeigt werden, dass die Größe der GnRH-exprimierenden Zellen von dem Kontakt des Tieres mit bestimmten Pheromonen abhängt (Darrow und Harris, 2001).

2.4.3 Entwicklung des olfaktorischen Systems

Die olfaktorischen Epithelien entwickeln sich aus den olfaktorischen Plakoden, die in *Danio rerio* 14 bis 16 Stunden nach der Befruchtung (hpf) entstehen (Hansen und Zeiske, 1993). Sie sind als bilateral paarige Verdickungen des subepidermalen Ektoderms in der rostro-ventralen Region des Kopfes lokalisiert, die durch die anteriore Konvergenz von lateralen Neuralplattenzellen entstehen (Whitlock und Westerfield, 2000). Zur Bildung der Nasengrube falten sich diese Verdickungen bei 32 hpf nach innen (Hansen und Zeiske, 1993). Das ist deutlich vor dem Schlüpfen ca. 72 Stunden nach der Befruchtung. Die nachfolgende morphologische Reifung der Epithelien dauert mehrere Wochen.

Die ersten Axone aus der olfaktorischen Plakode erreichen bei 22 hpf das Zentralnervensystem in der späteren Region des olfaktorischen Bulbus (Hansen und Zeiske, 1993; Wilson *et al.*, 1990). Sie gehören zu sogenannten Pionierneuronen, die sich von den olfaktorischen Rezeptorneuronen durch das Fehlen eines Dendriten unterscheiden (Whitlock und Westerfield, 1998). Der erste erkennbare Glomerulus separiert sich vom terminalen Plexus bei 48 hpf (Wilson *et al.*, 1990). Durch die danach gebildeten Glomeruli wird im Verlauf von mehreren Wochen das adulte glomeruläre Muster gebildet (Lieberoth, 1999; Dynes und Ngai, 1998). Dabei wachsen die Zellfortsätze der ORN direkt auf die entsprechenden Ziele im olfaktorischen Bulbus zu, so dass hier die Involvierung von Wegfindungsmolekülen gegenüber einem Aktivitäts-abhängigen Prozess favorisiert wird (Dynes und Ngai, 1998).

2.5 Isolierung von differentiell exprimierten Wegfindungsmolekülen im olfaktorischen System

Für die Aufklärung des Wegfindungsmechanismus der olfaktorischen Rezeptorneuronen wäre eine vollständige Identifizierung aller beteiligten Moleküle wünschenswert. Dazu können bestimmte Eigenschaften der Wegfindungsmoleküle als Erkennungskriterium verwendet werden. Unter Ausnutzung ihrer differentiellen Expression (räumlichen oder regulativ) können mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung Wegfindungsmoleküle angereichert werden.

2.5.1 Möglichkeiten, Wegfindungsmoleküle im olfaktorischen System zu identifizieren

Für die Identifizierung von Wegfindungsmolekülen, die die Riechsinneszellaxone im olfaktorischen Bulbus leiten, sind mehrere experimentelle Ansätze denkbar. So könnte die Funktion von bekannten Wegfindungsmolekülen im olfaktorischen System von *Danio rerio* überprüft werden. Die Beschränkung auf bekannte Moleküle ist der größte Nachteil dieses Verfahrens. Demgegenüber, könnten in einem Mutagenese-Screen bekannte und unbekannte Gene identifiziert werden, die in die Wegfindung im olfaktorischen System involviert sind. Da während der Ontogenese das glomeruläre Muster noch nicht vollständig differenziert ist, werden hier vermutlich Moleküle übersehen, die an der Feinregulierung der Positionierung beteiligt sind. Einen vielleicht verlässlicheren Ansatz bietet die Isolierung von Wegfindungsmolekülen aufgrund ihrer differentiellen Expression. Es gibt viele Hinweise, dass Moleküle, die an der Führung der ORN-Axone zu den spezifischen Glomeruli beteiligt sind, im olfaktorischen Bulbus und in Zonen oder Gradienten, also räumlich differentiell, exprimiert werden (vgl. 2.3.2):

- Die zonale Expression und Projektion der ORN zeigt, dass die Etablierung der topographischen Karte durch die Zonen zunächst grob vorgezeichnet ist. Zonen-spezifische Wegfindungsmoleküle sollten die Zone-zu-Zone Projektionen sicherstellen (vgl. 2.3.2).
- Die Konvergenz von rezeptorgleichen olfaktorischen Rezeptorneuronen hängt von der Expression der olfaktorischen Rezeptorproteine selbst ab. Da sie nicht die einzigen Faktoren sein können, wird die Beteiligung von in Gradienten oder Zonen exprimierten Wegfindungsmolekülen erwartet (vgl. 2.3.2).
- Die kontinuierliche Regeneration der ORN im olfaktorischen Epithel verlangt den lebenslangen Erhalt der Wegfindungssignale im Bulbus (vgl. 2.2.1).

Die Zonen-Spezifität und die hypothetische Gradientenbildung können zur Isolierung der Wegfindungsmoleküle genutzt werden, durch die sich zwei Zonen oder Gebiete im olfaktorischen Bulbus oder Epithel oder zwei ORN mit zwei unterschiedlichen olfaktorischen Rezeptorproteinen voneinander unterscheiden. Die Isolierung der molekularen „Differenz“ könnte also zu der Identifizierung von Wegfindungsmolekülen im olfaktorischen System führen. Diese „Differenz“ kann im adulten Tier identifiziert werden, da die ORN im olfaktorischen Epithel kontinuierlich regeneriert werden.

Darüber hinaus werden einige Moleküle während der induzierten Regeneration durch das Einwachsen der vielen neu-gebildeten ORN-Axone in den Bulbus vermehrt exprimiert (vgl. 2.2.1). Unter ihnen sollten sich Wegfindungsmoleküle befinden, die während der Regeneration hochreguliert werden.

2.5.2 Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Molekülen

Differentiell exprimierte Moleküle können auf der Protein- und auf der Transkriptebene isoliert werden (zusammengefasst in Vietor und Huber, 1997). Während Proteine gemäß ihrer Ladung und ihres Molekulargewichtes in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen unter standardisierten Bedingungen separiert und anhand von Computer-vermittelten Vergleichen und Sequenzierungen identifiziert werden, stehen für die Isolierung differentiell exprimierter Transkripte verschiedene Ansätze zur Verfügung.

Die Möglichkeiten dieser experimentellen Ansätze sind im allgemeinen durch die Komplexität der mRNA-Gemische limitiert. Man geht von 20000 bis 30000 verschiedenen Transkripten pro Zelle aus, von denen 99 % als selten eingestuft werden ($1/20000$ bis $1/70000$; Axel *et al.*, 1976). Da sie jedoch nur 50 % der gesamten mRNA-Menge ausmachen, ist der Anteil von häufig exprimierten Genen außerordentlich hoch und interferiert mit dem Auffinden von differentiell exprimierten seltenen Genen. Deswegen sind Methoden entwickelt worden, die differentiell exprimierte Transkripte unabhängig von ihrer Häufigkeit in einer mRNA-Population identifizieren können. Die drei am häufigsten angewendeten Methoden (oder Varianten davon) sind die serielle Analyse der Genexpression (SAGE), die *Differential Display* reverse Transkriptase PCR und die subtraktive Hybridisierung.

Serielle Analyse der Genexpression und elektronische Subtraktion

In der Theorie beginnt dieser grundlegendste Ansatz mit der Katalogisierung von allen Transkripten, die in den zu vergleichenden cDNA-Populationen enthalten sind (Velculescu *et al.*, 1995). Transkripte, die in einer Population signifikant häufiger als in einer anderen vorkommen, werden dabei als differentiell eingestuft. Technisch gesehen werden in SAGE von allen Transkripten kleine, mit Adaptoren versehene 3'-gelegene cDNA-Fragmente hergestellt, die sequenziert und in einer elektronischen Subtraktion ausgewertet werden.

Da SAGE nur verlässlich differentiell exprimierte Transkripte identifizieren kann, wenn mehrere Tausend cDNA-Fragmente pro Gemisch sequenziert werden, ist diese Technik nur für entsprechend ausgestattete Einrichtungen empfehlenswert (Vietor und Huber, 1996). Bei geringeren Probenmengen werden hauptsächlich reichlich vorkommende Transkripte als differentiell erkannt (Wan *et al.*, 1996).

Differential Display reverse Transkriptase PCR

Für die *Differential Display*-Technik werden aus zu vergleichenden mRNA-Populationen Teilmengen mit Hilfe von PCR amplifiziert und die resultierenden cDNA-Fragmentgemische in denaturierenden Polyacrylamidgelen separiert (Liang und Pardee, 1992). Durch den Vergleich zwischen zwei oder mehreren cDNA-Gemischen können sowohl reduzierte als auch erhöhte cDNA-Fragmentniveaus detektiert werden. Unter den identifizierten differentiell exprimierten Transkripten befinden sich häufige und seltene, die sich in ihren Expressionsniveaus mindestens um den Faktor zwei unterscheiden (Wang *et al.*, 1996). Inwieweit seltene Transkripte ausreichend erfasst werden, ist umstritten (zusammengefasst in Debouck, 1995). Die Nachteile der Methode sind der hohe Anteil an falschen positiven Signalen, die Isolierung von relativ kurzen, 3'-gelegenen cDNAs und die zeitintensive Verifizierung der Kandidaten (zusammengefasst in Debouck *et al.*, 1995).

Subtraktive Hybridisierung

Initial wurden durch wiederholte Hybridisierungen von markierter „Tester“ cDNA mit einem hohen Überschuss „Driver“ cDNA oder mRNA und die wiederholte Separierung der einzelsträngigen „Tester“ cDNAs, differentiell exprimierte, einzelsträngige „Tester“ cDNAs angereichert (Sive und StJohn, 1988). Diese Variante ermöglicht zwar ebenfalls die Isolierung von seltenen und häufig exprimierten Transkripten, aber sie bevorteilt die differentiellen cDNAs, deren Konzentrationen sich mehr als 10-fach unterscheiden (Wang *et al.*, 1996). Ein Nachteil gegenüber der *Differential Display*-Technik sind jedoch die höheren eingesetzten mRNA-Mengen und die generelle Unfähigkeit aller subtraktiven Hybridisierungen, reduzierte und hochregulierte Transkripte gleichzeitig zu identifizieren.

In der repräsentativen Differenzanalyse wird die subtraktive Hybridisierung mit einer Anreicherung der differentiell exprimierten cDNA-Fragmente durch PCR kombiniert (Lisitsyn *et al.*, 1993). Daneben werden die eingesetzten cDNAs gespalten, um die Genauigkeit der Hybridisierung zu verbessern. Obwohl in der PCR theoretisch alle cDNA-Fragmente gleichmäßig amplifiziert werden sollten, werden häufig vorkommende Fragmente bevorzugt amplifiziert (zusammengefasst in Vietor und Huber, 1996).

Die *Suppression* subtraktive Hybridisierung (SSH) basiert auf der repräsentativen Differenzanalyse und nutzt den *Suppression* PCR Effekt sowie die Normierung des cDNA-Gemisches, um selektiv differentiell exprimierte cDNAs aller Häufigkeitsklassen bis zu 1000-fach anzureichern (Lukyanov *et al.*, 1996). Dabei führt der *Suppression* PCR Effekt nach der Hybridisierung zur selektiven Amplifizierung differentiell exprimierter Fragmente, indem die exponentielle Vermehrung von anderen cDNAs unterdrückt wird (Siebert *et al.*, 1995). Eine weitere Verbesserung in dieser Technik ist die Normierung der Transkript-Häufigkeiten während eines weiteren Hybridisierungsschrittes. In ihm bilden häufig vorkommende cDNA-Fragmente aufgrund der Kinetik zweiter Ordnung schneller Hybride als die seltenen, so dass am Ende der Hybridisierung die Konzentrationen der einzelsträngigen cDNA-Fragmente angeglichen sind (Gurskaya *et al.*, 1996). Die selektive Amplifizierung differentiell exprimierter Sequenzen unabhängig von ihrer ursprünglichen Häufigkeit ist der große Vorteil dieser Me-

thode. Allerdings hängt der Erfolg der Anreicherung von den ursprünglichen Verteilungsquotienten der Transkripte und der Komplexität der untersuchten cDNA-Gemische ab.

Für die Isolierung von differentiell exprimierten Transkripten im olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* wurden die *Differential Display* RT PCR und die *Suppression* subtraktive Hybridisierung als geeignete Methoden eingestuft. Die Möglichkeit, alle Transkripte zu Normieren und damit seltene differentiell exprimierte unabhängig von ihrer Häufigkeit zu detektieren, machen die *Suppression* subtraktive Hybridisierung zur Methode der Wahl.

2.5.3 Die *Suppression* subtraktive Hybridisierung (SSH)

Für die Herstellung von subtrahierten Bibliotheken wird das von Diatchenko *et al.* (1996) etablierte Protokoll verwendet. Es umfasst zwei Hybridisierungsschritte und zwei PCR-Amplifizierungen unter *Suppressions*bedingungen. Das experimentelle Vorgehen und die bei den einzelnen Schritten erreichten Veränderungen in den cDNA-Gemischen sollen hier kurz beschrieben werden (Abb. 2-7; vgl. 3.11.1).

Die cDNA, welche die differentiellen Transkripte enthält, wird „Tester“ und die Referenz cDNA „Driver“ genannt. Beide werden unter gleichen Präparationsbedingungen gewonnen und mit einem Vierbasenspalter geschnitten.

In der ersten Hybridisierung werden diese beiden getrennten Ansätze jeweils gemeinsam mit einem „Driver“ Überschuss durch Hitze denaturiert und zum *Annealen* inkubiert (Abb. 2-7). Dabei bilden sich fünf Typen Hybride und Einzelstränge *a*, *b*, *c*, *d*₁ und *d*₂. Die häufig vertretenen Sequenzen bilden schneller und häufiger doppelsträngige Hybride (*b*, *c*, *d*₂) als die seltenen, denn die Hybridbildung folgt einer Kinetik zweiter Ordnung. Differentielle Sequenzen treffen seltener auf ihr Gegenstück und reichern sich unter Typ *a* an. Am Ende der Hybridisierung sind die verbliebenen einzelsträngigen cDNA-Fragmente in ihren Konzentrationen angeglichen und mit differentiell exprimierten Sequenzen angereichert (Gurskaya *et al.*, 1996).

In der unmittelbar anschließenden zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung miteinander vermischt. Die Bildung von Hybriden mit zwei unterschiedlichen Adaptoren ist nun möglich (Typ *e*) und repräsentiert vor allem differentiell exprimierte Sequenzen. Die gleichzeitige Zugabe von frisch denaturiertem „Driver“ forciert die weitere Anreicherung von differentiell exprimierten Sequenzen.

Während einer Inkubation mit DNA-Polymerase werden die 3'-Enden der cDNA-Fragmente vom Typ *b*, *c* und *e* aufgefüllt. Dadurch entstehen mit dem Typ *e* cDNA-Fragmente, die zwei verschiedene Adaptoren tragen.

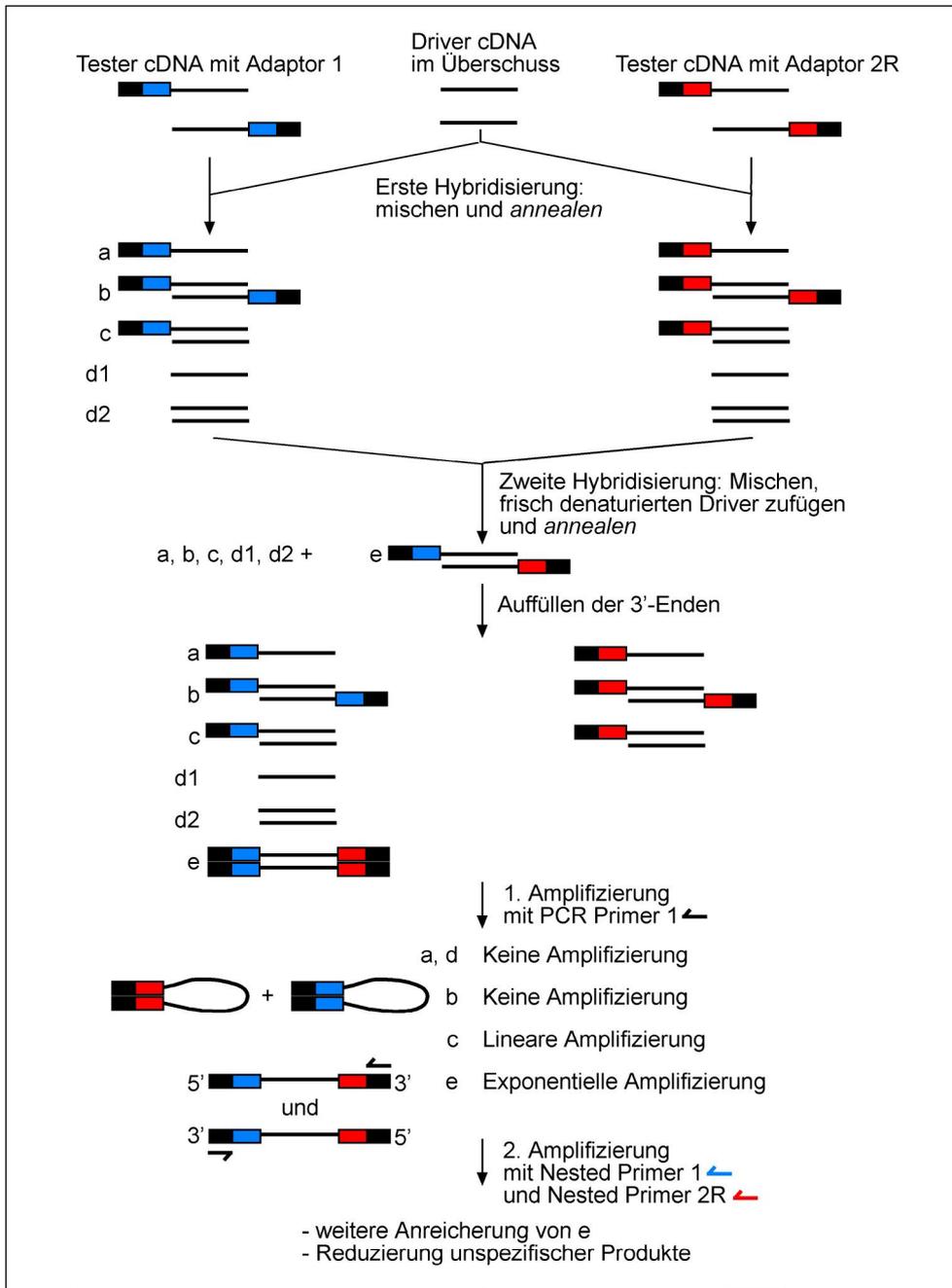


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der „PCR-Select cDNA Subtraction“. Der Molekültyp e wird nur gebildet, wenn die Sequenz in der "Tester" cDNA hochreguliert ist. Durchgezogene Linien repräsentieren die *RsaI* gespaltenen "Tester" oder "Driver" cDNAs. Ausgefüllte Boxen repräsentieren die äußeren Abschnitte der Adapter 1 und 2R (längere Stränge), die den PCR Primer 1 Sequenzen entsprechen. Blaue Boxen stellen den inneren Teil der Adaptersequenz 1 dar und korrespondieren zu der Nested Primer 1 Sequenz, während die rote Boxen dem inneren Teil der Adaptersequenz 2R entsprechen und mit Nested Primer 2R korrespondieren. Modifiziert nach Diatchenko *et al.* (1999).

In der ersten PCR-Amplifikation werden nur die Typ e cDNA-Fragmente, mit den differentiell-exprimierten Sequenzen angereichtert sind, exponentiell amplifiziert. Moleküle mit zwei gleichen Adaptoren formen unter den PCR-Bedingungen nicht amplifizierbare „Lasso“-Strukturen (Typ b), indem die komplementären Anteile ihrer Adaptoren im sogenannten *Suppressions*-Effekt miteinander *annealen* (Siebert *et al.*, 1995). Die meisten cDNA-

Fragmente vom Typ *e* unterliegen dem *Suppressions*-Effekt aufgrund ihres verkürzten homologen Bereiches nicht. Allerdings können kleine cDNA-Fragmente unter 200 bp vom Typ *e* dadurch reduziert werden (Lukyanov *et al.*, 1995). Dieser Effekt begünstigt die Anreicherung von längeren Molekülen, und wirkt auf diese Weise der Tendenz der subtraktiven Hybridisierung entgegen, kleine cDNA-Fragmente anzureichern. cDNA-Fragmente, die nur auf einer Seite einen Adapter tragen, werden linear amplifiziert (Typ *c*). Ist kein Adapter vorhanden (Typ *d*₁ und *d*₂), können die cDNA-Fragmente nicht amplifiziert werden.

In einer zweiten PCR mit den beiden Adapter-spezifischen Primern Nested Primer 1 und Nested Primer 2R sollen die cDNA-Fragmente vom Typ *e* weiter angereichert und Hintergrund reduziert werden.

Das resultierende cDNA-Fragment Gemisch wird in einen Vektor ligiert und steht dann als subtrahierte cDNA-Bibliothek zur Verfügung. Diese subtrahierte cDNA-Bibliothek sollte nun hauptsächlich cDNA-Fragmente enthalten, die mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondieren.

2.6 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Transkripte isoliert werden, die differentiell im olfaktorischen Bulbus exprimiert werden. Die Identifizierung von differentiell exprimierten mRNAs des olfaktorischen Bulbus des Zebrafisches könnte Hinweise auf die molekularen Grundlagen der Wegfindung der olfaktorischen Rezeptorneuronen und der morphologisch und funktionell verschiedenen Abschnitte erlauben. Bisher konnten keine bekannten Wegfindungsmoleküle, die an der Zielführung der olfaktorischen Rezeptorneuronen im olfaktorischen Bulbus beteiligt sind, identifiziert werden. Deswegen sollten in dieser Studie subtrahierte cDNA-Bibliotheken erstellt werden, in denen differentiell verteilte cDNA-Fragmente angereichert sind. Der Zebrafisch, *Danio rerio*, bietet sich für diese Untersuchungen an, denn er verfügt über ein qualitativ vergleichbares jedoch quantitativ reduziertes olfaktorisches System.

Für die Isolierung der differentiell exprimierten Moleküle wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen sollte die Transkriptexpression in olfaktorischen Bulbus während der Regenerationsphase der glomerulären Projektionen mit der von unbehandelten Kontrollen verglichen werden. Hierzu sollten die olfaktorischen Rezeptorneuronen mit Zinksulfat degeneriert werden und an einem Zeitpunkt, an dem möglichst viele olfaktorische Rezeptorneuronenfortsätze in den olfaktorischen Bulbus einwachsen, für die Untersuchungen gewonnen werden. Unter den differentiell exprimierten Transkripten waren Moleküle vermutet worden, die an der Etablierung der glomerulären Projektionen beteiligt sind.

In einem zweiten Ansatz sollten Transkripte identifiziert werden, die im olfaktorischen Bulbus räumlich differentiell exprimiert werden. Hierzu wurde ein Vergleich zwischen dem lateralen und dem medialen Bulbusabschnitt gewählt, da sich beide Abschnitte sowohl funktionell als auch morphologisch voneinander unterscheiden. Für die RNA-Isolierung sollte zunächst

eine Methode entwickelt werden, um kleine definierte Gewebeabschnitte aus dem olfaktorischen Bulbus zu gewinnen. Moleküle, die zwischen zwei Bulbusabschnitten differentiell exprimiert werden, könnten funktionell relevante Subkompartimente im olfaktorischen Bulbus definieren oder als Wegfindungsmoleküle die kontinuierlich einwachsenden Riechsinneszellfortsätze zu ihren Zielregionen leiten und diese molekular definieren.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Geräte

Computer	Power Macintosh 8500/120 (Apple Computer, Feldkirchen) Mac OS Computer (Apple Computer, Feldkirchen) CDD Compact Disc Recorder (Philips, Hamburg)
Dot Blot Apparatur	Dot Blot Apparatur (Biorad, München)
Drucker	Epson Stylus 760 (Epson, Düsseldorf) Laser Jet 2100 TN (Hewlett Packard, Böblingen)
Elektrophorese- Apparaturen	Apparaturen in der Werkstatt des Instituts für Genetik, Universität Köln, angefertigt Mini Sub Cell® GT, Wide Mini Sub Cell® GT und Sub Cell® GT (Biorad, München)
Elektroporations- System	Gene Pulser™, Pulse Controller, Capacitance Extender (Biorad, München)
Entwicklungs- maschine	Curix 60 (Agfa, Köln)
Folienschweißgerät	C220 (Joisten und Kettenbaum, Bergisch Gladbach)
Fluoreszenz- mikroskop	Zeiss Axioplan (Zeiss, Oberkochen) Atto Arc 2 HBO 100W (Zeiss, Oberkochen) Uniblitz® Model VMM-1 Shutter Driver (Vincent Associa- tes über Zeiss, Oberkochen) SMZ-U (Nikon, Düsseldorf) SuperHigh Pressure Mercury Lamp Power Supply (Nikon, Düsseldorf) Digital Camera Coolpix 950 (Nikon, Düsseldorf) Image Mate™ (SanDisk, Sunnyvale, CA, USA)
Fluoreszenz- photometer	LS-5B Luminiscence Spectrophotometer (Perkin Elmer, Weiter- stadt)
Geldokumentations- system	ChemiDoc (Bio-Rad, München) Quantity One 4.2.1 Software (Biorad, München) The Imager System (Appligene, Heidelberg) VP 1500 II Thermoprinter (Seikosha, Hamburg)
Heizplatte	Ikamag®Ret (Jauche + Kunkel, über Merck, Darmstadt)
Hybridisierungsöfen	Hybridiser HB-1D (Techne, Cambridge, UK) Polymax 1040 Inkubator 1000 (Heidolph, Schwabach)
Inkubatoren	Typ UM100 (über Merck, Darmstadt) Certomat®H (B. Braun, Melsungen)
Kaltlichtlampe	Visilux 150 HL (Visitool, Maulbronn)
Kontaminations- monitor	LB 1210 B (Berthold, Bundoora, Australien)
Kryostat	CM19000 (Leica, Solms)
Leuchttisch	Planilux (Gerätebau Schulte, Warstein)

Magnetrührgeräte	RET control-visc (IKA Labortechnik, Staufen) Combimag RCH (IKA Labortechnik, Staufen)
Netzgeräte	2301 Macrodrive1 (Amersham Pharmacia Biotech, Heidelberg) Power Pac 300 (Biorad, München)
Objektive	Plan-Neofluar: 10x NA 0.3, 20x NA 0.5, 40x Oil NA 1.4
Paraffinstrecktisch	Störk Tronic (Medax, Fuellinsdorf, Schweiz)
Photometer	DU®-62 Spectrophotometer (Beckman, Unterschleissheim-Lohhof)
Phosphoimagerscreens	BAS-MP 2040S (Fuji, Düsseldorf)
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic (über Merck, Darmstadt)
Phosphoimagerlesegerät	Fujix BAS 1000 (Fuji, Düsseldorf)
Röntgenfilmkassetten	IEC 60406 (Rego, Augsburg) Verstärkungsfolien Universal 100 (Rego, Augsburg)
Scanner	Agfa Snap Scan 1236 (Agfa, Köln) Nikon LS-2000 (Nikon, Düsseldorf)
Schüttelgeräte	Vortex-Genie Model K-550-G3 (Bender und Hobein, Melsungen)
Schwenktisch	Certomat®R (B. Braun, Melsungen) IKA-Vibrax-VXR (IKA Labortechnik, Staufen)
Scintillationszähler	LS 5000 TD (Beckman, Unterschleissheim-Lohhof)
Stereomikroskope	Binokular (Nikon, Düsseldorf)
Thermostat	DriBlock® OB-3 (Techne, Cambridge, UK)
Thermozykler	GeneAmp System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) T-Gradient (Whatman Biometra, Göttingen)
Ultraschallbad	Brausonic 220 (bezogen über Merck, Darmstadt)
UV-Belichtungskammer	UVT 2020 (Herolab, Wiesloch)
UV-Licht-Bestrahlungsgerät	UV Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, USA)
Vibratom	Vibratome 1000 (Ted Pella, Redding, CA, USA)
Waagen	L310, U4100 und H41 (Sartorius, Göttingen)
Wasseraufbereitungsanlage	Seralpur DELTA (USF Seral, Ransbach-Baumbach)
Wasserbäder	verschiedene Größen (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Zentrifugen	Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg) Biofuge B (Heraeus, Hanau) SIGMA 4K10 (B. Braun, Melsungen) Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) Sorvall RC 5B (DuPont Instruments, Bad Homburg)

3.1.2 Materialien

Chemikalien	Es wurden Chemikalien der Firmen Ambion (Austin, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Applichem (Darmstadt), JTBaker (über Fisher Scientific, Schwerte), Biozol (Eching), Biozym (Hessisch Oldendorf), Calbiochem (Darmstadt), Difco (Detroit, USA), Fluka (Seelze), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Leiden, NL), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen der Reinheitsstufe <i>pro analysi</i> oder höherer Qualität.
Enzyme	<i>NdeI</i> , <i>SacII</i> , <i>PstI</i> , <i>RsaI</i> , <i>SphI</i> (New England Biolabs, Frankfurt, oder Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) RNase, Proteinase K, T3, T7 und Sp6 RNA-Polymerase, Klenow Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) Superscript II Reverse Transcriptase (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) RQ1 DNase (Promega, Mannheim) Lysozym (Serva, Heidelberg) Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg)
Oligonukleotide	GibcoBRL Life Technologies (Karlsruhe) MWG Biotech (München) Sigma-Ark (Deisenhofen) Interactiva (München) Eine Aufstellung aller verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.
Radionukleotide	[α -P ³²]dCTP, 3000 Ci/mmol am Referenztag (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Primäre Antikörper	Schaf anti-DIG F(ab') ₂ Fragmente, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (AP), Schaf anti-Fluorescein F(ab') ₂ Fragmente, gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase (POD) (Roche Diagnostics, Mannheim) Maus anti-Zns-2 IgG1 κ (Universität von Oregon, Eugene, USA) Maus anti-Hu (Mab16A11) IgG2b κ (Dr. M. F. Marusich, Universität Oregon, Eugene, USA) Maus anti-„Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) (Biogenex, Hamburg)
Sekundäre Antikörper	Ziege anti-Maus Antikörper, gekoppelt an CY3 bzw. POD (Dianova, Hamburg)
Substrate	NBT/BCIP, CDP-Star™ (Roche Diagnostics, Mannheim) DAB (Roche Diagnostics, Mannheim)
Farbstoffe	DiI, PicoGreen™, RiboGreen™ (Molecular Probes, Leiden, NL) DAPI (Sigma, Deisenhofen)
Einbettungsmedien	Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK) TissueTek® (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, USA)

Membranen/ Filterpa- piere	Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) Nylon Membranes positively charged (Roche Diagnostics, Mann- heim) GB 003 Gel-Blotting Papier (Schleicher & Schüll, bezogen über Fisher Scientific, Schwerte)
Röntgenfilme	XLS-1 und X-OMAT™ AR (Kodak, Stuttgart) in verschiedenen Größen
Diafilme	Ektachrome 160 T (Kodak, Stuttgart)
Plastikeinmalartikel	Castor, über Fisher Scientific, Schwerte Greiner, Frickenhausen MßP, über Fischer Scientific, Schwerte Sarstedt, Nümbrecht TPP, über Fisher Scientific, Schwerte Whatman Biometra, Göttingen

3.1.3 Herstellung von Lösungen

Für molekularbiologische Lösungen wird Wasser aus einer SeralPur Aufarbeitungsanlage entnommen. Die Lösungen werden entweder für 20 Minuten bei 121 bar autoklaviert oder steril filtriert (0,2 bis 0,45 µm Porendurchmesser).

Zur irreversiblen Inhibierung von RNasen werden Lösungen für RNA-Arbeiten mit 0,1% (w/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert und danach autoklaviert. Tris-haltige Lösungen und Lösungen mit anderen Nukleophilen werden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt, da DEPC mit nukleophilen Substanzen reagiert. Glasgeräte werden autoklaviert und für 2 Stunden bei 200°C sterilisiert. Soweit nicht anders vermerkt, werden die Stammlösungen EDTA, PBS, TAE, TE, SDS und SSC nach den Beschreibungen in Sambrook *et al.* (1989) angesetzt. Prozentangaben sind in Gewicht pro Volumen (w/v) gehalten sofern nichts anderes vermerkt ist.

3.2 Arbeiten mit *Danio rerio*

3.2.1 Verwendete Stämme von *Danio rerio*

In dieser Arbeit werden die aus Inzucht hervorgegangenen Wildtyp *Danio rerio* Stämme Ab/Ab (Universität Oregon, Eugene, USA) und TÜ/TÜ (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) sowie die F1 Generation aus Ab/Ab und TÜ/TÜ und folgende Generationen, der CO/CO Stamm (Universität zu Köln, Institut für Entwicklungsbiologie, Prof. Campos-Ortega) und *Danio rerio* aus einer lokalen Tierhandlung und deren F1 Generation verwendet.

3.2.2 Haltung und Aufzucht

Adulte Zebrabärblinge werden zu maximal 50 Tieren in 20 l Durchflussbecken (Aquariumsanlage, Firma Schwarz, Göttingen) bei einem Hell/Dunkelrhythmus von 14 zu 10 Stunden

und 28°C gehalten. Sie werden zweimal täglich mit TetraMin (Tetra, Melle) Trockenfutter *ad libitum* gefüttert. Das Wasser der Anlage ist eine Mischung aus jeweils 50 % (v/v) deionisiertem Wasser und Leitungswasser.

Die Eiablage und die Aufzucht der Embryonen folgt den Protokollen von Westerfield *et al.* (1994). Jungfische werden ab Tag 6 mit TetraMin Mini (Tetra, Melle) und ab der 3. Woche mit Nauplien (*Artemia salina*, Brustmann, Oestrich-Winkel) gefüttert.

Für *whole mount in situ* Hybridisierungsstudien werden Embryonen nach dem Epiboly-Stadium (etwa 12 h „postfertilization“, hpf) in 1-Phenyl-2-thioharnstoff (PTU)-haltiges Medium transferiert, um die Färbung der Melanozyten zu inhibieren (Westerfield *et al.*, 1994). Schwach gefärbte Pigmentzellen erleichtern die Analyse des Expressionsmuster im *whole mount* gefärbten Embryo.

Die Bestimmung und Einteilung der Entwicklungsstadien erfolgt durch Beobachtung unter dem Stereomikroskop (Kimmel *et al.*, 1995).

Für die vorliegende Arbeit wurden adulte *Danio rerio* (ab 6 Monate) und Embryonen im 48 hpf und 72 hpf Stadium verwendet.

3.2.3 Isolierung der olfaktorischen Epithelien und Bulbi

Zebrabärblinge werden mit einem Skalpell dekapitiert. Unter einem Stereomikroskop werden mit Hilfe von Irisscheren und Uhrmacherpinzetten in eiskaltem PBS, pH 7.4, die olfaktorischen Epithelien und die *Bulbi olfactorii* mit anhängendem Telencephalon freigelegt und entnommen. Das DiI-gefärbte glomeruläre Muster wird direkt analysiert (vgl. 3.5.2) oder die Präparate werden für *whole mount* Färbungen in 4 % PFA (in PBS) fixiert (vgl. 3.4.2 und 3.5.1). Für die Herstellung von Gefrierschnitten werden die olfaktorischen Epithelien bzw. die Bulbi mit Telencephalon in TissueTek® (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, USA) ausgerichtet, „fresh frozen“ konserviert und bei -70°C gelagert.

3.2.4 Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneurone mit Zinksulfat

Für die RNA-Isolation aus olfaktorischen Bulbi, die viele einwachsenden Axone olfaktorischer Rezeptorneurone enthalten, werden selektiv die olfaktorischen Rezeptorneurone mit Zinksulfat degeneriert.

Die Applikationszeit wurde ausgehend von früheren Arbeiten (Korsching, 1995; Kraus, 1999) im Laufe des Projektes zu zweimal 150 Sekunden optimiert. Die doppelte Applikation einer geringen Menge 3 % Zinksulfatlösung (1 - 2 µl) führte zu einem vergleichbaren Effekt auf das glomeruläre Muster wie die 5-minütige Inkubation eines größeren Volumens in einem kontinuierlichen Fluss (Abb. 3-1). In beiden Fällen war im linken olfaktorischen Bulbus keine axonale Färbung zu erkennen, während der rechte Bulbus axonale Strukturen zeigte.

Alle folgenden Degenerationen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: Adulte Zebrabärblinge werden in einer 0,01 % Tricaine-Lösung (3-Aminobenzoessäureethylester; Sigma, Deisenhofen) narkotisiert (Westerfield *et al.*, 1994) und in feuchten Kleenextüchern (Kimberly-Clark, bezogen über Fisher Scientific, Schwerte) unter einem Stereomikroskop (10-30 x) positioniert. Mit Hilfe einer feinzulaufenden Pipettenspitze („GelLoader“, Eppendorf, Hamburg) wird zweimal für 150 Sekunden 1 bis 2 µl 3 %-ige Zinksulfatlösung (versetzt mit 0,1 % Phenolrot) so in die linke Nasenöffnung injiziert, dass sie die rechte Nasenöffnung, das Maul oder die Augen nicht erreicht. Zwischen den Applikationen und an die Tiefe der

Narkose angepasst, wird Tricaine-Lösung über den gesamte Fisch und in sein Maul gespült. Nach dem Ende der Behandlung werden die Zebraquarablinge in Aquariumswasser überführt, erwachen spontan und werden unter den üblichen Bedingungen gehalten.

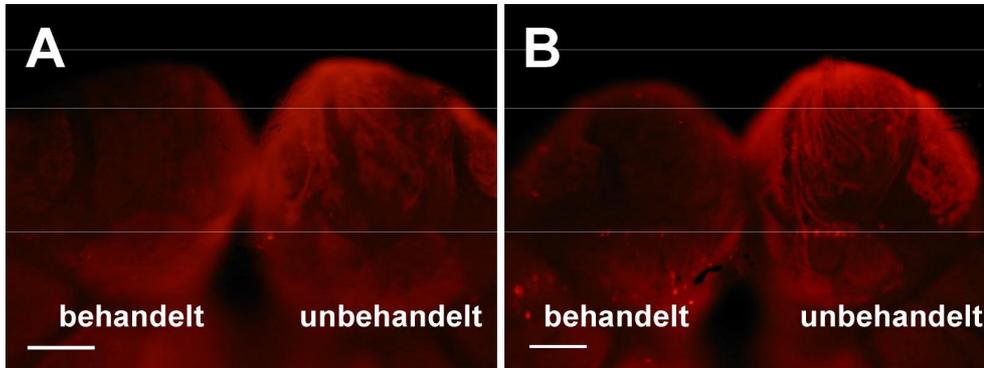


Abbildung 3-1: Vergleich von zwei Applikationstechniken für 3 %-iger Zinksulfatlösung. Zwei Tage nach der Behandlung wird der afferente Teil des glomerulären Musters mit Zns-2 Antikörper markiert und über einen Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper visualisiert (vgl. 3.5.2). A) Etwa 1 ml 3 %-ige Zinksulfatlösung wird in einem kontinuierlichen Fluss 5 Minuten durch das linke olfaktorische Epithel gespült. B) Jeweils 1 bis 2 µl 3 %-ige Zinksulfatlösung wird zweimal 150 Sekunden in das olfaktorische Epithel appliziert (siehe Text). Der Maßstab beträgt 100 µm.

3.3 Gewebeschnitte am Kryostaten

3.3.1 Histologische Schnitte von Embryonen und von olfaktorischen Bulbi und Epithelien aus adulten *Danio rerio*

Beschichten der Objektträger und der Deckgläschen

Um die Haftung von Gefrierschnitten an den Glasobjektträgern zu verbessern, werden diese beschichtet. Für die Beschichtung mit Gelatine werden die Objektträger zunächst für 30 Minuten in einer sauren Ethanollösung (1% HCl (v/v) in 70% (v/v) Ethanol) gewaschen und danach 3 bis 4 mal in deionisiertem Wasser gespült. Die sauberen und trockenen Objektträger werden für 30 Sekunden in Gelatine/Chromalaun-Lösung geschwenkt (2 g Gelatine unter Rühren in 500 ml kaltem Wasser lösen, auf 60 °C erhitzen, mit 0,2 g Chromalaun versetzen, über einen Faltenfilter filtrieren) und über Nacht staubfrei getrocknet.

Deckgläschen werden mit Repel Silane® (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) überzogen, um unspezifische Bindungen der RNA-Sonden und Antikörper zu verhindern. Vorbereitete Deckgläschen werden für jeweils 5 Sekunden in Repel Silane®, Aceton und Ethanol inkubiert und staubfrei getrocknet.

Gefrierschnitte von olfaktorischen Bulbi und Epithelien

Olfaktorische Epithelien werden mit der Rosette nach oben und die *Bulbi olfactorii* mit anhängendem Telencephalon ventral aufwärts in Schnappdeckeln in „TissueTek“ (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, USA) eingebettet bei 20°C eingefroren („fresh frozen“).

Während die Epithelien bei 10 μm geschnitten werden können, hat sich für die *Bulbi olfactorii* eine Schnittdicke von 15 μm als geeignet erwiesen. Schnitte für *in situ* Hybridisierungen werden auf beschichteten Superfrost plus® (über Fisher Scientific, Schwerte) Objektträgern aufgenommen, 2 Stunden bei 60°C getrocknet und entweder unmittelbar verwendet oder bei -70°C gelagert. Für immunhistologische Analysen werden Gelatine-beschichtete Objektträger verwendet.

Gefrierschnitte von Embryonen

Von Paraformaldehyd (PFA)-fixierten Embryonen werden nach der *whole mount in situ* Hybridisierung Gefrierschnitte angefertigt, um die Färbungen im Inneren des Embryos zu analysieren. Der beste Gewebeerhalt wird erzielt, wenn die Embryonen mindestens 12 Stunden bei 4°C in TissueTek® vorinkubiert werden. Sie werden danach dorsal oder rostral aufwärts in frischem TissueTek® ausgerichtet und bei -20°C gefroren. Die Präparate werden bei 15 μm Schnittdicke geschnitten, auf unbehandelten oder Gelatine-beschichteten Objektträgern aufgenommen und mit Mowiol (Niles, IL, USA) luftblasenfrei konserviert.

3.3.2 Präparative Schnitte zur Gewinnung von lateral und medial gelegenen Gewebe des *Bulbus olfactorius*

Für die Gewinnung von mRNA aus dem lateralen und medialen Teil des *Bulbus olfactorius* werden adulte Zebrafärblinge aus einer Tierhandlung verwendet. Jeweils ein *Bulbus olfactorius* wird mit seinem anliegenden Telencephalon in TissueTek® eingebettet und eingefroren. Die mediale oder die laterale Bulbusseite weist nach oben, um die Erstellung von Gefrierschnitten von den beiden Seiten zu ermöglichen. Der Übergang von Bulbus zu Telencephalon wird mit einem kurzen farbigen Nylonfaden markiert, um das Präparat vor dem Schneiden so zu trimmen, dass das Telencephalon wegfällt (Abb. 3-2). Der verbleibende Bulbus wird von oben her, d. h. von medial bzw. lateral, in fünf 20 μm tiefen Schnitten etwa 100 μm tief ins Gewebe geschnitten. Die Schnitte werden in vorgekühlten Reaktionsgefäßen aufgefangen und bis zur RNA-Isolierung bei -70°C gelagert.

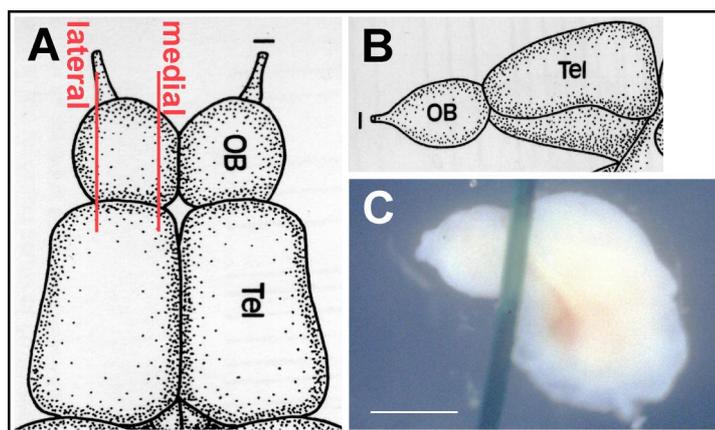


Abbildung 3-2: Ausrichtung des olfaktorischen Bulbus zur Gewinnung der lateralen und medialen Gewebeabschnitte. A) Dorsale Ansicht auf die olfaktorischen Bulbi (OB) und die Telencephalii (Tel) (modifiziert, nach Wullimann *et al.*, 1996). B) Laterale Ansicht auf den *Bulbus olfactorius* und das Telencephalon (entnommen aus Wullimann *et al.*, 1996). C) Einbettung eines olfaktorischen Bulbus in TissueTek® für die Gewinnung des lateralen Gewebeabschnitts. Der Nylonfaden deutet die Grenze zwischen olfaktorischen Bulbus und Telencephalon an (laterale Ansicht). Der Maßstab in A) und B) beträgt 100 μm und in C) 500 μm .

3.4 *In situ* Hybridisierungen

3.4.1 *In situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten

In *in situ* Hybridisierungsstudien an Gewebeschnitten wird mit Hilfe von DIG-markierten RNA-Sonden die genaue Lokalisation der differentiell exprimierten Transkripte im *Bulbus olfactorius* und Telencephalon untersucht. Das *in situ* Hybridisierungsprotokoll ist in Weth *et al.* (1996) beschrieben.

3.4.2 *In situ* Hybridisierung an *whole mount* Präparaten

Für einen besseren Überblick über die räumliche Verteilung einiger Transkripte, werden *whole mount in situ* Hybridisierungen an *Bulbi olfactorii* mit anhängenden Telencephalons durchgeführt. Das Protokoll wurde von A. Celik zur Verfügung gestellt (2001) und basiert auf einer Vorschrift von F. Weth (2001). Es ist im Anhang aufgeführt.

3.4.3 *In situ* Hybridisierung an *whole mount* Embryonen

In situ Hybridisierungen an *whole mount* Embryonen (48 h und 72 h) werden gemäß dem Protokoll in „The Zebrafish Book“ durchgeführt, das auf der Anleitung von Schulte-Merker *et al.* (1992) basiert. Auf die optionale Behandlung mit Acetanhydrid und die RNase-Behandlung wird verzichtet. Nach der Färbung werden die Embryonen in PBS bei 4°C gelagert.

3.5 Färbungen

3.5.1 Immunohistochemische Detektion der Axone der Rezeptorneurone im *whole mount Bulbus olfactorius* mit dem Zns-2 Antikörper

Der Verlust des glomerulären Musters im olfaktorischen Bulbus nach der Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneurone, die durch eine Behandlung mit Zinksulfat ausgelöst wurde, soll visualisiert werden und quantitativ verfolgt werden.

Obwohl Whitlock und Westerfield (1998) das vom Zns-2-Antikörper erkannte Antigen den Pionierneuronen im olfaktorischen System zuordnen, zeigen die Ergebnisse von S. Berger (1998) und A. Celik (2001), dass der Antikörper Zns-2 im adulten Zebrabärbling die in den *Bulbus olfactorius* projizierenden und Glomeruli bildenden Axone markiert. Das glomeruläre Muster im *Bulbus olfactorius* ist besonders gut in *whole mount* Präparaten nachzuvollziehen.

Das Protokoll wurde von A. Celik (2001) entwickelt. Zusammenhängende Präparate aus beiden Telencephalons und *Bulbi olfactorii* werden zwei Tage bei 4 °C in 4 % PFA (in PBS) fixiert. Nachdem das PFA in drei TBS-Waschschritten zu 10 Minuten entfernt worden ist, werden endogene Phosphatasen 20 Minuten durch 0,6 % H₂O₂ in 80 % Methanol irreversibel gehemmt. Es folgen dreimal 10 Minuten Waschen mit TBS (1,5 M NaCl, 30 mM KCl, 200 mM Tris-Cl, pH 7,4), 10 Minuten Permeabilisieren in 0,25 % TritonX-100 und 0,5 M NH₄Cl (in TBS), zweimal Waschen in TBS und 1 Stunde Blockieren mit 5 % BSA (in TBS) gegen

unspezifische Bindungsstellen. Der Zns-2 Antikörper wird über Nacht in 0,8 % BSA (in TBS) in einer 1:500 Verdünnung appliziert. Am folgenden Tag wird intensiv mit TBS gewaschen (mindestens viermal 10 Minuten), mit 3 % NGS (Normal Goat Serum, GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) und 0,8 % BSA (in TBS) werden eine Stunde bei Raumtemperatur unspezifische Bindungsstellen abgesättigt, eine Stunde wird mit dem Ziege anti-Maus HPO Antikörper oder Ziege anti-Maus-Cy3 Antikörper (1:100) in 0,8 % BSA in TBS inkubiert und fünfmal für 10 Minuten mit TBS gewaschen. Die Entwicklung der DAB Farbreaktion wird unter einem Stereomikroskop verfolgt und durch waschen der Präparate in TBS abgestoppt. Die fluoreszente Cy3-Färbung wird unter dem Fluoreszenzbinokular analysiert.

3.5.2 Färbungen mit dem lipophilen Membranfarbstoff DiI und quantitative Analyse des regenerierenden glomerulären Musters

Färbung des glomerulären Musters mit DiI

Alternativ zur immunohistochemischen Detektion können die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone mit dem lipophilen Membranfarbstoff DiI (1-1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat), der lateral in der Plasmamembran diffundiert, visualisiert werden. Eine Applikation auf das olfaktorische Epithel von *Danio rerio* (Baier und Korsching, 1994) färbt die Glomeruli des *Bulbus olfactorius* anterograd an. Um eine sehr reproduzierbare und gleichmäßige Färbung von beiden *Bulbi olfactorii* zu erhalten, die für die quantitative Analyse entscheidend ist, wird die Applikation über ein „DiI Bad“ entwickelt. Hier werden die Zebraabärblinge kurz in einer DiI-haltigen Lösung inkubiert und das glomeruläre Muster nach zwei Tagen analysiert.

Die Inkubation von Zebraabärblingen in frisch angesetzter DiI-Lösung (10 µg/ml) färbt die olfaktorischen Glomeruli an (Abb. 3-3A,B). Wird dieselbe DiI-Lösung nochmals verwendet, werden die axonalen Strukturen nicht angefärbt (Abb. 3-3D). Auch die Farbstoffaufnahme des Epithels ist wesentlich geringer als die Aufnahme aus frisch hergestellter Lösung (Abb. 3-3E,F). Für die Analyse des glomerulären Musters werden die stark angefärbten olfaktorischen Epithelien entfernt, da sie mit ihrem Signal die Färbung der axonalen Strukturen in den olfaktorischen Bulbi überlagern (Abb. 3-3A,C). Selten werden Tröpfchen-artige Färbungen beobachtet, die nicht mit besonderen Inkubationsbedingungen in Verbindung gebracht werden können (Abb. 3-3G). Diese Färbungen werden von den Analysen ausgeschlossen (s. u.).

Für eine intensive und reproduzierbare Färbung ist eine effiziente Lösung des in wässriger Lösung zur Kristallbildung neigenden Farbstoffs vor jeder Applikationsrunde nötig. Die besten Ergebnisse werden mit folgendem Protokoll erzielt. Die Stammlösung (5 mg/ 100µl Dimethylformamid) wird 30 Minuten auf 50°C erhitzt, 30 Minuten im Ultraschallbad inkubiert und nochmals mindestens 30 Minuten auf 50°C bis zur Anwendung erhitzt. Zebraabärblinge werden in Erlenmeyerkolben mit je 50 ml frischen Aquariumswasser pro Fisch gesetzt. Nach der Untermischung von 10 µl DiI-Stammlösung (10 µg/ ml final) je Fisch kristallisiert das DiI in Mikrokristallen an den exponierten Epithelien der Fische. Die Inkubationszeit spielt nur eine geringe Rolle, da die feinen DiI-Mikrokristalle nur in den ersten Minuten vorliegen. Nach 5 bis 15 Minuten werden die Fische in Frischwasserbecken transferiert und zwei Tage unter Lichtausschluß gehalten. Das glomeruläre Muster wird unter dem Fluoreszenzstereomikroskop analysiert.

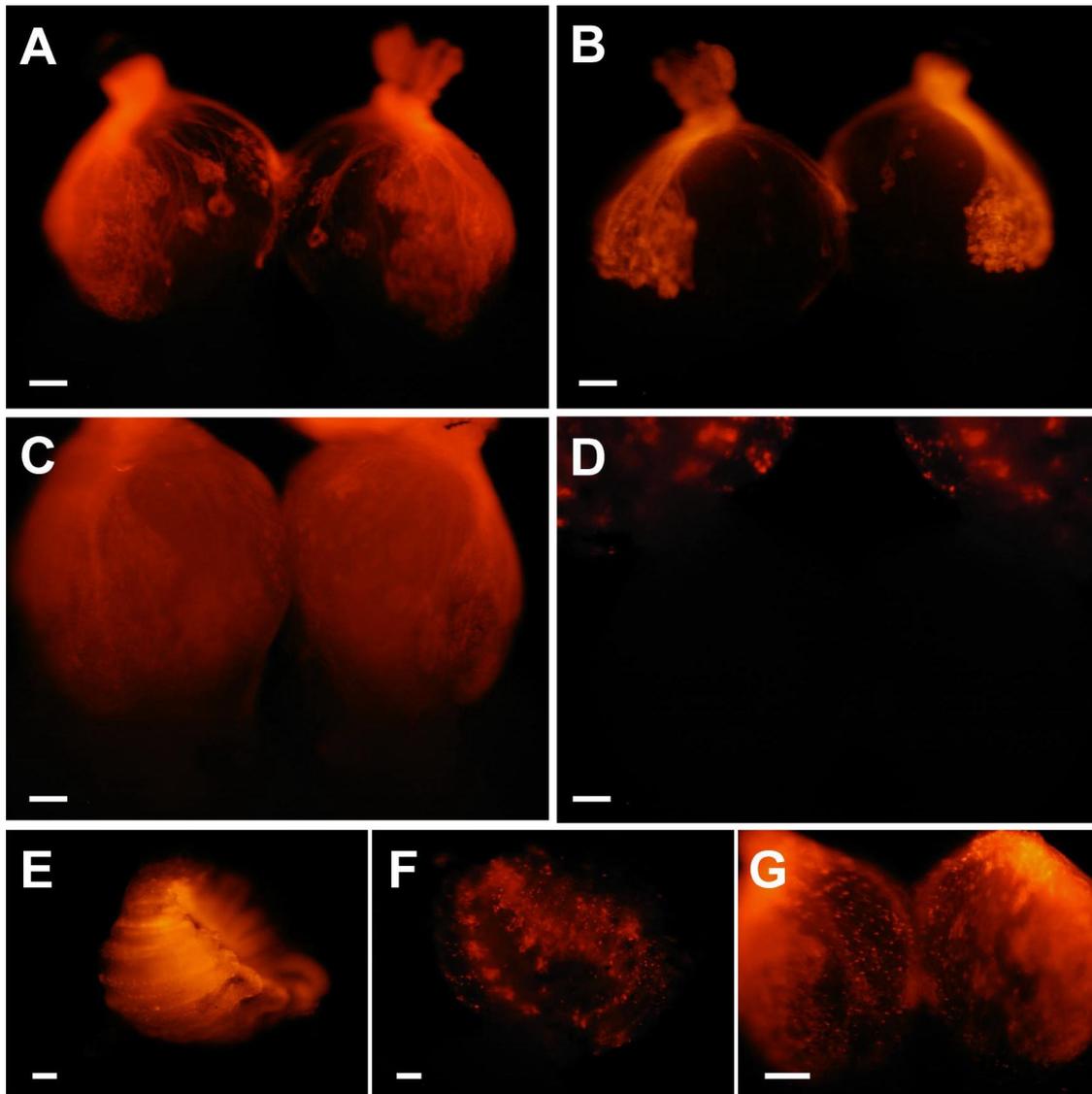


Abbildung 3-3: Optimierung der DiI-Applikation mit Hilfe des „DiI-Bades“. A) Ventrale Ansicht und B) dorsale Ansicht auf olfaktorische Bulbi, die 30 Minuten in einem frisch-angesetzten „DiI-Bad“ 2 Tage vor der Präparation inkubiert wurden. C) Präparat aus A) in ventraler Ansicht mit anhängenden olfaktorischen Epithelien. D) Ventrale Ansicht auf zwei olfaktorische Bulbi, die 60 Minuten in einem „DiI-Bad“, das zuvor für eine andere Färbung benutzt worden war, inkubiert wurden (2 Tage vor Präparation). E) Olfaktorisches Epithel zwei Tage nach einer erfolgreichen Färbung. F) Olfaktorisches Epithel zu D). G) Tröpfchen-artige Färbung in der ventralen Ansicht auf zwei olfaktorische Bulbi. Der Maßstab in A) bis F) beträgt 50 μm und in G) 100 μm .

Quantitative Analyse des regenerierenden glomerulären Musters

Die Regeneration des DiI-gefärbten glomerulären Musters wird über die integrierte Fluoreszenzintensität der behandelten im Vergleich zur unbehandelten Seite quantitativ verfolgt. Hierzu werden die ventrale Ansichten der olfaktorischen Bulbi ausgewertet, da hier mehr einzelne olfaktorische Glomeruli identifizierbar sind und das dorsale *Cluster* aufgrund seiner Dichte zur Überstrahlung (orange Färbung) neigt (Abb. 3-3A,B).

Gefärbte Präparate werden am SMZ-U Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Düsseldorf) mit der digitalen Coolpix 950 Kamera (Nikon) fotografiert. Der Fluoreszenzlichtstrahl wird so ausge-

richtet, dass das Präparat möglichst gleichmäßig ausgeleuchtet wird. Von einem Präparat wird jeweils eine Serie von Bildern gemacht: mit vollständiger, mit dreiviertel und mit halber Öffnung der Fluoreszenzblende. Um Unterschiede in der Beleuchtung auszuschließen, wird von jedem Präparat eine weitere Serie aufgenommen, in der es um 180° gedreht wurde. Die Digitalkamera erzeugt bei maximaler Auflösung („fine“) komprimierte 475K JPG-Bilddateien, die auf den Image Mate™ Datenträger (SanDisk, Sunnyvale, CA, USA) gespeichert werden.

Die Bilddatei wird in Adobe® Photoshop® 5.0 (Adobe, San Jose, CA, USA) geöffnet und auf drei Kanäle aufgetrennt. Die Datei des roten und des grünen Kanals wird als JPG-Datei gespeichert (Breite: 1600 Pixel, Höhe: 1200 Pixel) und mit NIH Image 1.6.2 (National Institutes of Health, USA) wieder geöffnet. Hier wird die Darstellung des Bildes zunächst invertiert, so dass die DiI gefärbten Axone grau bis schwarz erscheinen. Die Invertierung der Pixel Werte resultiert in dem gewünschten Format. Mit der Funktion *Enhance Contrast* wird die Ansicht, aber die Werte der Pixel verändern sich nicht. Nach der Markierung einer entsprechenden Fläche zeigt die Funktion *Analyze* die Größe, die mittlere Pixelgröße, den geringsten und den höchsten Pixelwert der Fläche an. Die Größe der Fläche kann relativ beliebig gewählt werden, denn um die olfaktorischen Bulbi herum beträgt der Pixelwert 0. Die erhaltenen Werte werden in Microsoft Excel 98 für Macintosh (Microsoft, www.microsoft.com) übertragen und das Integral der Pixelwerte pro olfaktorischen Bulbus berechnet. Der Quotient des Integrals auf der behandelten und der unbehandelten Seite wird als Maß für die Degeneration benutzt. Die Quotienten von verschiedenen Tieren einer Reihe werden gemittelt und der Standardfehler bestimmt.

3.5.3 Immunohistochemische Detektion des Hu-Proteins an Schnitten

Das Hu-Protein ist ein RNA-bindendes Protein, das in Neuronen vorkommt. Der Hu-Antikörper wird verwendet, um Aufschluss über den Zustand bzw. die Größe der Neuronpopulation im olfaktorischen Epithel nach der ZnSO₄-Behandlung zu erhalten.

Das Protokoll folgt der Empfehlung von Berger (1998), keine Proteinase K-Behandlung durchzuführen, weil sie zu einer verminderten Signalintensität führt.

Mit Ausnahme der Antikörperinkubationen und des Farbnachweises werden die Inkubationen in histologischen Küvetten durchgeführt. Gefrierschnitte auf Gelatine-überzogenen Objektträgern werden 10 Minuten in 4 % PFA fixiert, 5 Minuten in PBS gewaschen, 10 Minuten in 0,2 N HCl permeabilisiert, 5 Minuten in PBS gewaschen und für eine Stunde in 5 % BSA in TBS blockiert. Der Hu-Antikörper wird in einer 1:100 Verdünnung in 0,8 % BSA (in TBS) bei 4 °C in einer feuchten Kammer über Nacht auf dem Gewebe inkubiert. Nach drei PBS Waschschrritten wird der Hu-Antikörper über Nacht mit dem sekundären Ziege gegen Maus HPO Antikörper detektiert. Dem dreimaligen Waschen mit PBS (je 5 Minuten) folgt die Färbungsreaktion mit DAB bis zur gewünschten Signalstärke.

3.5.4 Immunohistochemische Detektion von „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) an Schnitten

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist ein im Zellzyklus reguliertes Hilfsprotein der DNA Polymerase Delta und kommt präferentiell in sich teilenden Zellen vor. Hier soll der PCNA-Nachweis die Proliferation im olfaktorischen Bulbus nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneurone im olfaktorischen Epithel beschreiben.

Um das Antigen für eine immunohistochemische Detektion mit dem PCNA-Antikörper (Biogenex, Hamburg) freizulegen wird eine Behandlung der Schnitte mit einer „Antigen Retrieval Citrat Solution“ (Biogenex, Hamburg) empfohlen (Shi *et al.*, 1991). Gewebeschnitte auf Gelatine-beschichteten Objektträgern werden 10 Minuten in 4 % PFA fixiert. Danach werden die Schnitte gemäß den Hersteller Angaben mit der „Antigen Retrieval Citrat Solution“ behandelt. Für die Bosch Mikrowelle und 100 ml Lösung für 4 Objektträger ergeben sich folgende Inkubationszeiten: 6 bis 7 Minuten bei 600 W bis es zu einem raschen Aufkochen kommt und 10 Minuten bei 360 W. Danach kühlen die Objektträger langsam auf Raumtemperatur ab, werden in PBS gewaschen und für 1 Stunde in 5 % BSA in PBS inkubiert. Eine 1:25 Verdünnung des PCNA-Antikörpers (in 0,8 % BSA in PBS) bindet über Nacht bei 4°C am Antigen. Überschüssiger Antikörper wird in drei PBS Waschschritten von jeweils 5 Minuten entfernt. Zur Detektion des PCNA-Antikörpers wird zunächst eine Stunde in 0,8 % BSA, 3 % NGS in PBS blockiert und dann mit einer 1:100 Verdünnung Ziege gegen Maus Antikörper HPO-gekoppelt inkubiert. Die enzymatische Umsetzung von DAB findet unter Lichtausschluss statt.

3.5.5 TUNEL Färbung an Gewebeschnitten

Um sicherzustellen, dass zum Zeitpunkt der RNA-Gewinnung im olfaktorischen Bulbus die Apoptoserate nicht erhöht ist, und um die Wirkung des Zinksulfats auf die olfaktorischen Epithelien zu untersuchen, sollen apoptotische Zellen mit Hilfe des TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase End Labeling) Assays nachgewiesen werden (zusammengefasst in Bortner, 1995). Apoptotische Zellen zeichnen sich u.a. durch DNA-Fragmentierung, Veränderungen in der Zellmembran und die Bildung von *Apoptotic Bodies* aus. In Gewebeschnitten können freie 3'-Hydroxy-Termini, die bei Einzel- und Doppelstrangbrüchen entstehen, mit Hilfe der terminalen Deoxynukleotidtransferase (tDt), Fluorescein-markiertem dUTP (Flu-dUTP) und einem Anti-Fluorescein-POD Konjugat entweder direkt oder immunologisch detektiert werden („*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD“ von Roche Diagnostics, Mannheim). Der direkte Nachweis zeigt weniger unspezifischen Hintergrund, während die immunohistochemische Detektion eine Analyse unter dem Lichtmikroskop erlaubt.

Das Protokoll des Herstellers wurde für Gefrierschnitte vom olfaktorischen Bulbus und Epithel modifiziert, da die Behandlungen mit Proteinase K und mit Methanol/ H₂O₂ zu hohem Hintergrund führten (Abb. 3-4).

Während nach der Permeabilisierung durch Proteinase K und chemischer Blockierung durch Wasserstoffperoxid/ Methanol sehr viele Zellen ein TUNEL-positives Signal zeigten (Abb. 3-4A,B), wurden mit dem modifizierten Protokoll nur gelegentlich Zellen in den Randbereichen des olfaktorischen Bulbus markiert (Abb. 3-4C). Diese Färbungen sind vermutlich unspezifisch und sind durch leichte Gewebeschäden während der Präparation oder durch wiederholtes Einfrieren und Antauen der Schnitte entstanden. Die Markierung aller Zellen in der positiven und die Signal-freie negative Kontrolle belegen die Spezifität und die Sensitivität des modifizierten Protokolls (Abb. 3-4D,E).

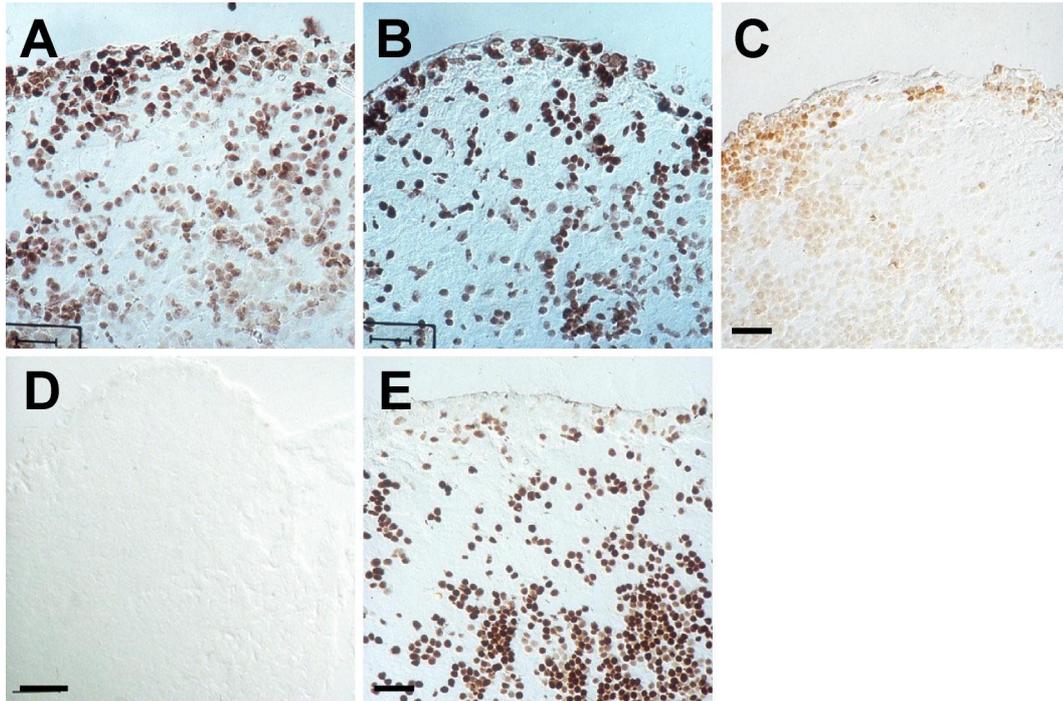


Abbildung 3-4: Optimierung des TUNEL-Protokolls für Gefrierschnitte des olfaktorischen Bulbus und Epithels. A) Permeabilisierung des Gewebes durch eine 10-minütige Proteinase K-Inkubation (1 µg/ ml) bei 37°C. B) Blockierung endogener Phosphatasen mit einem 20-minütigen Inkubationsschritt in 80 % MeOH/ 0,6 % H₂O₂. Entsprechende TdT-freie negative Kontrollen zeigten keine Färbung (nicht gezeigt). C) Das modifizierte Protokoll verzichtet auf Permeabilisierungs- und chemische Blockierungsschritte und führt so nur an einigen Schnitträndern zu Signalen (maximale Ausprägung gezeigt). D) Negative Kontrolle, modifiziertes Protokoll. E) Positive Kontrolle, modifiziertes Protokoll. Der Maßstab beträgt 25 µm.

Die besten Resultate (keine unspezifischen Färbungen im Randbereich) werden mit Gefrierschnitten erzielt, die nur für ihre TUNEL-Färbung aus dem -80°C-Gefrierschrank entnommen wurden. Sie werden 60 Minuten in 4 % PFA fixiert und anschließend dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Zur Detektion der freien 3'-Hydroxytermini werden die Gewebeschnitte für 1 Stunde bei 37°C mit TUNEL-Label (enthält tD-Transferase und Flu-dUTP) inkubiert. Nach drei PBS-Waschschritten und einer Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI, können die Schnitte in Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK) eingebettet und unter dem Axiophot analysiert werden. Für eine lichtmikroskopische Analyse werden die unspezifischen Bindungsstellen des Gewebes eine Stunde abgesättigt (3 % BSA, 3 % Schafserum, 1 % Blockierungsreagenz in PBS). Das 1:2 verdünnte Anti-Fluorescein-POD Konjugat bindet über Nacht bei 4 °C an das Fluorescein-markierte dUTP. Die Peroxidase Aktivität wird mit DAB innerhalb von 3 bis 10 Minuten nachgewiesen. Die Präparate werden in Mowiol eingebettet. Eine positive Kontrolle wird erzeugt, indem die DNA des Gewebes 30 Minuten bei 37°C mit 50 µg/ml DNase gespalten wird und für die negative Kontrolle wird auf die Inkubation mit TUNEL-Label verzichtet.

3.6 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Die Grundlage für die Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*) sind die Ausführungen von Sambrook *et al.* (1989).

3.6.1 Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Epicurian Coli® XL1-Blue MRF' Genotyp: *delta(mcrA)183delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZdeltaM15 Tn10(Tet^r)]*
(Stratagene, Heidelberg)

Die „Blau-Weiß-Selektion“ ist möglich und der Stamm ist besonders geeignet, weil er nicht rekombinieren kann.

3.6.2 Anzucht und Konservierung von Bakterien

Rekombinante *E.coli* werden auf LB-Agarplatten (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7.0), die Ampizillin (70 µg/ml) und Tetrazyklin (10 µg/ml) enthalten (LB/amp/tet-Platten), in verschiedenen Verdünnungen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die „Blau-Weiß-Selektion“ werden die Platten zusätzlich mit X-Gal (80 µg/ml) und IPTG (500 µm/ml) versetzt. Einzelne Kolonien werden bei 37°C unter Schütteln (etwa 300 rpm) in Antibiotika-haltigem (Ampizillin (70 µg/ml), Tetrazyklin (10 µg/ml)) LB-Medium (LB/amp/tet-Medium) über Nacht oder kürzer angezogen.

Ein Bakterienstamm kann auf einer Kulturplatte etwa 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Zum Anlegen von Dauerkulturen werden 850 µl über Nacht gewachsene Flüssigkultur mit 150 µl sterilem Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

3.6.3 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation durch Elektroporation

Elektrokompetente Zellen werden aus dem *E.coli* XL1 Blue Stamm nach Dower *et al.* (1988) hergestellt. Ausgehend von einer Einzelkolonie werden Bakterien bis hin zur exponentiellen Wachstumsphase in 1 l LB/tet-Medium vermehrt. In mehreren Schritten wird das Pellet mit eiskaltem Wasser gewaschen, in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, zu 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

Für die Elektroporation wird ein Aliquot elektrokompetenter Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 1 µl Ligationsansatz (bis zu 5 ng Plasmid) oder entsprechend verdünnter Plasmidlösung versetzt, in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette pipettiert und für 1 Minute auf Eis gestellt. Die Bakterien werden bei 18 kV/cm, 25 µF und 2,5 kV im Gene Pulser transformiert, 1 Stunde bei 37°C in 1 ml LB-Medium inkubiert und in verschiedenen Verdünnungen auf X-Gal- und IPTG- haltigen LB/amp/tet-Agarplatten selektioniert.

3.6.4 Arbeiten mit bakteriellen cDNA-Bibliotheken

Zur Isolierung von kompletten cDNA Sequenzen wurde die „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliotheken durchsucht. Die „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek wurde von S. Korsching

(1995) hergestellt. Die Replikafilter wurden von A. Celik (2001) und S. Fuss (2001) angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die beiden Replika Filterabzüge (Hybond N RPN 132N von Amersahm Pharmacia Biotech, Freiburg) einer Nitrocellulosemembran Masterplatte (etwa 50000 bakterielle Kolonien) werden simultan mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert. Signale, die auf beiden Filtern vorhanden sind, werden als positiv bewertet, ihre Position auf den zugehörigen Folien markiert und die entsprechenden positiven Kolonien aus der gefrorenen Masterplatte ausgeschnitten. Das Membranstück wird 1 Stunde in 200 µl LB/amp/tet-Medium bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wird in verschiedenen Verdünnungen auf LB/amp/tet-Agarplatten ausgestrichen und der Rest wird konserviert.

Membranabzüge für den *Rescreen* werden gemäß den Instruktionen des Membranherstellers von Platten angefertigt, die mit etwa 200 Kolonien eine Identifizierung von einzelnen Kolonien erlauben. Hierzu werden leicht mit LB/amp/tet-Medium angefeuchtete Nylonfilter (Hybond N) auf die Platten gelegt, mit Positionsmarkierungen versehen und auf frischen LB/amp/tet-Platten über Nacht inkubiert. Die Bakterien werden gemäß den Herstellerangaben lysiert, die DNA denaturiert, neutralisiert und durch UV-Licht (1200 µJoules x 100) auf dem Nylonfilter immobilisiert. Die gewonnenen Filter werden mit den entsprechenden Sonden hybridisiert. Positive Einzelkolonien können identifiziert und zur Plasmidisolierung in 2 ml Übernachtskulturen übergeimpft werden.

3.7 Isolierung von Nukleinsäuren

3.7.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Für Abschätzungen der DNA- und RNA-Konzentrationen, wird die Signalstärke der interessanten Bande mit der 1031 bp Bande des 1 kb-Leiter-Standards (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) verglichen. Sie macht 10 % des aufgetragenen DNA-Standards aus.

Für genauere Konzentrationsbestimmungen werden wässrige Nukleinsäuren photometrisch vermessen. 1 OD 260 nm entspricht einem Gehalt von 50 µg/ml an doppelsträngiger- bzw. 40 µg/ml an einzelsträngiger DNA bzw. RNA. Das Verhältnis zwischen OD 260 nm/ OD 280 nm dient als Indikator für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Ein Wert unter 1,8 zeigt, dass die Präparation frei von Proteinen ist.

Geringe Konzentrationen von Nukleinsäuren werden fluoreszenzphotometrisch bestimmt. PicoGreen™ von Molecular Probes (Leiden, NL) ist ein sensitiver fluoreszierender Farbstoff für doppelsträngige DNA in Lösung. Die Vermessung folgt den Angaben des Farbstoffherstellers: DNA wird in einer 1:400 Verdünnung von PicoGreen in TE-Puffer und unter Lichtausschluß inkubiert. Die Probe wird bei 480 nm angeregt und die Fluoreszenzemission F wird bei 520 nm mit Hilfe des Fluoreszenzphotometers bei einer Spaltbreite von 10 nm gemessen. Eine Eichkurve wurde mit DNA des 1 kb-Leiter-Standards (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) aufgenommen und folgende Umrechnungsformel erhalten:

$$c_{\text{Küvette}} = 0,01 \times F + 0,001 \text{ [ng/ ml]}$$

3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid-DNA wird in zwei Reinheitsgraden isoliert. Für analytische Spaltungen, präparative Spaltungen für die Herstellung radioaktiv-markierter Sonden, Sequenzierungen und Plasmid Dot Blots werden Plasmide in einer modifizierten alkalischen Lyse aufgereinigt (Birboim, 1979). Die DNA wird aus der resultierenden Lösung mit einem gleichen Volumen Isopropanol gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und die mitgefällte RNA mit 0,1 mg/ml RNase 30 Minuten bei 37°C verdaut.

Dient die Plasmid-DNA dagegen in einem späteren Schritt als Matrize für RNA-Polymerasen, wird sie mit Hilfe von Plasmid-Präparationskits von Qiagen (Hilden) oder Sigma (Deisenhofen) in kleinem oder mittlerem Maßstab nach der alkalischen Lyse an eine Anionen-Austauscher-Säule unter entsprechenden Niedrigsalz- und pH-Bedingungen gebunden. RNA, Proteine und Verunreinigungen werden unter mittleren Salzstärken ausgewaschen. Plasmid-DNA wird in einem Hochsalz Puffer eluiert. Die anschließende Isopropanolfällung konzentriert und entsalzt die DNA.

3.7.3 Präparation von Gesamt-RNA und DNase-Verdau

Das TriReagent® RNA Isolierungsreagenz der Firma Biozol (Eching) basiert auf der „Einschritt-Methode“ der RNA-Isolierung durch saure Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion, die zu einer schnellen und effektiven Inhibierung der RNase-Aktivität führt (Chomczynski, 1993). Die Aufarbeitung der RNA folgt im Wesentlichen den Empfehlungen des Herstellers.

Das Gewebe wird nach der Präparation in eisgekühltem PBS in gekühltes TriReagent® überführt. Mit einem sterilen Plastikhomogenisator (bezogen über Fisher Scientific, Schwerte) oder einem Glas/Teflonhomogenisator (No.18; Kontes Glass, Vineland, NJ, USA) wird das Gewebe anschließend homogenisiert und lysiert. Die isolierte RNA wird in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

Zur Isolierung von RNA aus Gefrierschnitten werden ca. 100 Schnitte mit 500 µl TriReagent® versetzt und im Reaktionsgefäß homogenisiert. Das zähe TissueTek® wird innerhalb von 10 Minuten bei 4°C und 12000g präzipitiert. Der zusätzliche Zentrifugationsschritt entfernt ursprünglich einen hohen Anteil an Proteinen und Polysacchariden aus dem Homogenat (Chomczynski *et al.*, 1995). Der Überstand wird gemäß des Protokolls mit Chloroform ausgeschüttelt und prozessiert.

Da die RNA für die folgenden Experimente DNA-frei sein muss, wird sie mit RNase-freier RQ1 DNase (Promega, Mannheim) gespalten. 10 µl RNA-Lösung werden in 1 x Reaktionspuffer mit 10 U RQ1 DNase versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Entfernung des Enzyms mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wird die RNA mit Ethanol unter Zusatz von Glykogen konzentriert und in 3 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

Die RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) folgte den Vorschlägen des Herstellers.

3.7.4 Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA

DNA- und RNA-Lösungen werden auf 1 bis 2 %-ige Agarosegele (Eurobio, Les Illis Cedex, F) in TAE-Puffer geladen und bei 3 bis 10 V/cm aufgetrennt. DIG-markierte RNA-Sonden werden in 50 % Formamid 3 Minuten bei 100 °C denaturiert, mit 10 x DNA-Ladepuffer (30

% Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 0,1 M EDTA, pH 7,5) versetzt und aufgetragen. DNA-Proben werden unmittelbar vor dem Auftrag mit 10 x Ladepuffer versetzt. Als Längenstandards werden die 1 kb-Leiter von GibcoBRL Life Technologies (Karlsruhe), der Marker X von Roche Diagnostics (Mannheim) und der peqGOLD Leiter-Mix von Peqlab (Erlangen) verwendet. Pro Spur werden 0,5 µg Standard eingesetzt.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von 20 bis 100 bp DNA werden 2 % ige NuSieve Agarosegele hergestellt. In 100 ml 0,5 x TBE werden hierzu 1 g Standardagarose (Eurobio, Les Illis Cedex, F) und 2 g NuSieve Agarose (FMC, Rockland, ME, USA) unter Erwärmen gelöst, ohne die Lösung aufzukochen.

Zur Auftrennung von Gesamt-RNA werden 0,8 % Agaroseformaldehydgele (16 % (v/v) Formaldehyd) in Boratpuffer (0,034 M Borat, 4 mM EDTA) verwendet, die unter dem Abzug laufen. Vor dem Auftrag werden die RNA-Proben mit 2 x Auftragspuffer (50,5 % (v/v) Formamid, 6 % Formaldehyd, 50 µg/ ml Ethidiumbromid, 0,068 M Borat, 0,5 mg/ml Bromphenolblau, 0,5 mg/ ml Xylencyanol) versetzt und 5 Minuten bei 65°C denaturiert.

3.7.5 Reinigung von Nukleinsäuren

Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung und zur Entfernung von Salzen werden DNA und RNA mit 0,6 Volumen Isopropanol oder 0,3 M Natriumacetat in 2 bis 3 Volumen Ethanol gefällt. Die Ausbeute lässt sich durch die Copräzipitation von 20 µg/ ml Glykogen (Roche Diagnostics, Mannheim) verbessern. Nach der Pelletierung für 30 Minuten bei 12000 g (für RNA bei 4 °C) wird das Pellet zweimal mit 70 bis 80 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und im entsprechenden Puffer aufgenommen. Die Fällung von RNA-Sonden ist unter 2.9.1 beschrieben.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1; PCI)-Extraktion werden Proteine aus wässrigen DNA- und RNA-haltigen Lösungen entfernt (Sambrook *et al.*, 1989). Das Volumen der wässrigen Phase wird hierzu mit TE-Puffer auf 500 µl eingestellt.

Reinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten über Säulchen

Isolierte Plasmid-DNA und PCR-Produkte werden mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kits“ (Roche Diagnostics, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Hierbei wird DNA in Gegenwart des chaotropen Salzes Guanidiniumthiocyanat (Hoch-Salz-Bedingungen) und einem pH unterhalb von 7,5 von einer modifizierten Silizium-Membran adsorbiert. Unerwünschte Bestandteile wie Primer, Salze, Mineralöl, Proteine und Nukleotide können unter Niedrig-Salz-Bedingungen von der Säule gewaschen und die DNA mit Tris-Puffer (pH 8,5) oder Wasser mit entsprechendem pH eluiert werden.

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA wird im präparativen Maßstab elektrophoretisch aufgetrennt, die zu isolierenden DNA-Banden unter UV-Licht identifiziert, aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des „QIAEX II Gelextraction Kits“ (Qiagen, Hilden) isoliert.

Ein chaotropes Salz unterbricht die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zuckern im Agarosepolymer und die enthaltene DNA wird unter Hochsalzbedingungen und einem pH-Wert

kleiner als 7,5 an positiv geladene Glaspartikel der QIAEXII-Suspension gebunden. Verunreinigungen verbleiben im Überstand und werden in einem Hoch-Salz- und zwei Ethanol-Waschschritten entfernt. Die DNA wird mit Tris-HCl (pH 8,5) oder Wasser eluiert.

3.8 *In vitro* Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.8.1 Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen

200 bis 500 ng Plasmid-DNA werden in analytischen Spaltungen gemäß den Vorgaben des Herstellers der Restriktionsendonukleasen auf das Vorhandensein entsprechender *Inserts* überprüft. Präparative Spaltungen von 3 bis 5 µg Plasmid-DNA oder PCR-Produkt erfolgen in 80 µl bzw. 200 µl Reaktionsansätzen, um *Inserts*, linearisierte Plasmide oder DNA-Fragmente ohne die multiple Klonierungssequenz für die Herstellung von Sonden bereit zu stellen.

3.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte werden in den pGEM-T-Vektor der Firma Promega (Mannheim) mit einem modifizierten Protokoll ligiert. Der von vielen *Taq*-Polymerasen an die amplifizierte PCR-Produkte angehängte 3'-Adenosinrest, erlaubt die Verbindung der PCR-Fragmente mit dem pGEM-T-Vektor, der einen überhängenden terminalen Thymidinrest besitzt.

50 ng pGEM-T-Vektor und 1 bis 2 µl PCR-Produkt (ca. 150 ng; frisch synthetisiert; wiederholtes Einfrieren degradiert die Adenosinenden) werden in 1 x Ligationspuffer mit 1 µl T4 Ligase (3 U) versetzt, 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 15 °C über Nacht ligiert. Zur Hitzeinaktivierung der Ligase fügt man 10 µl Wasser hinzu und erhitzt für 10 Minuten auf 65°C. Zur Entsalzung wird der Reaktionsansatz mit Ethanol und Glykogen gefällt.

3.8.3 Amplifikation von cDNAs mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR)

Präparation von rekombinanter *Thermo aquaticus* (*Taq*) DNA-Polymerase aus *E.coli*

Für die Standard-PCR Ansätze wird rekombinante *Taq* DNA-Polymerase aus einem hausinternen *E. coli* Stamm isoliert, der das Plasmid pRecTaq trägt und freundlicherweise von C. Harrenberg (Universität zu Köln, Institut für Genetik, Prof. Rajewski) zur Verfügung gestellt wurde. Die Proteinisolierung folgt dem Protokoll von Engelke *et al.* (1990).

Nach einer dreistündigen Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG werden die Bakterien pelletiert und durch Hitze denaturiert. Aus den geklärten Zell-Lysaten wird das rekombinante Protein durch die Zugabe von Polyethylenimin gefällt und über eine BioRex70 Ionenaustauscher Säule (Bio-Rad, München) gereinigt. Nach der Bindung an Heparin-Agarose (Sigma, Deisenhofen) wird die *Taq* DNA-Polymerase unter Hochsalzbedingungen eluiert, gegen 50 % Glycerin Lagerungspuffer (100 mM KCl, 20 mM Tris-Base, pH, 8,55, 0,1 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 0,5 % Tween-20, 1 mM DTT, 50 % Glycerin) dialysiert, entsprechend ihrer Aktivität in diesem Puffer zu 5 U/ µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)

Für verschiedene experimentelle Fragestellungen wird DNA in der PCR exponentiell amplifiziert. Ein 20 µl Standard PCR-Reaktionsansatz setzt sich neben der Matrize aus 1 x PCR-Reaktionspuffer, 1,25 mM MgCl₂, 0,3 µM Primer 1, 0,3 µM Primer 2, 0,2 mM dNTPs mit 1 U *Taq* Polymerase (s. o.) zusammen. Das verwendete PCR-Programm wird in seiner *Annealing* Temperatur (** = 50 - 68°C) und in der Zyklusanzahl (* = 25 bis 35) den eingesetzten Primern und der Matrize angepasst.

Programm:	1. Denaturierung	94°C 30 sec
	2. 30* Zyklen	95°C 15 sec, 68°C** 30 sec, 72°C 2 min
	3. letzte Synthese	72°C 7 min
	4. Kühlen	4°C halten

Um rekombinante Bakterien nach einer Transformation von leeren oder kleine Fragmente tragenden Bakterien zu unterscheiden und um *Inserts* für das cDNA *Screening* zu amplifizieren, werden Bakterien direkt als Matrize verwendet.

Besteht das cDNA-Fragment eines differentiellen Kandidaten aus dem 5'-untranslatierten Bereichen der mRNA und ist die Identität des Gens nicht in einem Datenbankvergleich zu ermitteln, kann weitere Sequenzinformation durch die Amplifikation des 5'-Endes aus der „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek gewonnen werden (5' Rapid Amplification of cDNA Ends/RACE). In der „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek sind die cDNAs in den pSPORT-Vektor (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) zwischen die *XmaII/SalIII* Schnittstellen mit dem PolydT-Ende auf der *XmaII*-Seite ligiert worden. Der kodierende und der 5'-untranslatierte Bereich kann mit Hilfe eines Sequenz-spezifischen Primers und des pSPORT T7-RACE Primers amplifiziert werden (Abb. 3-5). Das resultierende Fragment wird in den T-Vektor ligiert (vgl. 3.8.2), das Plasmid entsprechende Plasmid vermehrt (vgl. 3.7.2) und sequenziert (vgl. 3.9.5).

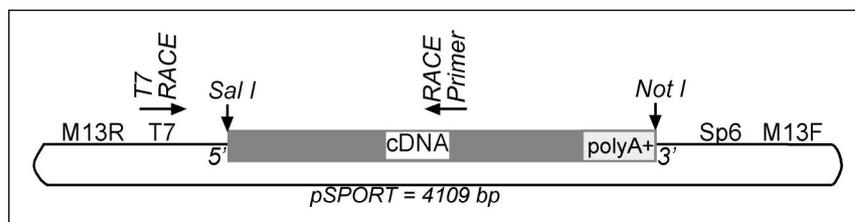


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Primer- und *Insert*-Orientierungen in der 5'-RACE Reaktion. Ausgehend von einem Sequenz-spezifischen, hochschmelzenden Primer („RACE“) und einem hochschmelzenden Vektorprimer („T7-RACE“), wird der 5'-gelegende Abschnitt des *Inserts* amplifiziert.

Um RNA-Sonden ohne Sequenzen der vektoruellen multiplen Klonierungsregion herzustellen, werden *Insert*-spezifische Primer am 5'-Ende mit der T3 RNA-Polymerase Promotorsequenz verlängert. Gemeinsam mit vektorspezifischen Primern ermöglichen sie die Amplifikation eines T3 Polymerase-Promotor/*Insert*abschnitts und eines Adapter/Vektorabschnitts, der mit *RsaI* bzw. *AfaI* vom erstgenannten abgespalten wird. In einem präparativen PCR-Ansatz (50 µl) dienen die entsprechenden Plasmide als Matrize.

3.9 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

3.9.1 *In vitro* Transkription und nicht-radioaktive Markierung von RNA

Für die Detektion von mRNA in Gewebeschnitten haben sich *in vitro* transkribierte RNA-Sonden als am geeignetsten erwiesen (Cox *et al.*, 1984). *In vitro* transkribierte RNA-Sonden können mehrere Hundert Nukleotide lang sein. Zur *antisense* Sonde kann eine geeignete Kontroll-Sonde, die *sense* Sonde, hergestellt werden, die etwa die gleiche Länge und den gleichem GC-Gehalt wie die *antisense* Sonde besitzt.

Digoxigenin-markierte UTP (DIG-UTP) RNA-Sonden werden mit dem „DIG RNA Labeling Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer *in vitro* Transkription gemäß den Vorgaben des Herstellers synthetisiert. Als Matrize werden stromabwärts des *Inserts* linearisierte Plasmide benutzt, die mit einer 3'-Überhänge oder glatte Enden produzierenden Restriktionsendonuklease geschnitten wurden. Alternativ können entsprechende PCR-Produkte (vgl. 3.8.3) verwendet werden, die am 5'-Ende der *sense* oder *antisense* Sequenz einen Promotor für die T3 RNA-Polymerase aufweisen.

Nach einer PCI-Extraktion werden zur Transkription etwa 1 µg (je 1 kb *Insert*) linearisierte DNA in 1 x Transkriptionspuffer, 1 x Markierungsreagenz, 20 U RNasin (RNase Inhibitor, Amersham Pharmacia Biotech) mit 4 U Sp6, T3 oder T7 RNA Polymerase 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit 2 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Die Zugabe von LiCl auf 0,2 M und Ethanol auf 75 % (v/v) bei -20°C für 30 Minuten fällt die RNA. Nach der Pelletierung wird die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in 20 bis 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Zur Quantifizierung und Kontrolle der Integrität wird 1 µl der RNA-Lösung elektrophoretisch aufgetrennt.

3.9.2 Markierung von DNA durch Auffüllreaktionen

Nicht-radioaktive Markierung von DNA

Nicht-radioaktiv markierte DNA-Sonden werden zur „cDNA Southern“ Hybridisierung verwendet. Digoxigenin-markierte dUTP (DIG-dUTP) DNA-Sonden werden mit Hilfe des „DIG DNA Labeling Kits“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) hergestellt. Ein statistisches Gemisch aus hexameren Oligonukleotiden hybridisiert an einzelsträngige DNA und ermöglicht ein Auffüllen der Lücken durch eine Klenow-Polymerase. In der verwendeten Mutante ist die Exonuklease-Aktivität des C-terminalen Fragments der Polymerase 2 aus *E.coli* nicht detektierbar.

Während der nach Herstellerangaben durchgeführten Auffüllreaktion (etwa 1 µg Hitze denaturierte DNA-Matrize, 1 x Hexanukleotid Mix, 1 x dNTP-Labeling Mix, 1 U Klenow Enzym in 20 µl Reaktionsansatz, 1 bis 20 h bei 37 °C) wird neben den natürlichen Deoxynukleotiden auch alkalilabiles DIG-11-dUTP in den Strang eingebaut, das immunohistochemisch nachgewiesen werden kann. Der Einbau von DIG wird mit „DIG Quantification Teststrips“ (Roche Diagnostics, Mannheim) quantifiziert, indem eine Verdünnungsreihe der Probe und eine Standardprobe der immunologischen DIG-Detektion vergleichend unterzogen werden. Vor der Hybridisierung werden die Sonden durch Hitze denaturiert.

Radioaktive Markierung von DNA

Hybridisierungen der cDNA-Bibliothek Replikafilter, der Dot Blots aus Kolonien, aus Plasmiden und aus PCR-Produkten sowie die „cDNA Southern“ Hybridisierungen werden mit [α - 32 P]dCTP-markierten (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) Sonden durchgeführt.

Das Syntheseprotokoll des „Prime-It™ II Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) wird befolgt. In die Auffüllreaktion werden neben 50 bis 300 ng DNA-Fragment, 1 x dCTP Reaktionspuffer, 1 x Hexanukleotide und 1 U Klenow Enzym 25 bis 50 μ Ci [α - 32 P]dCTP eingesetzt. Die nicht-eingebauten [α - 32 P]dCTP-Radionukleotide werden von der markierten DNA über „NICK™ Column Sephadex® G-50“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) abgetrennt. In der Gelfiltration verweilen die kleineren, nicht-eingebauten [α - 32 P]dCTP Radionukleotide länger auf der Säule, während die markierte DNA eluiert wird. Die äquilibrierten Säulen werden mit dem Klenow-Reaktionsansatz beladen, mit 400 μ l TE-Puffer gespült und die markierte DNA in weiteren 400 μ l TE-Puffer eluiert. Hiervon wird 1 μ l in einem Szintillationsmeßgerät analysiert. Eine Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C führt zu Sonden mit einer Aktivität von über 4×10^6 cpm, so dass in 10 ml Church-Puffer eine Aktivität von etwa $0,4 \times 10^6$ cpm/ ml bzw. 0,2 μ Ci/ ml resultiert.

3.9.3 Transfer von Plasmiden, cDNA und RNA auf Membranen

Herstellung von Dot Blots aus Plasmiden in kleinem Maßstab

Plasmid Dot Blots im kleinen Maßstab werden verwendet, um nach dem *Rescreen* der cDNA-Bibliotheken positive Kolonien für die Sequenzierung auszuwählen. Hierzu wird 1,5 μ l hitzedenaturierte Plasmid DNA-Lösung auf die Nylonmembran pipettiert. Nach der UV-Licht Immobilisierung (Church und Gilbert, 1984) wird die trockene Membran bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

Transfer von cDNA auf Membranen „cDNA Southern“ Transfer

Eine Alternative für Hybridisierungen gegen RNA (Northern Hybridisierung) aus Geweben, die in kleiner Menge vorliegen, ist die Hybridisierung gegen amplifizierte cDNA („cDNA Southern“) aus diesem Gewebe (Endege *et al.*, 1999). Für radioaktive „cDNA Southern“ Hybridisierungen wird cDNA auf die Hybond N Membran von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und für nicht-radioaktive Hybridisierungen auf eine positiv-geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) übertragen.

DNA-Elektrophoresegele wird für je zweimal 15 Minuten in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH) und in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris-Cl, pH 7,5) geschwenkt, um die doppelsträngige in einzelsträngige DNA zu überführen. Nach dem Spülen des Gels in 20 x SSC wird die DNA mit diesem Puffer in einem nach unten gerichteten Kapillartransfer (Lichtenstein, 1990) über Nacht auf eine Nylonmembran entsprechender Größe übertragen. Die DNA wird durch UV-Licht (1200 μ Joules x 100) auf dem Nylonfilter immobilisiert (Church und Gilbert, 1984). Anschließend wird dieser kurz mit Wasser gespült, an der Luft getrocknet und bis zur späteren Verwendung bei Raumtemperatur verwahrt.

Die immobilisierte Nukleinsäure kann auf Nylonfiltern mit einer 0,04 % Methylenblau-Lösung (in 0,5 M Natriumacetat, pH 5,2) angefärbt werden (Sambrock *et al.*, 1989).

Transfer von RNA auf Membranen (Northern Transfer)

Elektrophoretisch aufgetrennte RNA wird auf die „Hybond N“ Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geblottet.

Nach der Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen, wird das Formaldehyd-haltige Agarosegel (vgl. 3.7.4) 30 Minuten in Wasser geschwenkt, um das enthaltene Formaldehyd auszuwaschen. Der nach unten gerichtete Kapillartransfer und die weiteren Schritte entsprechen dem „cDNA Southern“ (s. o.).

3.9.4 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Vorbereitung der Sonden

Die radioaktiven Sonden werden in 0,025 N NaOH 10 Minuten bei 56 °C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und zur Prähybridisierungslösung hinzugefügt, so dass eine Aktivität von etwa 10^6 cpm/ ml erreicht wird. Die nicht-radioaktiven Sonden werden 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, abgeschreckt und zu einer finalen Konzentration von etwa 10 ng/ml eingesetzt.

Hybridisierung von Kolonie und Plasmid Dot Blots sowie RNA-Blots mit Church-Puffer

Zur Prähybridisierung werden die in 2 x SSC gespülten Filter in einer angepassten Menge Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) eine Stunde bei 65°C prähybridisiert. Die radioaktiv-markierte und gereinigte Sonde wird denaturiert (s. u.) und der frischen Hybridisierungslösung zugefügt. Nach der Hybridisierung über Nacht bei 65°C wird jeweils zweimal 30 Minuten bei 65°C mit Waschlösungen aufsteigender Stringenz (2 x SSC, 0,5 x SSC bzw. 0,2 x SSC alle mit 0,2 % SDS) gewaschen.

Hybridisierung von cDNA- und Plasmid Filtern mit ULTRAhyb™

Mit ULTRAhyb™ binden in einer über Nacht Hybridisierung 50 bis 100 % der Zielmoleküle ihre Sonde, während dies bei Standardhybridisierungen nur 1 -5 % sind (Vernier *et al.*, 1996). Dadurch wird ein 20 - bis 50 - fach stärkeres Hybridisierungssignal erreicht, das die Detektion von geringen Mengen DNA ermöglicht (Ambion, 1999).

Vorbereitete Filter werden in 2 x SSC angefeuchtet und mit der DNA-tragenden Seite nach innen luftblasenfrei in Hybridisierungsröhren (Techne, Cambridge, UK) gelegt. Im optimalen Fall überlappen die Membrane nicht. Sie werden mit einer angepassten Menge (3 - 10 ml) ULTRAhyb™ für 30 Minuten bei 42 °C prähybridisiert. Hybridisiert wird über Nacht bei 42°C. Die Filter werden gemäß den Angaben des Herstellers bei 42°C gewaschen (zweimal 5 Minuten in 2 x SSC, 0,2 % SDS; zweimal 15 Minuten 0,2 x SSC, 0,2 % SDS).

Detektion des radioaktiven Signals und Entfernung des Signals

Die Filter aus der radioaktiven Hybridisierung werden anschließend feucht in Plastikbeutel gelegt und luftblasenfrei eingeschweißt. Je nach Intensität der Signal erfolgt die Exposition eines Röntgenfilms für 2 Stunden bis zu 5 Tagen bei -80°C. Zur Entfernung der Sonden werden die Filter dreimal mit 100°C heißer 0,2 % SDS-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Detektion von DIG-Markierungen und Entfernung des Signals

DIG-markierte Sonden werden mit Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat und CDP-Star™ nachgewiesen („DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids“, Roche Diagnostics, Mannheim). CDP-Star ist ein Chlor-substituiertes 1,2-Dioxetan Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase. Die enzymatische Dephosphorylierung von CDP-Star führt zur Bildung eines metastabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht bei 466 nm emittiert.

Die Membran wird 1 - 5 Minuten in Maleinsäure-Puffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt) mit 0,3 % (v/v) Tween-20 inkubiert, 30 Minuten in 100 ml Puffer 2 (1 % Blockierungsreagenz in Maleinsäure-Puffer) blockiert, 30 Minuten in der Antikörper-Verdünnung (Anti-DIG-AP Konjugat 1:20000 in Puffer 2) inkubiert, zweimal 15 Minuten in Maleinsäure-Puffer mit 0,3 % Tween-20 gewaschen, 2 - 5 Minuten in Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) äquilibriert und in einem Hybridisierungsbeutel 1 bis 2 Minuten mit CDP-Star (1:100 bis 1:250 in Detektionspuffer) inkubiert. Die Membran wird dann in eine Plastikfolie eingeschweißt und einige Sekunden bis einige Minuten auf einem Röntgenfilm exponiert.

Da das Digoxigenin über eine Alkali-labile Esterbindung an den Nukleotidteil gebunden ist, kann die DIG-Markierung in zweimal 15 Minuten bei 37°C in Waschlösung II (0,2 M NaOH, 0,1 % SDS) entfernt werden.

3.9.5 PCR Cycle Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von in Plasmid-DNA ligierten *Inserts* erfolgt unter Verwendung des „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). In 10 µl Sequenzierungsreaktion werden 500 bis 1000 ng Plasmid-DNA und 0,5 pM Sequenzierungsprimer mit 1 x BigDye Sequencing Mix versetzt.

Programm:

1. Denaturierung	94°C 30 sec
2. 25 Zyklen	95°C 15 sec, 50°C 30 sec, 72°C 2 min
3. letzte Synthese	72°C 7 min
4. Kühlen	4°C halten

Die Produkte der zyklisierten Strang-Abbruch-Sequenzierungsreaktion werden nach der Ethanol-fällung getrocknet und, bis zur elektrophoretischen Auftrennung auf einem Sequenzgel durch Rita Lange, unter Lichtausschluß bei -20°C gelagert. Die Elektrophorese wird am ABI PRISM™ 377 Sequencer im Institut für Genetik, Universität zu Köln, durchgeführt.

3.10 cDNA Synthese und Amplifikation mit Hilfe des „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits“ (Clontech)

3.10.1 Übersicht

Für die cDNA-Synthese und Amplifikation wird das „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ von Clontech (Heidelberg) benutzt. Es ermöglicht die Synthese und Amplifikation von cDNA in vollständiger Länge aus geringen Mengen Gesamt-RNA.

Ein modifizierter Oligo(dT)-Primer (cDNA Synthesis (CDS) Primer) bindet an das PolyA-Ende der mRNA und bietet damit einen Anknüpfungspunkt für die RNA-abhängige DNA-

Polymerase (Abb. 3-6A). Sobald die reverse Transkriptase das 5'-Ende der RNA erreicht hat, hängt ihre terminale Transferase Aktivität einige additive Nukleotide (bevorzugt Deoxycytidin) an das 3'-Ende der cDNA. Daran bindet das SMART™ II Oligonukleotid und verlängert auf diese Weise die Matrize auf der RNA-Seite. Die reverse Transkriptase komplementiert daraufhin die cDNA an dieser Stelle, indem sie die Matrize wechselt. Die Synthese von cDNAs vollständiger Länge ist begünstigt, da die Deoxycytidin-Überhänge vorwiegend endständig angehängt werden. Die RNA-sequenzunabhängige Einbindung des SMART™ II Oligonukleotids ermöglicht eine gleichmäßige cDNA-Amplifikation aller mRNA Spezies. Der verwendete PCR Primer bindet an das SMART II Oligonukleotid und an den CDS Primer (Abb. 3-6B).

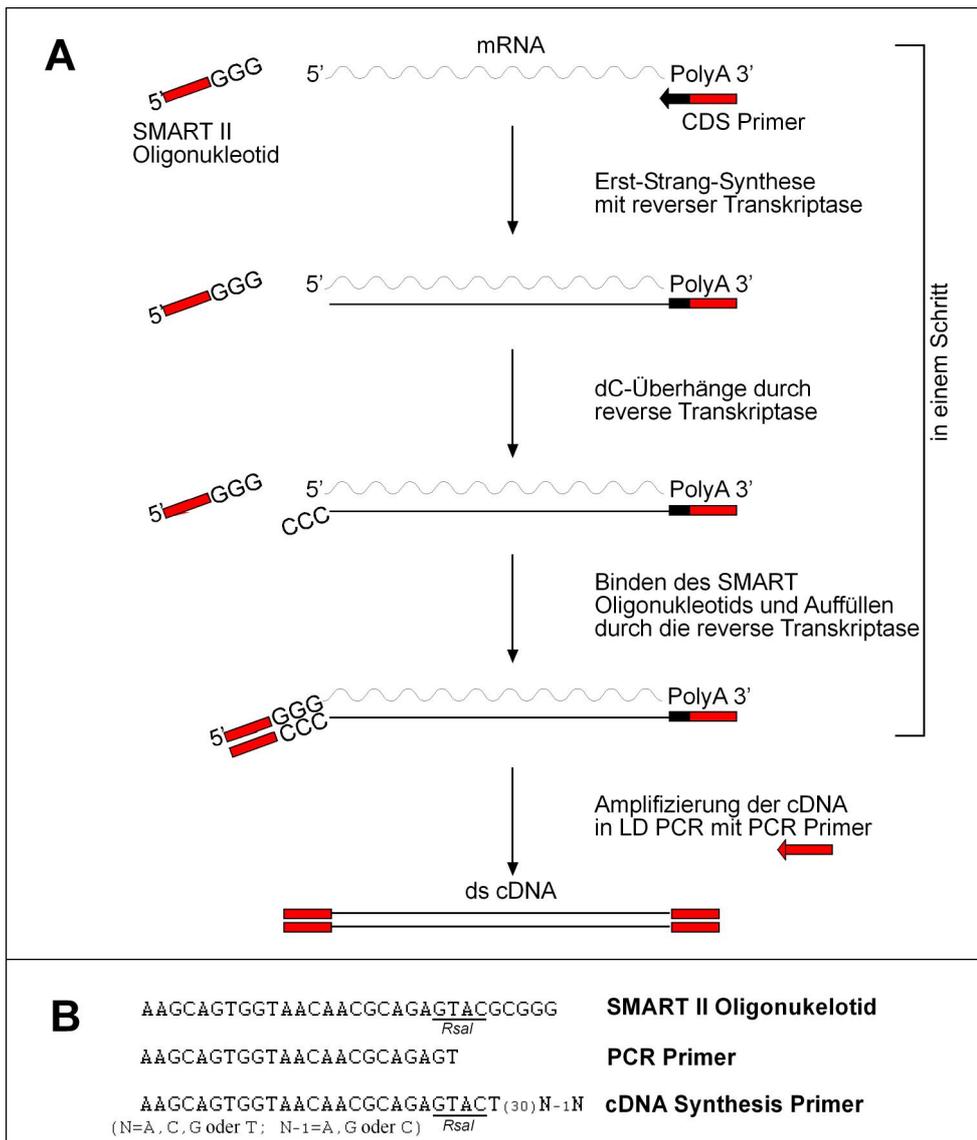


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der cDNA Synthese mit Hilfe des „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits“ (Clontech, Heidelberg). A) Fließdiagramm zum experimentellen Vorgehen. B) Sequenzen des CDS Primers, des PCR Primers und des SMART Oligonukleotids (alle drei beinhalten einen gemeinsamen Sequenzabschnitt). Modifiziert nach „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“, *User Manual* (1997).

Die Reaktionen werden nach den Vorschlägen des Herstellers zur cDNA-Synthese für den Einsatz in die subtraktive Hybridisierung („PCR-Select™ Subtraction Kit“, Clontech) durchgeführt. In dieser Protokollvariante ist die Amplifizierung von nicht-spezifischem Hintergrund dadurch reduziert, dass die cDNA/ RNA-Matrize vor der Amplifikation stark verdünnt wird. Soweit nichts anderes vermerkt ist, stammen die verwendeten Reagenzien, aus dem Kit. Die PCR-Reaktionen laufen im „Gene Amp PCR System 2400“ oder im „Gene Amp PCR System 9600“ von Perkin-Elmer (Weiterstadt).

3.10.2 cDNA Erst-Strang Synthese

Zur Erststrang-Synthese werden 3 µl RNA-Lösung (50 ng bis 1 µg) mit 2 µM CDS Primer und dem 2 µM SMART™ II Oligonukleotid für 2 Minuten auf 70°C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt, um den CDS Primer an die RNA zu binden. Die RNA/ DNA Hybride werden über Nacht bei 42°C in 1 µM CDS Primer, 1 µM SMART™ II Oligonukleotid, 1 x Erststrangpuffer, 2 mM DTT, 1 mM dNTPs und 200 U Superscript II (MMLV RNase H⁻ punktmutierte reverse Transkriptase; GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) gebildet. Das Erst-Strang Reaktionsprodukt wird in 40 µl TE-Puffer aufgenommen und nach der Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase (7 Minuten, 72°C) bei -20°C gelagert.

3.10.3 cDNA Amplifikation mit *Long Distance* PCR

Zur Vermehrung der zur Verfügung stehenden cDNA wird diese mit dem „Advantage cDNA PCR Kit“ von Clontech (Heidelberg) amplifiziert. Das Kit enthält den Advantage KlenTaq Polymerase Mix, der sich aus der KlenTaq-1 DNA-Polymerase, einer geringeren Menge DNA-Polymerase mit 3'→5' Kontroll-Leseaktivität und einem TaqStart™ Antikörper zusammensetzt. Dieser monoklonale Antikörper bindet an die *Taq* DNA-Polymerase, so lange bis er durch Hitze denaturiert wird. Nach dem Zerfall des Antikörpers beginnt die *Taq* DNA-Polymerase wie in einem *Hot Start* nach dem Denaturierungsschritt mit der DNA-Synthese (Kellogg *et al.*, 1994). Die Kombination der Polymerasen erlaubt die effiziente Amplifikation von kompletten cDNAs mit einer geringeren Fehlerrate als konventionelle PCRs und die Amplifikation von signifikant längeren Fragmenten in einer *Long Distance* (LD) PCR (Barnes, 1994; Cheng *et al.*, 1994).

Nach einer exponentiellen Amplifikationsphase steigt die cDNA-Menge nicht mehr an und die Bildung von unspezifischen, höher molekularen Produkten ist begünstigt. Da möglichst eine große Menge cDNA amplifiziert werden soll, aber die PCR noch in der exponentiellen Amplifikationsphase sein muss, ist es notwendig, die PCR-Parameter mit Hilfe eines „zusätzlichen“ Reaktionsansatzes zu optimieren. Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen wird cDNA aus humaner Plazenta in einem Parallelansatz amplifiziert.

Abhängig von der eingesetzten RNA-Menge werden zwischen 1 und 10 µl verdünnter RNA/ cDNA-Hybridlösung als Matrize in die LD PCR eingesetzt (entspricht 2 bis 5 ng RNA/ cDNA Hybrid). Ein 100 µl Reaktionsansatz setzt sich aus 1 x Advantage KlenTaq PCR-Puffer 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM PCR Primer, 1 x Advantage KlenTaq Polymerase Mix und der Matrize zusammen. In einer Standard LD PCR werden 1 bis 3 µg cDNA synthetisiert. Für die subtraktive Hybridisierung sind mindestens 2 µg cDNA vorgesehen, so dass zwei Ansätze für jede cDNA-Population amplifiziert werden.

Programm:	1. Denaturierung	95°C 1 min
	2. 25 Zyklen	95°C 15 sec, 65°C 30 sec, 68°C 6 min
	3. Kühlen	4°C halten

Nach 15 Zyklen werden die Reaktionsansätze, die für subtraktive Hybridisierung bestimmt sind, bei 4°C gehalten. Aus der Kontrolle und dem „zusätzlichen“ Ansatz werden jeweils 15 µl entnommen und weitere 3 PCR-Zyklen gefahren. Von der 18 Zyklen-PCR werden wiederum 15 µl entnommen. Nach drei weiteren Zyklen wiederholt sich der Vorgang bis 33 PCR-Zyklen durchlaufen worden sind. Von den entnommenen Proben werden jeweils 5 µl auf einem 1,2 %-igen Agarosegel aufgetrennt und die optimale Zyklusanzahl für die verbliebenen Reaktionsansätze bestimmt. Einen Zyklus vor dem Erreichen des Amplifikationsplateaus ist die Ausbeute optimal und die cDNA intakt („SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ *User Manual*, 1997). Die entnommenen Reaktionsansätze durchlaufen anschließend die restlichen PCR-Zyklen bis die optimale Zykluszahl erreicht ist.

3.10.4 Herstellung von cDNA Blots für die „cDNA Southern“ Hybridisierung

Nach dem differentiellen *Screening* (vgl. 3.12.4) wird in der „cDNA Southern“ Hybridisierung überprüft, ob die als Kandidaten_{Plasmid} oder Kandidaten_{PCR} eingestuftes cDNA-Fragmente differentiell exprimiert werden. In der „cDNA Southern“ Hybridisierung dient die Hybridisierung einer Sonde mit einer cDNA-Population als Maß für die Expression der Sondensequenz in dem Gewebe, aus dem die RNA für die cDNA-Herstellung stammt. In der vorliegenden Studie wird anstelle der „Northern Hybridisierung“ auf dieses Verfahren zurückgegriffen, weil nur eine begrenzte Menge RNA zur Verfügung steht. Unter geeigneten Bedingungen entspricht die mengenmäßige Verteilung von cDNA-Sequenzen im Amplifikat der ursprünglichen Verteilung in der RNA-Präparation (Endege *et al.*, 1999).

Für die Herstellung von „cDNA Southern“ Blots wird die cDNA/ RNA-Matrize 1:50 bis 1:100 verdünnt und als Matrize in die LD PCR eingesetzt. Für jede Verdünnung wird die optimale Zyklusanzahl neu bestimmt. Unterhalb der optimalen Zyklusanzahl ist die Hybridisierung relativ schwach, während bei höheren Zykluszahlen eine Verschiebung zu höheren Molekulargewichten einsetzt. Die 1,2 %-igen Agarosegele werden (vgl. 3.9.3) geblottet und in ULTRAhyb™ (Ambion) hybridisiert (vgl. 3.9.4). Der gleichmäßige cDNA-Auftrag wird in einer Hybridisierung mit radioaktiv-markiertem β -actin-Fragment überprüft (amplifiziert aus cDNA mit den beiden Primern b-act1 und b-act2). Für β -actin wird eine gleichmäßige, nicht differentielle Expression angenommen.

Die Wahl der optimalen Amplifikationsbedingungen kann ebenfalls in einer Hybridisierung überprüft werden (Abb. 3-7). Nur während der optimalen Zykluszahl hybridisiert das β -actin-Fragment in einer distinkten Bande gegen die cDNA-Population. In *overcycled* cDNAs (hier ab Zyklus 21) werden vermehrt kürzere und längere (hier ab Zyklus 24) unspezifische Produkte gebildet, die zu einem verwischten Signal führen.

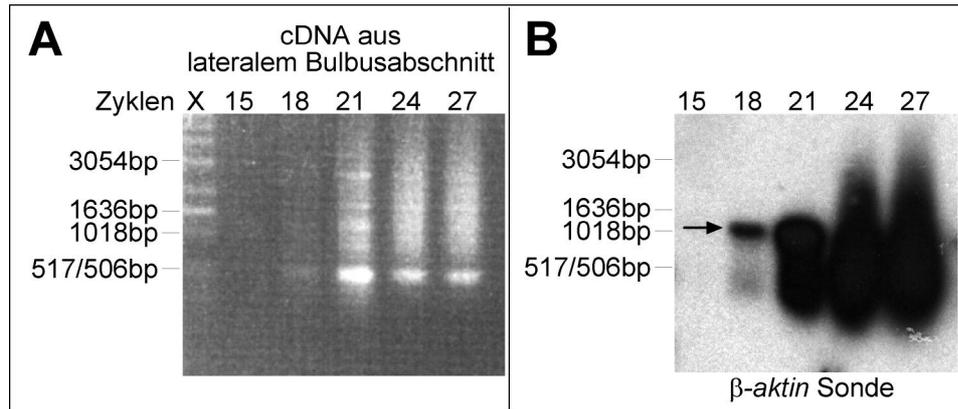


Abbildung 3-7: Optimierung der PCR-Parameter für die Amplifikation von cDNA aus dem lateralen Bulbusabschnitt. A) Ausgehend von 1 μ l 1:100 verdünnter Erststrangsynthese werden jeweils 10 μ l PCR-Produkt auf das 1,2 %-ige Agarosegel aufgetragen. B) „cDNA Southern“ Hybridisierung mit radioaktiv-markierter β -actin-Sonde.

3.11 Herstellen von subtrahierten cDNA-Bibliotheken mit Hilfe des „CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ (Clontech)

3.11.1 Übersicht

Für die Herstellung von subtrahierten Bibliotheken wird das „CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ (Clontech, Heidelberg) verwendet. Die subtraktive Hybridisierung ermöglicht den Vergleich von zwei ds cDNA-Populationen und die Isolierung von Genen, die in der einen Population stärker als in der anderen vertreten sind (vgl. 2.5.3; Diatchenko *et al.*, 1996).

Die cDNA, welche die differentiellen Transkripte enthält, wird „Tester“ und die Referenz cDNA „Driver“ genannt. Beide werden unter gleichen Präparationsbedingungen gewonnen und mit dem Vierbasenspalter *RsaI* geschnitten. Die kürzeren glatt-gespaltenen cDNA-Fragmente ermöglichen die Ligation von Adaptoren und sind für die subtraktive Hybridisierung geeignet. An die experimentelle „Tester“ cDNA werden in zwei getrennten Ansätzen die Adaptoren 1 und 2R ligiert (*Tester1_T-1* und *Tester1_T-2R*). Die Enden der Adaptoren haben keine Phosphatgruppen, so dass sie nur an die 5'-Enden der cDNA-Fragmente ligiert werden können.

In der ersten Hybridisierung werden *Tester1_T-1* und *Tester1_T-2R* jeweils mit einem „Driver“ Überschuss durch Hitze denaturiert und 8 Stunden zum *Annealen* bei 68°C inkubiert (vgl. 2.5.3; Abb. 2-7). Dabei bilden sich verschiedene Hybrid-Typen in Abhängigkeit von der Häufigkeit und der Verteilung der cDNA-Fragmente. Differentielle und gering konzentrierte Sequenzen treffen seltener auf ihr Gegenstück und reichern sich normiert unter den verbliebenen einzelsträngigen cDNA-Fragmenten an (Gurskaya *et al.*, 1996).

In der unmittelbar anschließenden zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung miteinander vermischt (= *Tester1_T*; vgl. 2.5.3). Die Bildung von Hybriden mit zwei unterschiedlichen Adaptoren ist nun möglich und repräsentiert vor allem diffe-

rentiell exprimierte Sequenzen. Die gleichzeitige Zugabe von frisch denaturiertem „Driver“ forciert die weitere Anreicherung von differentiell exprimierten Sequenzen.

Während einer Inkubation mit DNA-Polymerase werden die 3'-Enden der cDNA-Fragmente aufgefüllt, so dass cDNA-Fragmente entstehen, die zwei verschiedene Adaptoren tragen.

In der ersten PCR-Amplifikation (mit PCR Primer 1; Abb. 3-8) werden aufgrund des *Suppressions*-Effektes nur die Typ *e* cDNA-Fragmente (vgl. 2.5.3; Abb. 2-7), mit den differentiell-exprimierten Sequenzen angereicht sind, exponentiell amplifiziert (Siebert *et al.*, 1995).

In einer zweiten PCR mit den beiden Adapter-spezifischen Primern Nested Primer 1 und Nested Primer 2R (Abb. 3-8) werden cDNA-Fragmente vom Typ *e* weiter angereicht und Hintergrund wird reduziert (vgl. 2.5.3; Abb. 2-7).

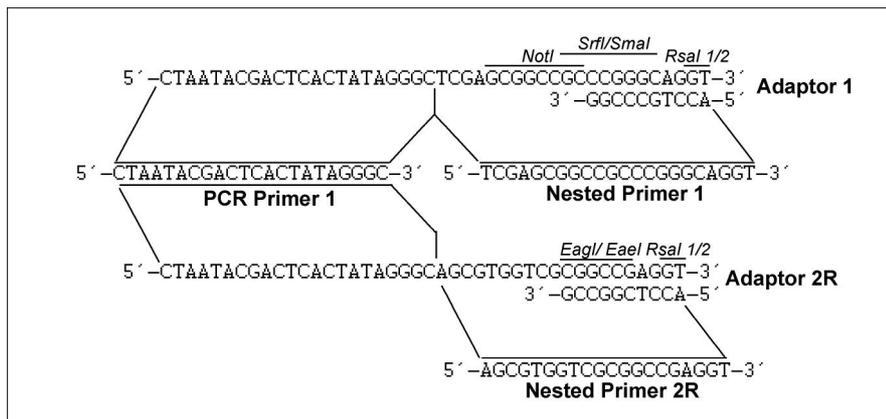


Abbildung 3-8: Sequenzen der Adaptere und der PCR Primer in der SSH. Die Ligation der Adaptere an *RsaI* geschnittene cDNA stellt die *RsaI* Schnittstellen wieder her. Modifiziert nach Diatchenko *et al.* (1999).

Neben der subtrahierten *TesterI_T* cDNA wird die unsubtrahierte *TesterI_{T-C}* Kontrolle amplifiziert, um die Effizienz der Subtraktion messen zu können. Zur Überprüfung der Reaktionsbedingungen werden der *Muskel/φX174_T* „Tester“ mit seinem Kontrollansatz und eine erfolgreich subtrahierte Kontrolle amplifiziert.

Experimentell wird das Protokoll zum „CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ (Clontech, Heidelberg) eingehalten. Die verwendeten Reagenzien werden soweit nicht anderes vermerkt ist vom Hersteller bereitgestellt. Für die PCR-Amplifikationen werden die Gene Amp PCR System 2400 und Gene Amp PCR System 9600 Thermalzykler von Perkin Elmer (Weiterstadt) benutzt.

3.11.2 Herstellung der Adapter-ligierten „Tester“ cDNAs

Reinigung der PCR-Produkte über PCI-Extraktion und Säulenchromatographie

Zur Abtrennung von Proteinen werden die beiden unter 2.10.3 hergestellten cDNA-Amplifikate vereinigt und mit PCI extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 700 µl n-Butanol ausgeschüttelt und so auf 40 bis 70 µl konzentriert. Das Konzentrat wird über ein mit TNE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) äquilibriertes CHROMA SPIN™-1000 Säulchen von Nukleotiden und Primern getrennt und in 320 µl erste und 75 µl

zweite Fraktion eluiert. Die Ausbeute nach der Reinigung liegt zwischen 30 und 50 % und die Reinheit der Präparation wird gelelektrophoretisch überprüft.

Spaltung mit *Rsa I* und Reinigung der Spaltprodukte

Die gereinigte cDNA-Fraktion wird mit 15 U *Rsa I* für 3 Stunden bei 37°C gespalten. Die Vollständigkeit der Spaltung wird gelelektrophoretisch überprüft. War die Spaltung vollständig, werden die Spaltprodukte mit QIAEX II (Qiagen, Hilden) von *Rsa I* getrennt und auf 20 µl konzentriert. Für die folgende Ligation werden die QIAEX II Glaskügelchen vollständig von den cDNA-Lösungen mit Hilfe von Mikrofiltrationssäulchen (Porendurchmesser 0,45 nm) abgetrennt. Die cDNA wird in Gegenwart von 1,3 M Ammoniumacetat und 75 % Ethanol präzipitiert und in 6,7 µl TNE-Puffer resuspendiert.

Herstellung der Subtraktionskontrolle aus Skelettmuskulatur PolyA-RNA und *HaeIII* verdauter ϕ X174 Phagen DNA

Die Bedingungen während der subtraktiven Hybridisierung werden kontrolliert, indem parallel zu den experimentellen Ansätzen *HaeIII*-gespaltene ϕ X174 Phagen-DNA aus Muskel cDNA Hintergrund subtrahiert wird.

Ausgehend von 2 µg PolyA-mRNA aus humaner Skelettmuskulatur werden zunächst mit dem cDNA Synthesis Primer und Superscript II (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) mRNA/cDNA-Hybride hergestellt (1,5 Stunden bei 42°C in Gegenwart von 1 mM dNTPs und 1 x Erststrang-Puffer). Für die Synthese des zweiten Stranges wird der Erststrang-Synthese Ansatz mit DNA-Polymerase I (24 U), RNase H (1 U), *E.coli* DNA-Ligase (4,8 U) und T4 DNA-Ligase (6 U) inkubiert. Die ds cDNA wird anschließend mit *RsaI* (15 U) für 1,5 Stunden bei 37°C geschnitten, PCI extrahiert und gefällt. Einem Teil dieser Skelettmuskel cDNA wird als „Tester“ mit *HaeIII*-gespaltener ϕ X174 Phagen-DNA vermischt, so dass jedes Phagen-Fragment 0,02 % der gesamten cDNA ausmacht. Der andere Teil fungiert als „Driver“.

Adapterligation an die experimentelle „Tester“ cDNA

Zur Ligation der Adaptern wird der „Tester“ auf zwei Ansätze verteilt. Der eine Teil wird mit Adapter 1 (*TesterI_{T-1}*) und der andere mit Adapter 2R (*TesterI_{T-2}*) ligiert. Für die Herstellung der unsubtrahierten „Tester“-Kontrolle werden Aliquots aus beiden Ligationsansätzen vereint (*TesterI_{T-C}*). Der *TesterI_{T-C}* dient in den folgenden Experimenten als positive Kontrolle für die Ligation und später als negative Kontrolle für die Subtraktion. Die „Driver“ cDNA (*DriverI_D*) wird nicht ligiert.

Für die Ligation werden 2 µl 1:6 verdünnte „Tester“ cDNA (*TesterI_{T-1}*, -2 und -C), 3 µl H₂O, 2 µl 5 x Ligationspuffer und 400 U T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Reaktionen werden mit 1 µl EDTA/ Glykogen (0,2 M EDTA, 1 mg/ ml Glykogen) gestoppt und die Ligase 5 Minuten bei 72°C inaktiviert. Die Adapter-ligierte Kontrolle *TesterI_{T-C}* wird 1:1000 in 1 ml Wasser verdünnt.

Ligationseffizienztest

Wenigstens 25 % der cDNA-Fragments sollten an Adaptern ligiert sein, um eine Subtraktion erfolgreich durchführen zu können. Die Effizienz der Adapterligationen wird in einer semi-quantitativen PCR überprüft. Die PCR-Produkte von zwei Gen-spezifischen Primern (G3PDH5' und G3PDH3' für die Muskel/ ϕ X174_T Kontrolle und b-act1 und b-act2 für die

experimentellen *Tester_T*) werden mit den PCR-Produkten von dem Adapter-spezifischen PCR Primer 1 und dem 3'-gelegenen Gen-spezifischen Primer verglichen.

Ein 25 µl PCR-Reaktionsansatz mit 1 µl 1:200 verdünntem Adapter-ligierten „Tester“, 4 µM 3'-Primer, 4 µM 5'-Primer oder PCR Primer 1, 1 x PCR Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTP und 1 x Advantage cDNA Polymerase Mix wird 25 Runden (für die Muskel/ ϕ X174_T Kontrolle) bzw. 30 Runden (für die experimentellen „Tester“) amplifiziert.

Programm: 1. Denaturierung 94°C 30 sec
 2. 25 Zyklen 94°C 10 sec, 65°C 30 sec, 68°C 2,5 min
 3. Kühlen 4°C halten

Unterscheiden sich die PCR-Produkte auf einem 2 %-igen Agarosegel in ihrer Intensität weniger als vierfach, wird mit der subtraktiven Hybridisierung begonnen. Andernfalls wird die Ligation wiederholt. So weit wie möglich wird die Konzentration der PCR-Produkte fluoreszenzphotometrisch bestimmt und vergleichend herangezogen.

3.11.3 Erste und zweite Hybridisierung

Die Adapter-ligierten „Tester“ cDNAs werden mit einem 25-fachen Überschuß „Driver“ cDNA in 4 µl 1 x Hybridisierungspuffer versetzt, für 1,5 Minuten bei 98 °C durch Hitze denaturiert und 8 Stunden bei 68°C in einem Thermozykler inkubiert.

In der unmittelbar anschließenden zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung miteinander vermischt (= *Tester_{1T}*). Die Bildung von Hybriden mit zwei unterschiedlichen Adaptoren ist nun möglich und repräsentiert vor allem differentiell exprimierte Sequenzen. Die Zugabe von frisch denaturiertem „Driver“ führt zu einer weiteren Anreicherung der differentiell exprimierten Sequenzen.

Die „Driver“ cDNA wird 90 Sekunden bei 98°C denaturiert (in 4 x Hybridisierungspuffer). Die Zugabe des „Drivers“ in etwa 8-fachem Überschuß und die Vermischung der beiden „Tester“ Fraktionen wird beinahe gleichzeitig durchgeführt. Für die zweite Hybridisierung wird über Nacht bei 68°C im Thermozykler inkubiert. Danach wird der Ansatz in 200 µl Dilution Buffer verdünnt, für 7 Minuten auf 68°C erhitzt und bei -20°C gelagert.

3.11.4 Subtraktive „Suppression PCR“ Amplifikation

Neben der subtrahierten *Tester_{1T}* cDNA wird die unsubtrahierte *Tester_{1T-C}* Kontrolle amplifiziert, um die Effizienz der Subtraktion messen zu können. Zur Überprüfung der Reaktionsbedingungen werden ebenfalls der Muskel/ ϕ X174_T „Tester“ mit seinem Kontrollansatz und eine erfolgreich subtrahierte Kontrolle amplifiziert.

1 µl des unter 2.11.3 hergestellten 1:200 verdünnten *Testers_{1T}* bzw. Muskel/ ϕ X174_T Kontrolle und 1 µl des unter 2.11.2 1:1000 verdünnten *Drivers_{1D}* werden in einem 25 µl PCR-Reaktionsansatz (0,4 µM PCR Primer 1, 0,2 mM dNTPs, 1 x Advantage cDNA Polymerase Mix, 1 x PCR-Reaktionspuffer) zunächst für 5 Minuten auf 75°C erhitzt. In diesem Schritt werden fehlende Stränge komplementär zu den überhängenden Adaptoren aufgefüllt. Danach werden die differentiellen Sequenzen in 27 PCR Zyklen „primärer PCR“ amplifiziert.

Programm: 1. Denaturierung 94°C 25 sec
2. 25 Zyklen 94°C 10 sec, 66°C 30 sec, 72°C 1,5 min
3. Kühlen 4°C halten

In der sekundären PCR werden die primären 1:10 verdünnten PCR-Produkte in 25 µl PCR-Reaktionsansätzen (0,2 mM dNTPs, 1 x „Advantage cDNA Polymerase Mix“, 1 x PCR Reaktionspuffer) mit 0,4 µM Nested PCR Primer 1 und 4 µM Nested PCR Primer 2R in 12 Zyklen amplifiziert. Für die Sondenherstellung (vgl. 3.12.2) werden die Reaktionen doppelt angesetzt.

Programm: 1. 12 Zyklen 94°C 10 sec, 68°C 30 sec, 72°C 1,5 min
2. Kühlen 4°C halten

Zur Kontrolle der Subtraktionsbedingungen werden Aliquots der primären und sekundären PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Subtraktionseffizienztest

Um einen Eindruck von der Effizienz der Subtraktion bei dem experimentellen *Tester1_T* zu erhalten, wird der Subtraktionseffizienztest durchgeführt. Der Subtraktionseffizienztest ist eine semiquantitative PCR, die die Häufigkeit von bestimmten cDNA vor und nach der Subtraktion miteinander vergleicht. Idealerweise wird die Häufigkeit von einem nicht-differentiell und einem differentiell exprimierten Gen analysiert. Hier wird die Häufigkeit von *β-aktin* (nicht-differentiell) analysiert. Differentiell exprimierte Sequenzen sind für die untersuchten Fragestellungen für *Danio rerio* nicht bekannt.

Die sekundären PCR-Produkte werden 1:10 in Wasser verdünnt. In weiteren Verdünnungsschritten werden die Konzentrationen der PCR-Produkte angeglichen. Das Verhältnis der Konzentrationen untereinander wurde über gelelektrophoretische Auftrennungen abgeschätzt. Nach 18 PCR-Zyklen wird vom Reaktionsansatz (30 µl mit 1 ml verdünntem sekundären PCR-Produkt, 0,4 µM b-act1, 0,4 µM b-act2, 1 x PCR-Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTP) ein Aliquot von 5 µl entnommen. In Abständen von 5 Zyklen werden weitere Aliquots gewonnen. Auf einem 2% Agarosegel werden die Aliquots gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Bei einer erfolgreichen Subtraktion sollte die *β-aktin* Bande in den Ansätzen mit den subtrahierten Matrizen 5 bis 15 Zyklen später als in den Kontroll-Subtraktion detektierbar sein.

Programm: 1. 18 bzw. 5 Zyklen 94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 68°C 2 min
2. Kühlen 4°C halten

3.11.5 Ligation und Transformation der cDNA-Bibliothek

Zum Erstellen der subtrahierten Bibliothek werden 3 µl der sekundären PCR-Produkte von *Tester1-Bib* in den pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim) ligiert (vgl. 3.8.2). Die Elektrottransformation in *E.coli* XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA) soll zu etwa 10⁴ unabhängigen Kolonien pro 1 µl sekundärem PCR-Produkt führen. Nach der „Blau-Weiß-Selektion“ werden zufällig ausgewählte Kolonien entweder zur Herstellung von Kolonie Dot Blots (vgl. 3.12.3) oder zur Herstellung von Dot Blots aus PCR-Produkten (vgl. 3.12.3) herangezogen.

3.12 Screening der subtrahierten cDNA-Bibliotheken

3.12.1 Übersicht

Die subtrahierten cDNA-Bibliotheken enthalten neben den cDNA-Fragmenten, die differentiell exprimierte mRNAs repräsentieren, auch cDNA-Fragmente, die im „Tester“ und im „Driver“ im gleichen Umfang exprimiert werden. Der Umfang dieses „Hintergrundes“ hängt von der RNA-Qualität und von der Durchführung der Subtraktion ab. Weiterhin begünstigen wenige differentiell exprimierte Gene und geringe quantitative Unterschiede in der Expression die Bildung eines hohen „Hintergrundes“.

Bei einem hohen „Hintergrund“ werden zufällig ausgewählte Transformanten im differentiellen *Screening* in Klone, die differentiell exprimierte cDNA-Fragmente tragen (Kandidaten) und in „Hintergrund“ vorsortiert.

Es gibt zwei Arten, eine subtrahierte cDNA-Bibliothek differentiell zu *screenen*. Im ersten Ansatz werden die Klone der subtrahierten cDNA-Bibliothek (z. B. *Tester1-Bib*) mit den nicht-subtrahierten cDNA-Sonden aus *Tester1-C* und *Driver1-C* hybridisiert (Hedrick *et al.*, 1984; Sakaguchi *et al.*, 1986). Klone, die differentiell exprimierte Transkripte repräsentieren, hybridisieren mit der *Tester1-C* Sonde, jedoch nicht oder schwächer mit der *Driver-C* Sonde. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur häufig vorkommende Gene ein detektierbares Hybridisierungssignal produzieren können (Wang und Brown, 1991).

Der zweite Ansatz verwendet die „vorwärts“- und „rückwärts“-subtrahierten cDNA-Populationen (*Tester1-Bib* und *Tester2-Bib*) als Sonden. In der „rückwärts“-subtrahierten cDNA-Bibliothek ist der ursprüngliche *Tester* als *Driver* und der *Driver* als *Tester* eingesetzt. In den subtrahierten cDNA-Bibliotheken sind die seltenen differentiellen Sequenzen angereichert, so dass es bei differentieller Expression zu einem detektierbaren Hybridisierungssignal mit der „vorwärts“ subtrahierten cDNA-Population (*Tester1-Bib*) kommen kann. Die differentiellen Kandidaten hybridisieren mit der „vorwärts“-Sonde (*Tester1-Bib*) stärker als mit der „rückwärts“ (*Tester2-Bib*) Sonde. Signale, die mit der *Tester2-Bib*-Sonde intensivere Signal erzeugen als mit der *Tester1-Bib*-Sonde gelten als „Hintergrund“ (Lukaynov *et al.*, 1996; Wang und Brown, 1991).

Das „PCR-Select Differential Screening Kit“ sieht vor, dass Signale nur als differentiell einzustufen sind, die ein fünfmal stärkeres Signal mit der „vorwärts“ als mit der „rückwärts“ subtrahierten Sonde erzeugen. In der vorliegenden Arbeit werden die Signale im Vergleich zu ihren Nachbarn bewertet. Dabei bewegen sich die Unterschiede in einem Bereich von etwa 1,5 und 3.

Für das differentielle *Screening* wird neben der beschriebenen subtrahierten „vorwärts“ Bibliothek (*Tester1-Bib*) eine „rückwärts“ gerichtete subtrahierte cDNA-Bibliothek (*Tester2-Bib*) hergestellt.

3.12.2 Vorbereitung der cDNA-Sonden und der negativen Hybridisierungskontrollen

Vorbereitung der cDNA-Sonden

Für die cDNA-Sonden werden jeweils zwei identische Ansätze (etwa 40 µl) sekundäres PCR-Produkt (*Tester1-Bib*, *Tester2-Bib*, *Tester1-C*, *Tester2-C*) vereint, über das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 28 µl eluiert. Die Adaptern werden in hintereinander geschalteten Reaktionen mit *Rsa I*, *Eag I* und *Sma I* in entsprechenden Puffern bei 37°C bzw. 30 °C abgespalten, um eine Hybridisierung der Adaptersequenzen zu vermeiden. Die Vollständigkeit der Spaltung wird in parallelen Ansätzen, denen 500 ng „Plasmid 1.7“ (pGEM-T-Vektor mit negativer Hybridisierungskontrolle 1R mit einer *RsaI* Schnittstelle bei 1875 bp) zugefügt wurde, überprüft. Der linearisierte Vektor und die abgespaltenen Adaptern werden in einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Spaltprodukte über ein 2 % NuSieve Gel (FMC, Rockland, ME, USA) visualisiert. Die Adaptern werden von den cDNA-Fragmenten mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen, Hilden) getrennt. Die Sondenvorlagen werden in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, eluiert. Zur Herstellung der radioaktiv-markierten Sonden wird das „Prime It II Kit“ von Stratagene (La Jolla, USA) benutzt (vgl. 3.9.2).

Herstellung der negativen Hybridisierungskontrollen

Da verbliebene Adaptersequenzen an den Sonden trotz ihrer geringen Größe zu einem erheblichen Hintergrundsignal führen können, wird das Hintergrund Signal mit Hilfe der beiden negativen Hybridisierungskontrollen *cDNA1R* und *cDNA2R* überprüft. *cDNA1R* und *cDNA2R* sind Plasmide, die cDNA-Inserts tragen. Das cDNA-Fragment *cDNA1R* korrespondiert mit einem 320 bp langen Abschnitt aus einem Testis-spezifischen Protein aus Maus (X52128). Das cDNA-Insert *cDNA2R* entspricht einem 220 bp langem Fragment aus Prostata-spezifischer humaner mRNA für Semenogelin III (AN_M81652). Beide Inserts enthalten die Sequenzen der Nested Primer 1 und Nested Primer 2R. Da die korrespondierenden mRNAs Gewebe-spezifisch exprimiert werden, gehen Signale mit den negativen Kontrollen während des differentiellen *Screenings* auf Wechselwirkungen der Adaptersequenzen mit unvollständig entfernten Adaptern der Sonden zurück.

Die *Inserts* (jeweils 3 ng Plasmidlösung) werden in der zweiten Suppression PCR parallel mit den subtrahierten cDNA-Bibliotheken und deren Kontrollen amplifiziert. In den folgenden Schritten werden sie wie die subtrahierten cDNA-Bibliotheken behandelt, um schließlich in die Dot Blot Herstellung einbezogen zu werden.

3.12.3 Herstellung von Dot Blots für das differentielle *Screening*

In der „Blau-Weiß-Selektion“ ausgewählte Kolonien werden in Dot Blots aufgereiht und differentiell *gescreent*. Eine Übersicht über die Vorteile, die Anwendung und die Herstellung der verwendeten Dot Blot Verfahren gibt Tabelle 1.

Die Kolonie und die PCR-Produkt Dot Blots gemäß der „Select Differential Screening Kits“ *User Manual* (1997) hergestellt, während die Plasmid Dot Blots mit einem daraus modifizierten Protokoll angefertigt werden.

Für alle Anwendungen werden 96 Aliquots cDNA-Fragment-haltige Lösung (Bakteriensuspension, Plasmidpräparation, Kolonie PCR-Produkt) auf Nylonmembran aufgetragen. Nach

der Denaturierung der DNA wird neutralisiert und die DNA auf der Membran verankert. Bis zur Verwendung werden die Membranen getrocknet bei Raumtemperatur gelagert. Initial wurden die kostengünstigeren Kolonie und Plasmid Dot Blots für das differentielle *Screening* hergestellt. Nach der Präparation der hausinternen *Taq*-Polymerase, wurde mit Hilfe der PCR-Produkt Dot Blots *gescreent*, die ein geringes Hintergrundsignal und ein gleichmäßiger Auftrag auszeichnete.

Tabelle 3-1: Vergleichende Übersicht zu den Dot Blot Verfahren, die im differentiellen Screening verwendet werden.

	Kolonie Dot Blot	Plasmid Dot Blot	PCR-Produkt Dot Blot
Hintergrund	hoch	hoch	gering
Auftrag	ungleichmäßig	gleichmäßig	gleichmäßig
Durchführung	schnell	langsam	mittel
Kosten	gering	gering	hoch
Anwendung	Lateral/ Medial cDNA-Bibliotheken, 1. Screening	Lateral/ Medial cDNA-Bibliotheken, 2. Screening	Regeneration/ Kontroll cDNA Bibliothek
Bakterienkulturen in LB/amp/tet Medium	100 µl in 96 Loch Platten, 2 Stunden bis über Nacht	2 ml Übernachtskulturen	100 µl in 96 Loch Platten, 2 Stunden bis über Nacht
Aufarbeitung	-	Plasmid Präparation im kleinen Maßstab	Kolonie PCR mit 0,5 bis 5 µl Bakteriensuspension als Matrize
Auftragshilfe	12 Kanalpipette	12 Kanalpipette, Dot Blot Apparatur (Bio-Rad, München)	12 Kanalpipette, Dot Blot Apparatur
Membran	Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)	Hybond N	Hybond N
Auftragsmenge	weniger als 1 µl Kultur wächst über Nacht auf Hybond N/LB/amp/tet Platte	5 µl Plasmidlösung	4 µl PCR-Produkt aus 20 µl Reaktionsansatz*
Denaturierung	4 Min. 1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH auf getränktem Blotting Papier	200 µl 1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH über Dot Blot Apparatur	vor Auftrag: 4 µl 0,6 N NaOH
Neutralisierung	4 Min. 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 auf getränktem Blotting Papier	200 µl 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 über Dot Blot Apparatur	nach der Fixierung: 4 Minuten 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 auf getränktem Blotting Papier
Anzahl identischer Blots	4	2	4
Fixierung	2 Stunden, 80°C	UV-Stratalinker (Stratagene, La Jolla, USA)	UV-Stratalinker

*: Zur Kontrolle des Auftrags werden die PCR-Produkte nach der Denaturierung mit 1 µl 10 x DNA-Ladepuffer gemischt. Die Membrane werden für eine spätere Beurteilung der Ladegüte im Vergleich zu den Hybridisierungssignalen auf einem Leuchttisch mit der Coolpix 750 Digitalkamera (Nikon) fotografiert.

3.12.4 Hybridisierung der Dot und „cDNA Southern“ Blots sowie die Auswertung der Hybridisierungssignale

Kolonie und Plasmid Dot Blots

Die Kolonie Dot Blots wurden mit den subtrahierten cDNA-Sonden (vgl. 3.12.2) in Church Puffer hybridisiert (vgl. 3.12.4). Die eingeschweißten Membranen werden auf der Phosphoimager Platte (Fuji, Düsseldorf) über Nacht exponiert. Nach dem Einlesen der Phosphoimager Platten werden anhand der Ausdrücke zunächst Kandidaten_{Kolonie} ermittelt. Dabei wird ein Kandidat_{Kolonie} als positiv bewertet, wenn sein Signal relativ zu den umgebenden Klonen auf dem Blot der „vorwärts“-Sonde (*Tester1-Bib*) intensiver als auf dem Blot der „rückwärts“-Sonde (*Tester2-Bib*) ist. Im Zweifelsfall wird der Transformand zu den Kandidaten_{Kolonie} gerechnet. Wird die differentielle Expression der Kandidaten_{Kolonie}, die aus dem Kolonie Dot Blot stammen, bestätigt, werden sie in folgenden als Kandidaten_{Plasmid} bezeichnet.

PCR-Produkt Dot Blots

Die Dot Blots aus den PCR-Produkten (vgl. 3.12.3) werden in ULTRAhyb von Ambion (Austin, USA) mit subtrahierten und nicht-subtrahierten cDNA Sonden hybridisiert (vgl. 3.12.4). Die eingeschweißten Blots werden 1 oder 4 Stunden bei -70°C auf XLS-1 oder X-OMAT AR Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart) exponiert. Die Signale werden mit Hilfe des Geldokumentationssystems (Bio-Rad, München) eingescannt und über die Quantity One Software (Bio-Rad, München) vermessen. Hierzu wird ein 96 Loch Gitter mit variablen Lochdurchmessern über die Signale gelegt. Nur die Intensität der Signale innerhalb der Löcher wird vermessen und kann als Microsoft Excel (www.microsoft.com) einlesbare Datei gespeichert werden. Die Größe der Löcher und die Position des Gitters wird den Blots angepasst, ist jedoch innerhalb einer Serie identisch. Die Helligkeit der Aufnahme wird so eingestellt, dass „freie“ Fläche trotz Eigenfarbe des Films oder Hintergrundsignal, in dem Blotprofil als „signalfrei“ (= 0) vermessen wird.

„cDNA Southern“ Blots

Die Signale der Kandidaten_{PCR} oder Kandidaten_{Plasmid} werden quantitativ mit Signalen der β -aktin Sonde des gleichen Blots verglichen. Hierzu werden die Signale digitalisiert und ihr „Volumen“ mit der Quantity One Software (Bio-Rad, München) vermessen. Die Signale der Kandidaten werden mit Hilfe der zugehörigen β -aktin Signale standardisiert und miteinander verglichen.

3.13 Allgemeine Computer gestützte Verfahren

3.13.1 Sequenzanalyse und phylogenetische Analyse

Unbekannte Sequenzen werden zunächst über die NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.gov) Standard Nukleotid/Nukleotid *BLAST* Suche auf bekannten Sequenzanteile hin überprüft (*Non-Redundant* und *Est* Datenbanken). Kann die Sequenz keinem Gen zugeordnet werden, wird untersucht, ob sie ein offenes Leseraster enthält (ORF Fin-

der, NCBI). Sie wird ggf. translatiert und ähnliche Sequenzen mit Hilfe von Standard Protein/Protein BLAST gesucht. Um zu prüfen, ob ein *Insert* vollständig sequenziert ist, werden die Sequenzen von beiden Seiten im BLAST 2 Sequences (NCBI) miteinander verglichen.

Für die Herstellung von phylogenetischen Stammbäumen werden die translatierten Proteinsequenzen der entsprechenden Gene verwendet. Das offene Leserater wird über DNASIS V 2.0 (Hitachi Software Engineering America, San Francisco, CA, USA) oder den ORF Finder (NCBI) ermittelt. Nach einem Vergleich in der Standard Protein/Protein „BLAST“ Funktion wird i. d. R. für verschiedene Spezies jeweils das ähnlichste Protein ausgewählt. Eine Liste aller ausgewählten Sequenzen im FASTA Format wird erstellt und in Clustal W (EMBL European Bioinformatics Institute; www.ebi.ac.uk/clustalw) in ein ausgerichtetes Dateiformat (.aln, lesbare gcg MSF Datei) umgewandelt. Die Sequenzen werden auf die kleinste gemeinsame Sequenz gekürzt und in Clustal W überprüft. Die ausgerichtete und geschnittene Sequenzdatei wird mit Hilfe der Wisconsin Sequence Analysis Package 4.0 (Genetics Computer Group, Oxford, UK) über die WWW-Oberfläche des Regionalen Rechenzentrums der Universität zu Köln (gendb.rz.uni-koeln.de/w2h) unter den Funktionen *Distances* (Kimura Algorithmus) gefolgt von *GrowTree* prozessiert. Der resultierende phylogenetische Stammbaum wird nach dem UPGMA Algorithmus (Unweighted pair-group method using arithmetic averages; Sneath und Sokal, 1973) ermittelt, der den Abstand in Aminosäureaustausche misst. Die erzeugte Nexus-Datei kann in TreeViewerPPC 1.6.5 in verschiedenen Formaten dargestellt werden (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>).

3.13.2 Präparataufnahmen und deren Digitalisierung

Die auf Ektachrome 160T aufgenommenen Dias werden mit Hilfe des Nikon Diascanners digitalisiert. Die zu dem originalen Diapositiv ähnlichsten Bilddateien werden erzeugt, indem der Diascanner (Nikon, Düsseldorf) über das Programm (NikonScan 1998, 2.5) angesteuert wird und hier der Kontrast und die Farbbalance eingestellt werden. *Whole mount* Präparate werden unter dem Fluoreszenzbinokular mit Hilfe der Coolpix 950 Digital Kamera aufgenommen und die Bilddateien auf dem Image Mate (SanDisk, Sunnyvale, CA, USA) zwischengespeichert, bevor sie auf einen Computer transferiert werden (Picture Viewer; Apple Computer, Feldkirchen). Der Flachbrettscanner wird über Adobe® Photoshop® 5.0 Power PC™ (Adobe, San Jose, CA, USA) angesteuert.

Helligkeit, Kontrast, Bildgröße und Dateigröße werden in Adobe® Photoshop® 5.0 Power PC™ eingestellt, bevor die prozessierten Bilder in FreeHand™7.0 importiert werden.

4 Ergebnisse

Im olfaktorischen System liegen Riechsinneszellen verteilt über das olfaktorische Epithel verteilt und projizieren unabhängig von ihren Nachbarschaftsbeziehungen in den olfaktorischen Bulbus. Dort konvergieren die Fortsätze von Riechsinneszellen, die den gleichen Rezeptor exprimieren, in Glomeruli. Die Positionen der entsprechenden Glomeruli ist stereotyp und über verschiedene Individuen einer Spezies hinweg invariant. An der Wegfindung sind die olfaktorischen Rezeptorproteine beteiligt, aber sie können nicht die einzigen Moleküle sein, die in die Etablierung des glomerulären Musters involviert sind.

Um weitere Wegfindungsmoleküle zu identifizieren, wurden in dieser Studie Transkripte isoliert, die differentiell im olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* exprimiert werden. Dazu wurden mit Hilfe der *Suppression* subtraktive *Hybridisierung* (SSH) in zwei Ansätzen cDNA-Bibliotheken hergestellt, in denen differentiell exprimierte cDNAs angereichert vorlagen.

Der erste Ansatz sollte zu Transkripten führen, die während der Regeneration der glomerulären Projektion hochreguliert werden („Regenerations“ cDNA-Bibliothek). In dem zweiten Ansatz wurden die Transkriptgemische des lateralen und des medialen Bulbusabschnitts miteinander verglichen („laterale“ und „mediale“ cDNA-Bibliothek). Hier sollten mRNAs identifiziert werden, deren Expression im olfaktorischen Bulbus räumlich reguliert war.

Für die Herstellung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken wurde zunächst die Gewebe- und die RNA-Gewinnung optimiert. Für die anschließenden cDNA-Amplifizierungen, die Erstellung der subtrahierten cDNA-Bibliothek und ihr *Screening* wurden die gleichen Verfahren verwendet, so dass sie gemeinsam beschrieben sind. Die differentiell exprimierten Transkripte aus den cDNA-Bibliotheken, in denen räumlich regulierte Transkripte angereichert sind, werden im letzten Abschnitt mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen charakterisiert.

4.1 Untersuchung der Regeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen nach Zinksulfat vermittelter Degeneration und des regenerierenden glomerulären Musters

Die Güte einer subtrahierten cDNA-Bibliothek hängt unter anderem von einem möglichst großen Unterschied in der Expression der differentiellen Gene ab. Unter regenerierenden Bedingungen wachsen Axone von vielen neu gebildeten Rezeptorneuronen zu ihren Zielregionen in den olfaktorischen Bulbus. Moleküle, die eine Rolle in der Wegfindung spielen, könnten zu diesem Zeitpunkt hoch reguliert sein, da er der Ontogenese gleicht. Für die subtrahierte cDNA-Bibliothek sollte deswegen eine geeignete Degenerationsmethode etabliert werden und ein Zeitpunkt gefunden werden, an dem das Einwachsen der neu gebildeten Rezeptorneuronen maximal ist.

Die Applikation von Zinksulfat-Lösung auf das olfaktorische Epithel induziert die Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen und führt dadurch zum Verlust des glomerulären Musters. Sie beeinflusst jedoch bei entsprechend eingestellten Verfahren die Morphologie des olfaktorischen Systems nicht und stellt so die Reversibilität sicher. Die Zinksulfat-Behandlung könnte damit ein geeignetes Verfahren sein, um die Riechsinneszellpopulation und das glomeruläre Muster reversibel zu degenerieren.

Die Auswirkungen einer modifizierten Zinksulfat-Applikation auf das olfaktorische Epithel und den Bulbus werden in diesem Abschnitt untersucht.

Durch den Verlust eines erheblichen Anteils der Riechsinneszellen in Folge der Zinksulfat-Behandlung, verlieren die Glomeruli im olfaktorischen Bulbus die meisten ihrer axonalen Projektionen aus dem Epithel. Durch die regenerative Kapazität der *globose* Basalzellen werden die fehlenden Riechsinneszellen im Verlauf der Regeneration anschließend ersetzt. Diese neu „geborenen“ Neuronen stellen mit ihren neu ausgebildeten Nervenfortsätzen das Projektionsmuster im olfaktorischen Bulbus wieder her.

Über den Zeitverlauf der Regeneration wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem die meisten neu gebildeten Projektionen den olfaktorischen Bulbus erreichen.

4.1.1 Eine Zinksulfat-Behandlung reduziert die neuronale Population im olfaktorischen Epithel und erhöht die Anzahl TUNEL-positiver Zellen

Zur Etablierung und Kontrolle einer modifizierten Zinsulfat-Behandlung (vgl. 3.2.4) wurde die Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen über die Abnahme der Expression des neuronalen Hu-Proteins (vgl. 3.5.3) und über die Detektion apoptotischer Zellen in der TUNEL-Färbung (vgl. 3.5.5) verfolgt. Eine Abschätzung über das Ausmaß der degenerierten Riechsinneszellen im olfaktorischen Epithel hilft hier, den erreichten Effekt im olfaktorischen Bulbus unabhängig abzuschätzen und zu beurteilen. Mit Hilfe des TUNEL-Assays sollte untersucht werden, ob die Zinksulfat-Behandlung bei den olfaktorischen Rezeptorneuronen einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod auslöst. Die Färbung mit dem Hu-Antikörper zeigt die überlebenden Neuronen im olfaktorischen Epithel.

Für die Färbungen wurden die linken olfaktorischen Epithelien adulter Zebrabärblinge zweimal für jeweils 150 Sekunden mit 1 bis 2 µl 3 %-iger Zinksulfatlösung inkubiert (vgl. 3.2.4). Sie wurden vier, acht, zwölf, 24 und 72 Stunden nach der Zinksulfat-Behandlung zur Analyse präpariert.

TUNEL-Färbung am olfaktorischen Epithel

Im TUNEL-Assay werden apoptotische Zellen aufgrund ihrer gesteigerten DNA-Fragmentierung nachgewiesen (vgl. 3.5.5). Ein stark erhöhter Grad der DNA-Fragmentierung gilt als ein Kriterium für den apoptotischen Zelltod.

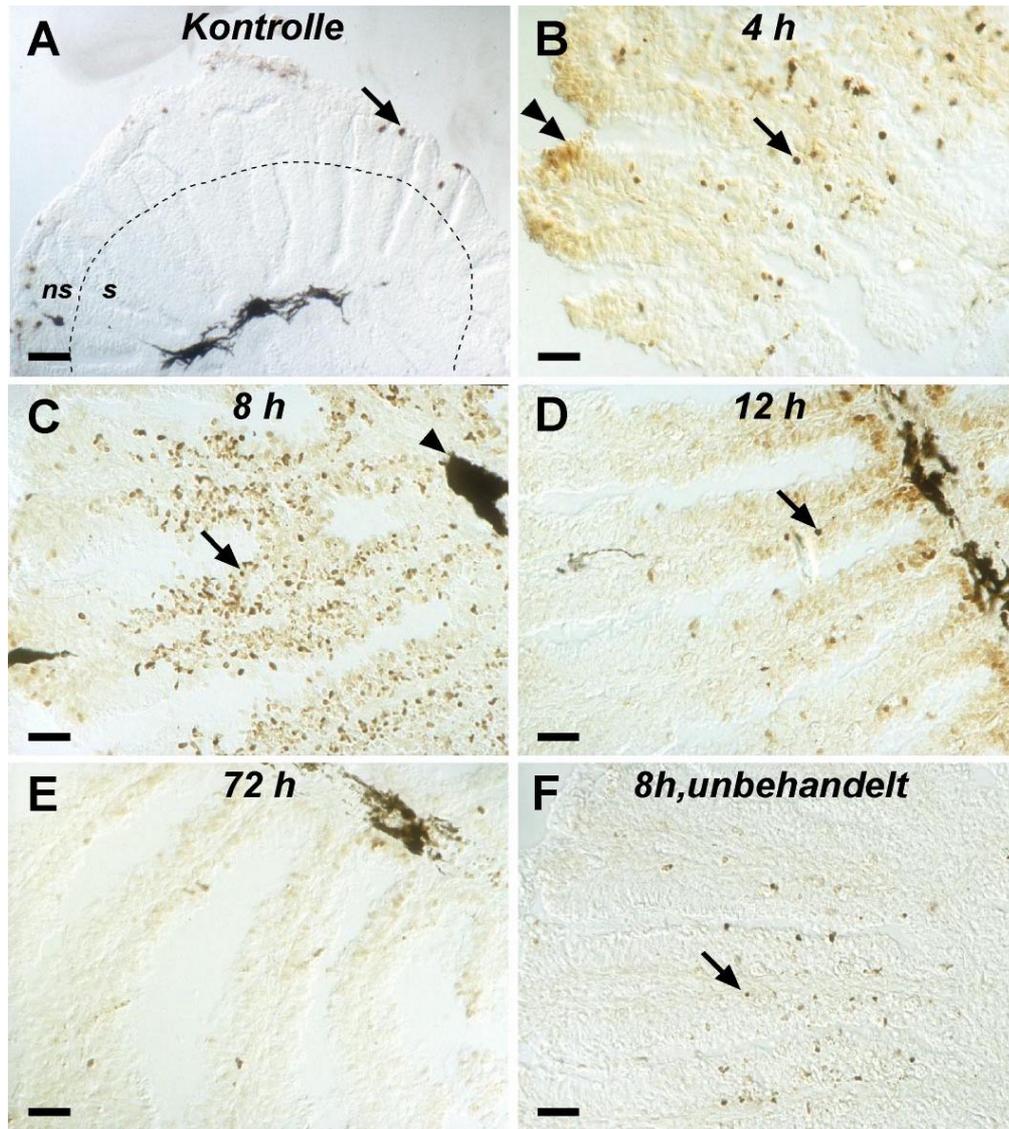


Abbildung 4-1: TUNEL-Färbung am olfaktorischen Epithel zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen. A) Unbehandelter Zebrafisch. B) 4 Stunden, C) 8 Stunden, D) 12 Stunden, E) 72 Stunden nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration; linke, behandelte Seite. F) rechte, unbehandelte Seite von C). Pfeil: Apoptotische Zellen; Doppelspitze: Unspezifische Färbung durch beschädigtes Gewebe. Der Maßstab entspricht 50 μm in A) und 25 μm in B) bis F). Die Schnitthöhe beträgt 10 μm .

Verglichen mit der Kontrolle kam es bereits vier Stunden nach der Behandlung der olfaktorischen Epithelien mit Zinksulfat zu einem deutlichen Anstieg der TUNEL-positiven Zellen (Abb. 4-1A,B). Während die sehr seltenen TUNEL-positiven Zellen in der Kontrolle im nicht-sensorischen Bereich des Epithels lokalisiert waren (Abb. 4-1A), befand sich die Mehrheit der apoptotischen Zellen vier, acht und zwölf Stunden nach der Zinksulfat-Behandlung im sensorischen Bereich des Epithels (Abb. 4-1B bis D). Nach vier Stunden besaßen die gefärbten Zellen eine normale Form und traten vereinzelt aus einem Hintergrund von nicht-markierten Zellen hervor (Abb. 4-1B). Acht Stunden nach Läsion waren etwa 20 % der Zellen im sensorischen Bereich apoptotisch (Abb. 4-1C). Neben diesen intensiv markierten Zellen gab es einen hohen Anteil von Zellen, die schwach angefärbt waren. Insgesamt schien der Bereich um die

Mittelraphe, die innere Proliferationszone (Berger, 1998), weniger markierte Zellen aufzuweisen als der übrige Teil des sensorischen Bereiches. Zwölf Stunden nach der Behandlung waren nur noch vereinzelt TUNEL-positive Zellen vorhanden (Abb. 4-1D), und Schnitte nach 72 Stunden glichen den Schnitten der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4-1E).

Daneben zeigten auch die nicht-behandelten Epithelien nach acht Stunden apoptotische Zellen (wenngleich deutlich weniger als auf der behandelten Seite; Abb. 4-1F), während nach vier und zwölf Stunden keine TUNEL-positiven Zellen detektiert werden konnten (nicht gezeigt). Trotz der sorgfältigen Applikation in eine Nasengrube wurde also auch die unbehandelte Seite beschädigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der apoptotische Zelltod von Zellen im sensorischen Bereich des Zinksulfat-behandelten olfaktorischen Epithels gezeigt werden konnte. Die meisten Zellen mit apoptotischen Merkmalen wurden acht Stunden nach der Inkubation mit Zinksulfat beobachtet. Da die apoptotischen Zellen sehr schnell phagozytiert werden, konnte ihr Gesamtanteil nicht bestimmt werden.

Um den Zustand der lebenden Zellpopulation im sensorischen Bereich zu untersuchen, wurde sie mit dem Hu-Antikörper immunohistochemisch markiert.

Immunohistochemische Detektion des neuronalen Hu-Proteins

Der Hu-Antikörper markiert neuronale Zellen und unterscheidet dadurch den sensorischen von dem nicht-sensorischen Bereich des olfaktorischen Epithels (Berger, 1998). Untersuchungen von A. Celik (2001) zeigen, dass nahezu alle Zellen im sensorischen Bereich des olfaktorischen Epithels Hu-positiv sind. Eine Spezifität für reife Riechsinneszellen, die gemeinsam mit unreifen Riechsinneszellen, Stützzellen und Basalzellen das olfaktorische Epithel bilden, besteht deswegen vermutlich nicht.

Vier Stunden nach der Zinksulfat-Behandlung wurde mit Hilfe des Hu-Antikörpers in dem linken behandelten Epithel weniger Neuronen als in der Kontrolle detektiert (Abb. 4-2A,B). Die markierten Zellen erschienen relativ unscharf und schwach gefärbt. Nach acht Stunden wurden einzelne Neuronen intensiv gefärbt (Abb. 4-2C, Pfeil). Sie machten etwa 30 % der Neuronen der Kontrolle aus und waren vermehrt im Bereich der inneren ringförmigen Proliferationszone des sensorischen Bereichs um die Mittelraphe angesiedelt (Berger, 1998). Sie könnten daher gerade „geborenen“ Neuronen entsprechen, deren Vorläufer zum Zeitpunkt der Degeneration basal in der Lamelle lagen, oder Neuronen, die gegenüber der Zinksulfat-Behandlung widerstandsfähig waren. Zusätzlich zu den gefärbten Zellen fielen ungefärbte, „Bläschen-artige Strukturen“ im sensorischen Bereich auf (Abb. 4-2C; Pfeilspitze). In der DAPI-Gegenfärbung wurde deutlich, dass diese Strukturen keinen Zellkern bzw. detektierbare DNA besaßen (Abb. 4-2F,G; Pfeilspitze). Vermutlich waren sie vergrößerte Vakuolen der Dendriten olfaktorischer Rezeptorneuronen, die nach dem Kontakt mit Zinksulfat entstanden waren (Cancalon, 1982). Auf den Schnitten nach 12 bzw. 24 Stunden war die Anzahl „Bläschen-artiger Strukturen“ verringert (Abb. 4-2D,E; Pfeilspitze). Die Hu-exprimierenden

Zellen waren auf diesen Schnitten wieder über den gesamten sensorischen Bereich verteilt, aber sie wirkten im Vergleich zur Kontrolle ungeordnet und reduziert.

Obwohl die rechten olfaktorischen Epithelien nicht mit Zinksulfat behandelt wurden, war ihre neuronale Zellpopulation ebenfalls gestört und es kam in einem vergleichbaren zeitlichen Verlauf 8 Stunden nach der Behandlung zu einer abgeschwächten Bildung „Bläschen-artiger Strukturen“ (nicht gezeigt).

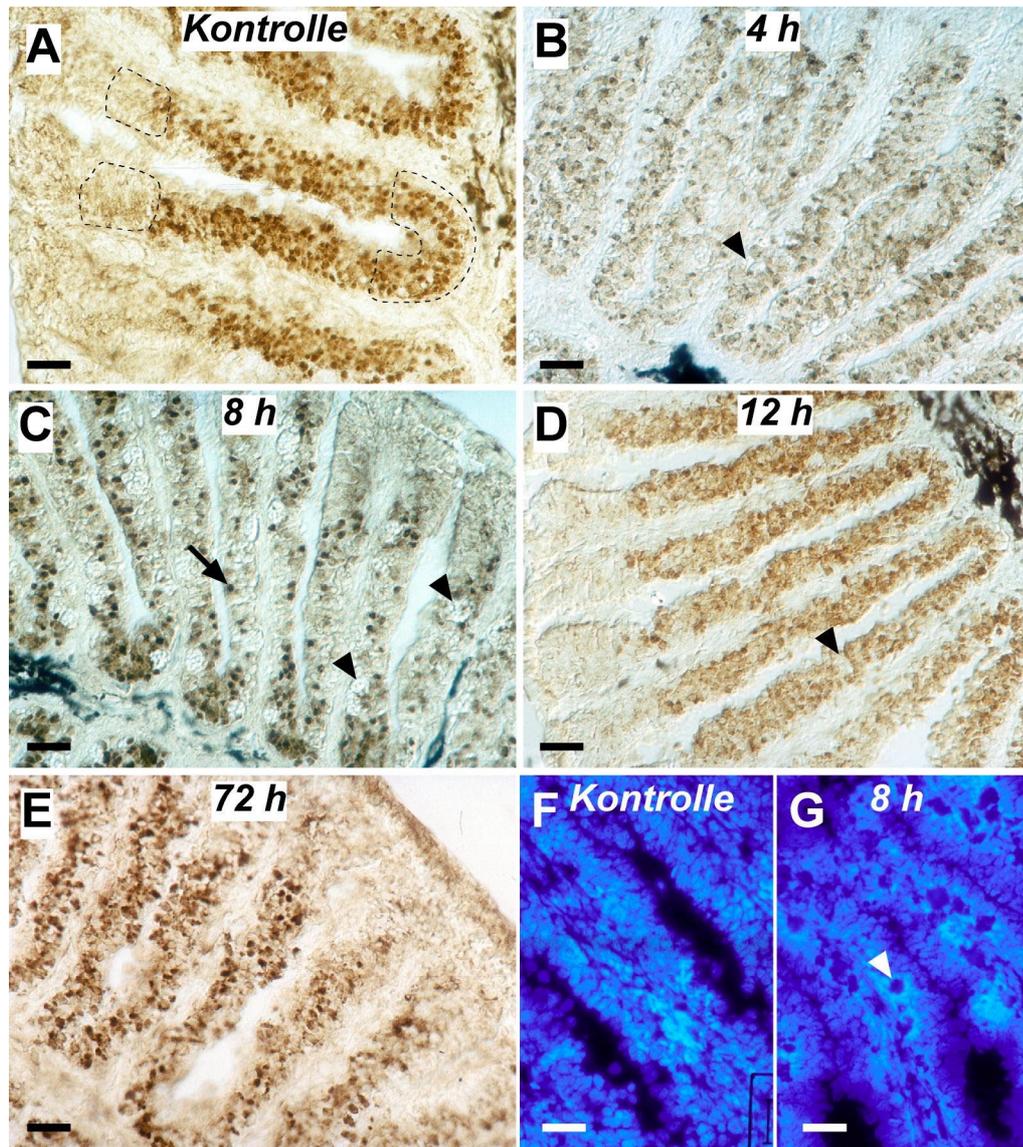


Abbildung 4-2: Immunohistochemische Detektion neuronaler Zellen im olfaktorischen Epithel mit dem Hu-Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen. A) Kontrolle, Epithel aus einem unbehandelten Zebraabärbling. Proliferationszonen sind beispielhaft eingezeichnet. B) 4 Stunden, C) 8 Stunden, D) 12 Stunden, E) 24 Stunden nach Zinksulfat-induzierter Degeneration. F) DAPI-Färbung eines unbehandelten Kontroll-Epithels. G) DAPI-Färbung an einem Epithel, 8 Stunden nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration. Für A) - G) Pfeil: intensiv gefärbtes Neuron 8 Stunden nach der Behandlung mit Zinksulfat. Pfeilspitze: „Bläschen-artige Strukturen“. Der Maßstab entspricht in allen Bildern 25 µm. Die Schnitthöhe beträgt 10 µm.

Anhand der Hu-Färbungen konnte gezeigt werden, dass die Epithelien in Folge der Zinksulfat-Behandlung einen Großteil ihrer neuronalen Zellpopulation verlieren. Nach acht Stunden war die Dichte der Hu-positiven Zellen auf etwa 30 % im Vergleich zur Kontrolle gesunken. Die meisten intakten Neuronen konnten im Bereich der inneren Proliferationszone detektiert werden. In den darauffolgenden untersuchten Stadien erschienen die Hu-positiven Zellen ungeordnet und schwächer gefärbt, so dass eine Abschätzung der Größe der neuronalen Population zu diesen Zeitpunkten nicht möglich war.

Der hypothetische Zeitverlauf der Degeneration im olfaktorischen Epithel

Trotz der nicht quantitativ erfassten TUNEL- und Hu-positiven Zellen ergeben beide Experimente zusammen ein Bild von den Vorgängen im olfaktorischen Epithel einige Stunden nach der Zinksulfat-Behandlung:

Vier Stunden nach der Behandlung mit Zinksulfat führen zerstörte oder beschädigte Neuronen im gesamten olfaktorischen Epithel zu einem diffusen Hu-Signal. Bei einigen Neuronen, vermutlich den olfaktorischen Rezeptorneuronen, vergrößern sich in Folge der Behandlung die Vakuolen in den Dendriten und führen in den Aufnahmen zu „Bläschen-artigen“ Strukturen. Möglicherweise wird dadurch der programmierte Zelltod ausgelöst. Nach acht Stunden liegt die höchste Anzahl TUNEL-positiver Zellen vor und der Höhepunkt der Vakuolenbildung ist erreicht. Beide Effekte sind auf das sensorische Epithel beschränkt. Zu diesem Zeitpunkt sind in den Proliferationszonen vermutlich bereits neue Neuronen entstanden, die während der Zinksulfat-Behandlung noch unreif im basalen Teil der Lamelle lagen und nun gereifte neuronale Marker exprimieren. Sie sind nicht auf eine induzierte erhöhte Proliferation zurückzuführen, da für die Vorläufer der olfaktorischen Rezeptorneuronen ein Zellzyklus von 17 Stunden angenommen wird (Huard und Schwob *et al.*, 1995). Nach 12 Stunden ist das Zinksulfat-induzierte Zellsterben beendet und die Expression des neuronalen Markers stabilisiert sich.

Anhand der Vorexperimente am olfaktorischen Epithel konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Zinksulfat zu einer Verkleinerung der neuronalen Population führt und dass ein großer Teil der Zellen im sensorischen Epithel in Folge der Behandlung den programmierten Zelltod stirbt. Quantitative und temporale Rückschlüsse auf die Auswirkungen auf das glomeruläre Muster ließen diese Ergebnisse nicht zu.

Dazu sollte das glomeruläre Muster im folgenden unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes visualisiert werden.

4.1.2 Dil ist ein geeigneter Farbstoff, um die Regeneration des glomerulären Musters zu beobachten

Das glomeruläre Muster sollte angefärbt werden, um den Verlauf der Regeneration des glomerulären Musters im olfaktorischen Bulbus zu beschreiben und quantitativ zu erfassen. Zunächst musste dafür eine geeignete Färbemethode gefunden werden.

Für die Anfärbung der Projektionen der Riechsinneszellen in den olfaktorischen Bulbus standen der fluoreszente lipophile Membranfarbstoff DiI und der die olfaktorischen Axone anfärbende Zns-2 Antikörper zur Verfügung (Baier und Korsching, 1994; Berger, 1998; Celik, 2001). Da die Zns-2 Färbung für eine Quantifizierung der axonalen Strukturen zu ungleichmäßig ausfiel (nicht gezeigte Beobachtung), wurden die olfaktorischen Glomeruli anterograd mit Hilfe des zuvor etablierten Protokolls mit DiI angefärbt (vgl. 3.5.2).

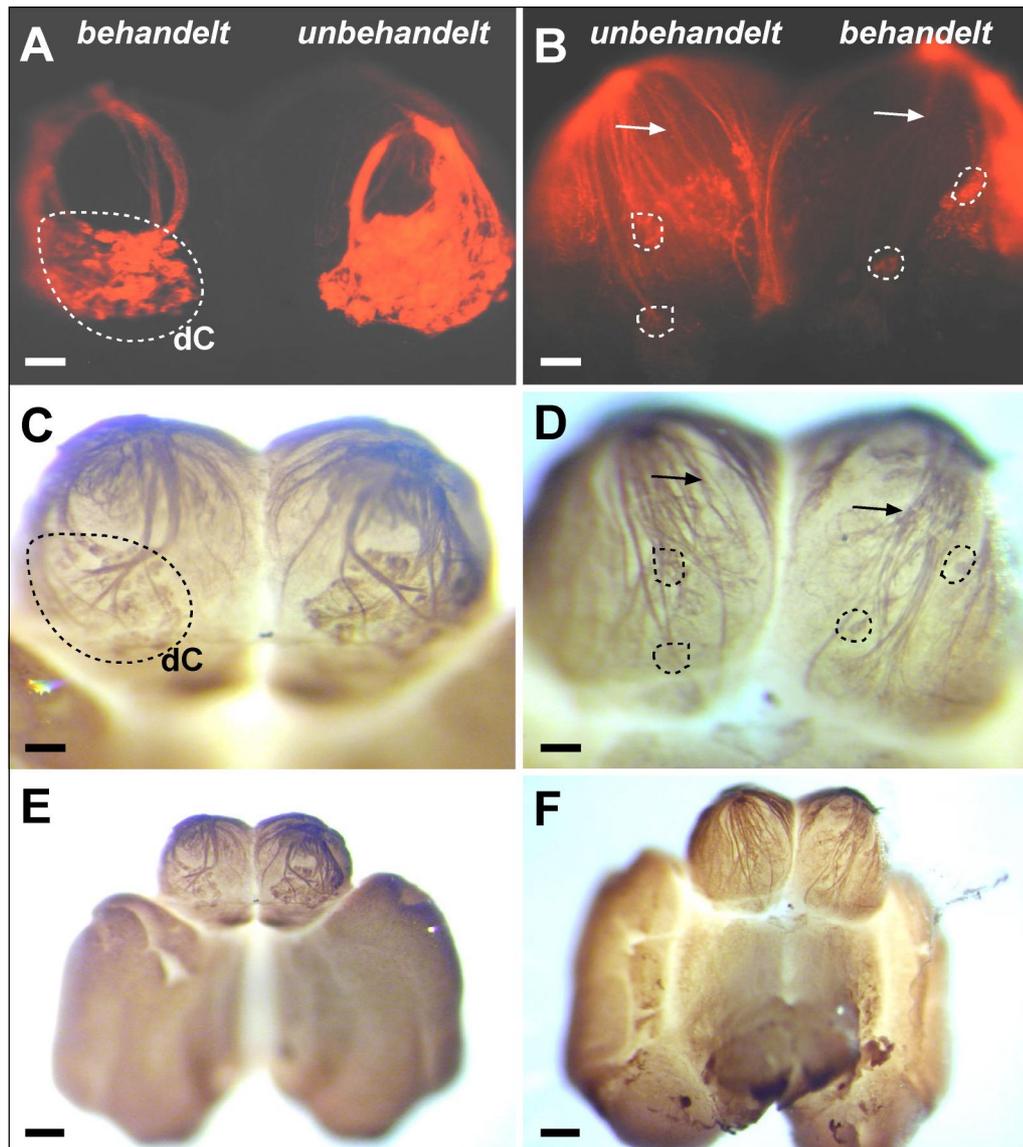


Abbildung 4-3: Färbung des glomerulären Musters mit Hilfe des „Dil-Bades“ und anschließende immunohistochemische Detektion mit dem Zns-2 Antikörper beispielhaft an Tag 3 nach Zinsulfat-Behandlung. A) und B) Dil-gefärbt. C) - F) Zns-2 Detektion. A), C), E) dorsale Ansicht, die behandelte Seite ist links. B), D), F) ventrale Ansicht, die behandelte Seite ist rechts. Pfeile: Axone, die in der immunohistochemischen Detektion intensiver als in der Dil-Färbung erscheinen; gestrichelte Linie: glomeruläre Strukturen, die mit Hilfe der Dil-Färbung besser visualisiert wurden. dC: dorsales Cluster. Der Maßstab entspricht in A) bis D) 50 µm und in E) und F) 150 µm.

Das Ausmaß der Membranfärbung hängt jedoch von der Unversehrtheit der Projektionen und von der Fähigkeit der olfaktorischen Rezeptorneuronen, Farbstoff aufzunehmen, ab. Da die Färbung als quantitativer Parameter für den Zustand der Projektionen herangezogen werden sollte, musste zunächst untersucht werden, inwieweit die Farbstoffaufnahme durch die Zinksulfat-Behandlung beeinträchtigt ist.

Sollte durch die Zinksulfat-Behandlung nur die Farbstoffaufnahme durch die Riechsinneszellen beeinträchtigt sein (z. B. durch eine lokalisierte Zerstörung der Mikrovilli oder Cilien), aber nicht ihre Projektionen in den olfaktorischen Bulbus, so würde das glomeruläre Muster mit dem Membranfarbstoff DiI nicht angefärbt werden, obwohl es vorhanden wäre. Die DiI-Färbung im olfaktorischen Bulbus wäre nicht von einer Färbung zu unterscheiden, bei der der Farbstoff nach seiner Aufnahme wegen der degenerierten Projektionen nicht bis in den Bulbus gelangt. Im Gegensatz dazu hängt die Färbung durch den Zns-2 Antikörper nicht vom axonalen Transport ab und markiert dadurch das glomeruläre Muster unabhängig von der Intaktheit der Cilien bzw. Mikrovilli (Berger, 1998). Um zu prüfen, ob die DiI-Färbung ausreichend mit dem degenerierten glomerulären Muster korreliert, wurden *whole mount* olfaktorische Bulbi drei Tage nach der Zinksulfat-Behandlung mit dem Zns-2 Antikörper immunohistochemisch markiert und mit den DiI-Färbungen verglichen (Abb. 4-3).

Die DiI-Färbung zeigte im behandelten olfaktorischen Bulbus in der ventralen und dorsalen Ansicht eine schwächere Ausprägung der glomerulären Strukturen als auf der unbehandelten Seite (Abb. 4-3A,B). Die gleiche Tendenz, jedoch schwächer ausgeprägt, wurde nach der Anfärbung mit dem Zns-2 Antikörper über das chromogene DAB-Substrat z. B. für die Glomeruli des *dorsalen Clusters* beobachtet (Abb. 4-3C,D).

Daneben wurden einige Fasern, die nur sehr schwach mit DiI detektiert werden konnten, im Nachweis mit Zns-2 Antikörpern deutlicher sichtbar (z. B. nach caudal ziehende Fasern in der medialen Region, ventrale Ansicht; Pfeile in Abb. 4-3B,D). Im Gegensatz dazu konnten glomeruläre Strukturen mit DiI besser sichtbar gemacht werden (z. B. *dorsales Cluster* und einige ventrale Glomeruli; Abb. 4-3B,D). Vermutlich ermöglichte das chromogene Substrat einen sensitiveren Nachweis schwach Zns-2-positiver Axone, während DiI an den membranreichen Terminalien besser detektiert werden kann.

Insgesamt erscheint also der Unterschied zwischen der behandelten und der unbehandelten Seite nach der DAB-Anfärbung mit Hilfe des Zns-2 Antikörpers nicht so stark ausgeprägt zu sein wie nach der DiI-Färbung. Möglicherweise befinden sich in dem untersuchten Stadium noch einige immunoreaktive, aber nicht mehr mit dem Epithel verbundene Nervenzellfortsätze, im olfaktorischen Bulbus. Sie wären durch DiI nicht anfärbbar, könnten jedoch das Zns-2 Antigen noch tragen und damit immunohistochemisch detektierbar sein. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Intensitäten, mit denen die DAB- und DiI-Färbung detektiert werden, nur schwer miteinander zu vergleichen sind, da sie nicht linear miteinander verknüpft sind.

Trotz dieser Unterschiede ähnelten sich die Befunde der immunohistochemischen Detektion und des anterograden *Tracings*. Die Farbstoffaufnahme der intakten, d.h. der in den Bulbus

projizierenden Rezeptorneuronen, wird also durch die Zinksulfat-induzierte Degeneration nur gering oder nicht beeinträchtigt.

Damit ist die DiI-Färbung ein gutes Maß für die Integrität der glomerulären Strukturen im olfaktorischen Bulbus nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration.

4.1.3 Zeitverlauf der Regeneration in Folge der Zinksulfat-vermittelten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen

Auf der Ebene des *Bulbus olfactorius* sollte mit Hilfe der DiI-Färbung untersucht werden, in welchem Umfang und zeitlichem Rahmen der afferente Teil der olfaktorischen Glomeruli durch die Behandlung der olfaktorischen Rezeptorneuronen mit Zinksulfat degeneriert und wieder aufgebaut wird. Mit diesen Informationen sollte der Zeitpunkt gefunden werden, an dem möglichst viele neu gebildete Rezeptorneuronfortsätze in den olfaktorischen Bulbus einwachsen.

Zur Analyse des regenerierenden glomerulären Musters wurden adulte *Danio rerio* (6 Monate alt; Stamm CO/CO; Geschwisterfische) an Tag null mit Zinksulfat behandelt. Jeweils zwei Tage vor Ablauf des jeweiligen Untersuchungszeitraums (3, 5, 7, 10, 14, 28 Tage) wurden sie im „DiI-Bad“ inkubiert (Ausnahme Tag 28: 1 Tag vor Analyse) und die glomerulären Strukturen im olfaktorischen Bulbus unter grüner Anregung visualisiert (Abb. 4-4). In Abbildung 4-4 ist für jeden Zeitraum ein repräsentativ gefärbtes Präparat gezeigt.

Nach drei Tagen war das mit DiI angefärbte glomeruläre Muster besonders im rostralen Teil auf der behandelten Seite reduziert und die verbliebenen olfaktorischen Glomeruli waren geringer als ihre kontralateralen Entsprechungen gefärbt (Abb. 4-4A). Relativ intensiv blieb hier der laterale aglomeruläre Plexus gefärbt. Eine vollständige Degeneration der behandelten Seite konnte in keinem Präparat beobachtet werden.

Zwei Tage später war die Gesamtintensität zwar schwächer, aber die Differenz zwischen beiden Seiten war geringer. Damit erreichte die Zinksulfat-induzierte Degeneration der glomerulären Projektion zwischen Tag null und Tag 3 ihr Maximum, denn spätere Tage zeichneten sich durch ein intensiver gefärbtes glomeruläres Muster auf der behandelten Seite aus.

Etwa ab Tag 10 waren auf der behandelten Seite wieder alle glomerulären Strukturen erkennbar, die auch auf der unbehandelten Seite detektierbar waren (Abb. 4-4D,E). Das Stadium, an dem die meisten neu gebildeten olfaktorischen Rezeptorneuronen mit ihren Axonen den Bulbus erreichten, lag vermutlich zwischen sieben und zehn Tagen nach der Behandlung. In diesem Zeitraum war der Zuwachs angefärbter Strukturen am größten.

Nach 28 Tagen war zwar die Gesamtintensität der Färbung wegen der verkürzten DiI-Verweildauer schwächer, aber die behandelten Seiten waren nicht von den unbehandelten zu unterscheiden (Abb. 4-4F). Die Degeneration war also reversibel. Nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration der Riechsinneszellen und der glomerulären Strukturen, bauten die regenerierten Rezeptorneuronen das stereotype und invariante glomeruläre Muster wieder auf.

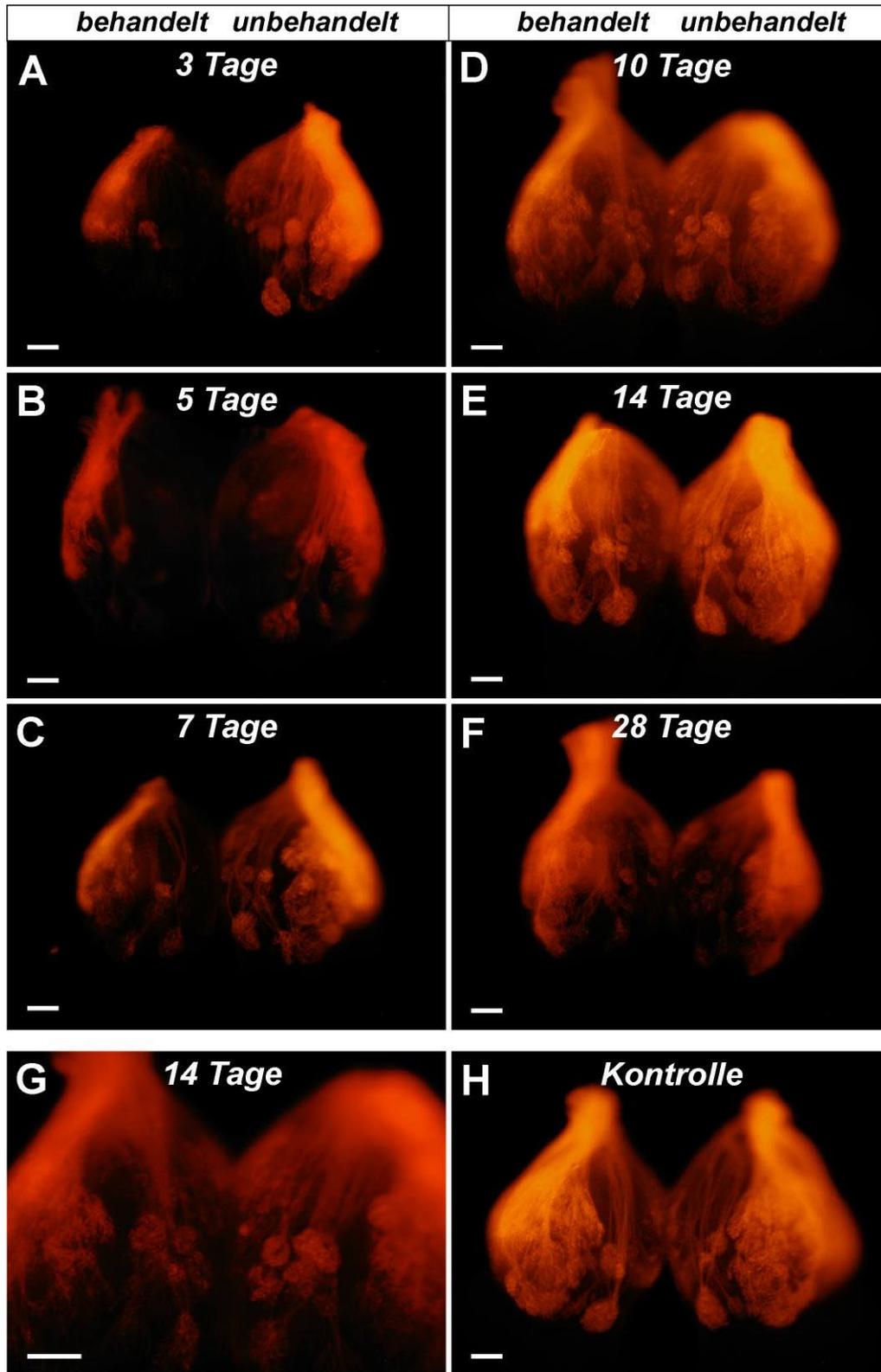


Abbildung 4-4: Zeitverlauf der Regeneration des glomerulären Musters visualisiert mit anterograder Dil-Färbung. A) 3 Tage, B) 5 Tage, C) 7 Tage, D) 10 Tage, E) und G) 14 Tage, F) 28 Tage nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration; G) unbehandelte Kontrolle. A) – F), H) 30 x Aufnahmen: 100 % geöffnete Fluoreszenzblende; G) 50 x Aufnahme: halb-geöffnete Fluoreszenzblende. Ventrale Ansichten; links: behandelte Seite; oben ist rostral. Der Maßstab entspricht in allen Bildern 100 μ m.

Dieser Befund deutet darauf hin, dass während der Regeneration im olfaktorischen Bulbus von adulten *Danio rerio* Wegfindungsmoleküle exprimiert werden, um die Axone der neu gebildeten olfaktorischen Rezeptorneuronen zu den entsprechenden Glomeruli zu leiten.

Die unilaterale Behandlung der Epithelien mit Zinksulfat wirkte sich auch auf die glomerulären Strukturen der unbehandelten Seite aus. Im Vergleich zur Kontrolle war die Färbung im rostralen Abschnitt der unbehandelten Seiten etwa bis Tag 7 schwach. Diese Beobachtung stimmte mit den Befunden (vgl. 4.1.1) im olfaktorischen Epithel überein. Möglicherweise wurde also trotz der sorgfältigen Applikation der Zinksulfat-Lösung in eine Nasengrube auch die unbehandelte Seite beschädigt. Wie stark die unbehandelten Seiten beeinflusst waren, lässt sich aufgrund der variablen DiI-Gesamtintensität nur grob etwa auf Tag 10 der behandelten Seite schätzen. Da sich die „unbehandelten“ Seiten wiederholt als „beeinflusst“ herausstellten, wurden für die Erstellung der subtrahierten cDNA-Bibliothek native olfaktorische Bulbi von Kontroll-Zebrabärblingen herangezogen.

Drei Tage nach der Zinksulfat-Behandlung waren Projektionen der Rezeptorneuronen maximal reduziert. In den folgenden Tagen wurde das glomeruläre Muster durch die neu gebildeten Rezeptorneuronen wieder aufgebaut, bis es an Tag 28 nicht mehr von der unbehandelten Seite zu unterscheiden war. Der größten Regenerationsfortschritt wurde zwischen dem siebten und zehnten Tag beobachtet.

Da die unbehandelten Seiten durch die Zinksulfat-Behandlung ebenfalls degeneriert wurden, mußten für die Gewinnung des Gewebes für die subtraktive Hybridisierung völlig unbehandelte, native, *Danio rerio* herangezogen werden.

4.1.4 Etwa acht Tage nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration ist das Einwachsen der Axone der regenerierten Rezeptorneuronen in den Bulbus maximal

Die Güte einer subtrahierten cDNA-Bibliothek hängt unter anderem von einem möglichst großen Unterschied in der Expression der differentiellen Gene ab. Unter regenerierenden Bedingungen wachsen Axone von vielen neu gebildeten Rezeptorneuronen zu ihren Zielregionen in den olfaktorischen Bulbus. Moleküle, die eine Rolle in der Wegfindung spielen, könnten zu diesem Zeitpunkt ähnlich wie bei der Entwicklung hoch reguliert sein. Für die subtrahierten cDNA-Bibliothek sollte deswegen ein Zeitpunkt gefunden werden, an dem das Einwachsen der neu gebildeten Rezeptorneuronen maximal ist. Genähert sollte hier der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem die glomerulären Strukturen zu etwa 50 % wiederhergestellt sind.

Dazu wurden digitale Aufnahmen von den ventralen Ansichten der olfaktorischen Bulbi während der Regeneration angefertigt (Abb. 4-4). Um den Einfluss des Fluoreszenz-Lichteinfalls und die Überstrahlung bzw. die Unterbelichtung zu beurteilen, wurden die Präparate von Tag 3 und 14 für eine zweite Objektposition um 180° gedreht und mit vollständig geöffneter und halb-offener Blendeneinstellung aufgenommen.

In jedem Bild wurden die Pixelintensitäten pro Seite integriert und als Quotient behandelter zu un behandelter Seite dargestellt. Eine tabellarische Aufstellung der Quotienten befindet sich im Anhang. Die DiI-Färbung wurde als direkter Parameter für die vorhandenen axonalen Strukturen und der Quotient als Maß für die Regeneration angesehen.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die un behandelten Seiten ebenfalls (in einem geringeren Umfang) durch die Zinksulfat-Behandlung degeneriert wurden (vgl. 4.1.1 und 4.1.3). Dadurch beschreibt der ermittelte Quotient den tatsächlichen Regenerationszustand als zu weit fortgeschritten. Dieser systematische Fehler ist besonders zu Beginn der Regeneration (etwa bis Tag 10) ausgeprägt, da hier die un behandelte Seite eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität als die nativen Kontrollen zeigt. Aufgrund der interindividuellen Unterschiede in der Größe der Präparate und der Färbungsqualität, konnten die olfaktorischen Bulbi aus un behandelten, nativen, *Danio rerio* nicht als Standard verwendet werden. Für die Quantifizierung der Regeneration wurde deswegen der oben beschriebene Quotient trotz seines Fehlers herangezogen.

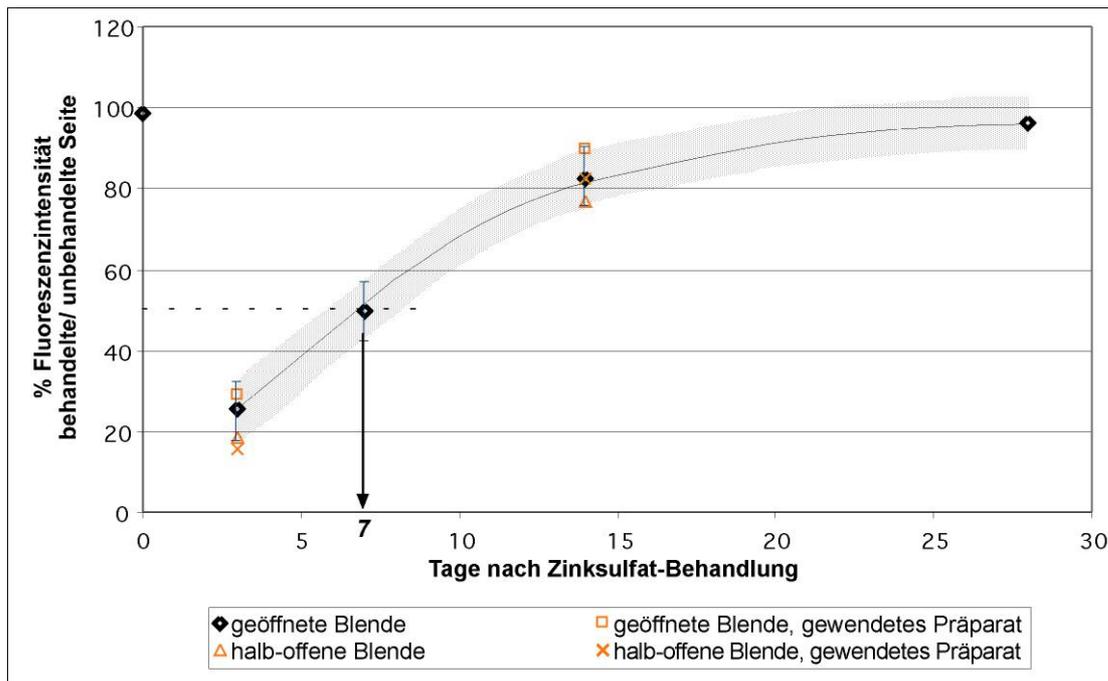


Abbildung 4-5: Regenerationskurve des glomerulären Musters. Der Quotient der aufsummierten Pixelintensitäten wurde gegen den Untersuchungszeitraum nach der Zinksulfat-Behandlung aufgetragen. Zur Kontrolle der Aufnahmebedingungen wurden die Präparate an Tag 3 und an Tag 14 in zwei verschiedenen Aufnahme- und zwei Blendenpositionen aufgenommen (siehe Legende). Die Streuung (blaue Balken) der resultierenden Regenerationsquotienten wurde auf die Regenerationskurve (dünne schwarze Linie), die mit offener Blende in Objektposition 1 erhalten wurde (schwarze Rauten), übertragen. Der schattierte Bereich gibt den daraus resultierenden experimentellen Fehlerbereich an. Der Regenerationsquotient beträgt an Tag 7 0,5.

Bei vollständig geöffneter Blende und Aufnahmeposition 1 folgte, dass der Regenerationsquotient am dritten Tag 26 %, am siebten Tag 50 % und an Tag 28 etwa 96 % betrug. Daher war das glomeruläre Muster an Tag 3 nach der Zinsulfat-Behandlung zu mehr als 75 % degeneriert, an Tag 7 zu weniger als 50 % und an Tag 28 komplett wiederhergestellt (Abb. 4-5). Eine vollständige Degeneration der glomerulären Strukturen wurde in keinem Präparat beobachtet.

Durch die verschiedenen Belichtungspositionen und die beiden Blendeneinstellungen ergaben sich für Tag 3 Regenerationsquotienten zwischen 16 und 29 % und für Tag 14 Werte zwischen 77 und 90 %. Die entsprechenden Regenerationskurven, die durch diese Quotienten angedeutet wurden, zeigten zwar den zuvor beschriebenen Verlauf (offene Blende, Aufnahmeposition 1), waren jedoch vertikal verschoben. Deutlich wurden die Auswirkungen der Blende und der Objektpositionen an Tag 14. Hier wurde in der Aufnahmeposition 2 eine fortgeschrittenere Regeneration als in Position 1 registriert, während die halbe Schließung der Blende auf ein geringeres Regenerationsniveau hinwies. Die halb-offene Blende könnte Überstrahlungen vermindert haben, aber auch einige Strukturen zu gering belichtet haben. Da es nicht möglich war, gleichzeitig die intensiv und die schwach gefärbten Strukturen quantitativ zu erfassen, wurden die verschiedenen Quotienten verwendet, um einen experimentell bestimmten Fehlerbereich zu definieren.

Neben diesem Fehlerbereich mußte bei der Bestimmung des Zeitpunktes, an dem die glomerulären Strukturen zu 50 % regeneriert waren, der systematische Fehler bei der Quotientenbestimmung berücksichtigt werden. Dazu muß die gesamte Kurve nach „rechts“ verschoben werden (Abb. 4-5), so dass der Zustand der 50 %igen Regeneration später als Tag 7 erreicht wurde. Er wurde deswegen auf Tag 8 geschätzt.

Für die Herstellung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken wurden daher olfaktorische Bulbi aus unbehandelten und aus Zebrabärblingen acht Tage nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration der Rezeptorneuronen verwendet.

4.1.5 Apoptose und Proliferation im olfaktorischen Bulbus an Tag 7 nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration

Das Ziel war es, Moleküle zu identifizieren, die speziell an der Regeneration des glomerulären Musters im olfaktorischen Bulbus beteiligt sind. Moleküle, die während der Proliferation oder der Apoptose reguliert werden, waren nicht Gegenstand des Interesses.

Um zu untersuchen, ob der Regenerationsprozess von einer erhöhten Proliferations- oder Apoptoserate, insbesondere um Tag 8, begleitet wird, wurden olfaktorische Bulbi sieben Tage nach der Zinsulfat-Behandlung im TUNEL-Assay untersucht und der PCNA-Detektion unterzogen.

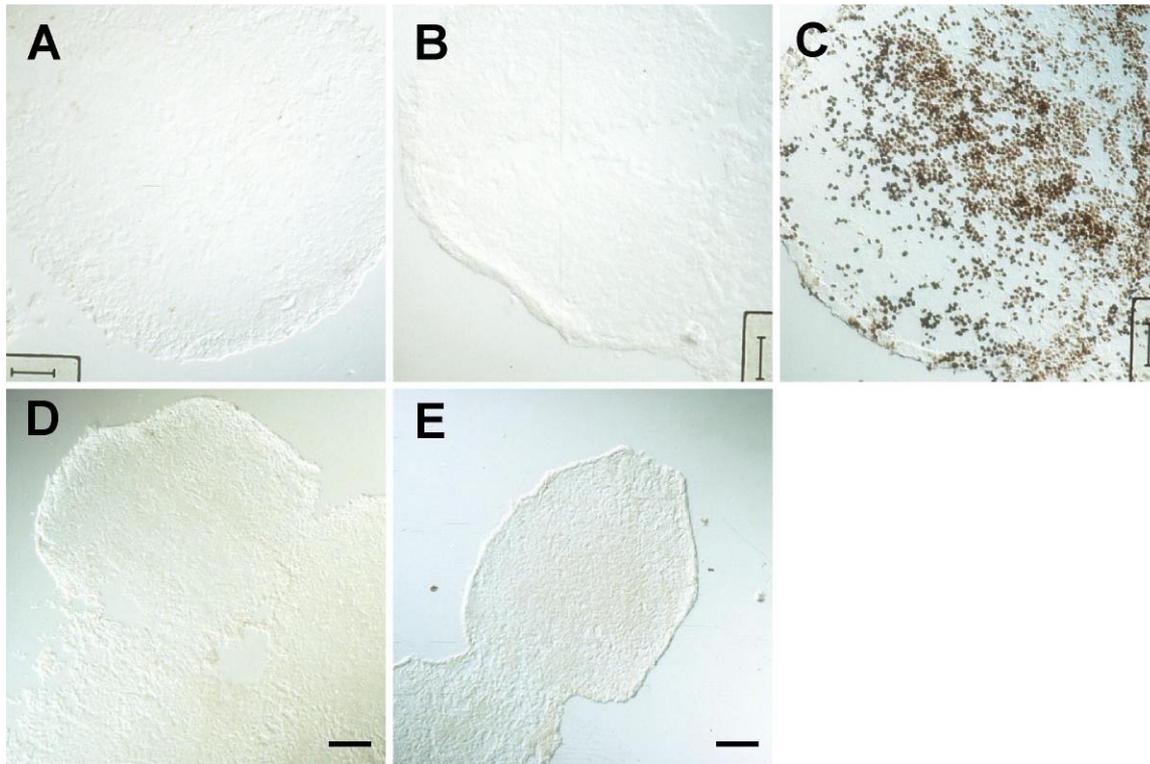


Abbildung 4-6: TUNEL-Färbung und immunohistochemische Detektion von PCNA an Gefrierschnitten des *Bulbus olfactorius* an Tag 7 nach Zinksulfat vermittelter Degeneration. A) TUNEL-Färbung an Tag 7; B) TUNEL-Färbung am *Bulbus olfactorius* aus einem unbehandelten Fisch; C) positive Kontrolle, DNase-behandelt; D) PCNA-Detektion an Tag 7; E) PCNA-Detektion am *Bulbus olfactorius* aus einem unbehandelten Zebrafisch. Der Maßstab entspricht in A) bis C) 25 µm und in D) und E) 50 µm. Die Schnitthöhe war 15 µm.

Es wurde keine erhöhte Apoptose- bzw. Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Abb. 4-6). Wie in einem nativen Bulbus konnten weniger als jeweils fünf TUNEL- oder PCNA-positive Zellen pro *Bulbus olfactorius* nachgewiesen werden.

Die olfaktorischen Bulbi acht Tage nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration sind also für die Herstellung der subtrahierten „Regenerations“-Bibliothek geeignet. Zu diesem Zeitpunkt erreichen viele Axone von neu gebildeten olfaktorischen Rezeptorzellen den olfaktorischen Bulbus, ohne dass die Proliferations- oder Apoptoserate im olfaktorischen Bulbus erhöht ist. Dadurch ist die mRNA-Expression zu dieser Zeit maximal durch die regenerierenden Projektionen geprägt und so für die Erstellung der subtrahierten cDNA-Bibliothek geeignet. Die „Regenerations“ cDNA-Bibliothek wurde hergestellt, indem diese unter regenerierenden Bedingungen gewonnenen Transkripte mit den mRNAs der „Grundexpression“ (von nativen olfaktorischen Bulbi) verglichen wurde.

4.2 Optimierung der Gewebe- und RNA-Gewinnung aus kleinen definierten Abschnitten des *Bulbus olfactorius* für die Erstellung subtrahierter cDNA-Bibliotheken

Zur Identifizierung von im olfaktorischen Bulbus räumlich regulierten mRNAs, wurden die Transkriptgemische des lateralen und des medialen Bulbusabschnitt miteinander verglichen. Der Vergleich dieser beiden Abschnitte wurde favorisiert, da sie sich morphologisch und funktionell deutlich voneinander unterscheiden.

Der lateralen Detektion der Aminosäuren im aglomerulären Plexus stehen medial die Gallensäure- und Pheromon-aktivierten Glomeruli gegenüber. Diese strikte räumlich Teilung sollte molekular durch die Expression von verschiedenen Wegfindungsmolekülen oder von den gleichen Molekülen in Konzentrationsgefällen widergespiegelt werden. Alle Axone der Aminosäuren-detektierenden Neuronen sollten von der lateralen Region angezogen oder/und von der medialen Region abgestoßen werden, während die Verteilung der Kräfte für die Gallensäuren-detektierenden neuronalen Fortsätze genau invertiert sein sollte.

Darüber hinaus haben sich im Verlauf dieser Studie die Hinweise verdichtet, dass der laterale aglomeruläre Plexus in einigen Aspekten dem akzessorischen Bulbus der höheren Vertebraten entspricht (vgl. 2.4.2). Ein Vergleich des lateralen und des medialen Abschnitts würde daher einem Vergleich des akzessorischen mit dem olfaktorischen Bulbus entsprechen. Unter den identifizierten Transkripten sind deswegen auch Moleküle zu erwarten, die Subregion-spezifisch exprimiert werden und die Aufschluss über die funktionelle Besonderheit der lateralen Region geben könnten.

Für die Identifizierung von Transkripten, die im lateralen Bulbusabschnitt vermehrt exprimiert werden, wurde eine „laterale“ cDNA-Bibliothek hergestellt, in der die Transkripte aus den medialen Bulbuskappen von denen aus den lateralen subtrahiert wurden. Entsprechend wurde die „mediale“ cDNA-Bibliothek hergestellt.

Um die subtrahierten cDNA-Bibliotheken zu konstruieren, wurde hier zunächst eine Methode entwickelt, die es erlaubte, intakte RNA aus äußerst kleinen, definierten Geweberegionen zu gewinnen und zu amplifizieren.

4.2.1 Die Gefriereinbettung in TissueTek® ermöglicht die zuverlässige Gewinnung der lateralen und medialen Kappen des *Bulbus olfactorius* und die Isolierung intakter RNA

Für die Herstellung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken, die mit lateral bzw. medial exprimierten Sequenzen angereichert sind, wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, mit dem Gesamt-RNA aus der lateralen und aus der medialen Region (bzw. „Kappe“) des *Bulbus olfactorius* gewonnen werden kann. Dabei sollten die beiden Fraktionen keine gemeinsamen Gewebeanteile besitzen, um die größtmöglichen Unterschiede in den Expressionsstufen detektieren

zu können. Das gewählte Verfahren zur Gewebeisolierung musste jedoch auch die Isolierung von intakter RNA ermöglichen, da sie die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Subtraktion ist (Clontech Laboratories, 1997).

Da der *Bulbus olfactorius* von *Danio rerio* mit einem Durchmesser von weniger als 0,5 mm keine direkte Präparation der „lateralen“ und „medialen“ Region erlaubte, wurden verschiedene Einbettungs- und RNA-Isolierungsvarianten ausprobiert.

Die Einbettung der Präparate in 15 bis 50 % (w/v) Gelatine mit oder ohne anschließende PFA-Fixierung, ließ die Isolierung von intakter RNA (PFA-Fixierung) oder ein Schneiden in definierter Orientierung (ohne PFA-Fixierung) am Vibratom nicht zu.

Beides konnte jedoch mit der Einbettung in das Gefriermedium TissueTek® und dem anschließenden Schneiden am Kryostaten erfüllt werden. Für die Gewinnung der lateralen und medialen Abschnitte bzw. Kappen des *Bulbus olfactorius* wurden daher gefrorene Schnitte gesammelt (vgl. 3.3.2).

Zur Entwicklung eines optimierten Protokolls für die RNA-Isolierung aus Gefrierschnitten wurde RNA unter verschiedenen Bedingungen aus in TissueTek® eingebettetem Gehirn von *Danio rerio* isoliert.

Die RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen; vgl. 3.7.3) war nicht möglich, weil die Membran der RNeasy Säulchen durch das TissueTek® verklebt wurde. Dahingegen konnte RNA mit einem modifizierten TriReagent® RNA-Isolierungsprotokoll (vgl. 3.7.3) in einem Maßstab gewonnen werden, der die elektrophoretische Auftrennung erlaubte und so eine Beurteilung der Integrität zuließ. Eine kritische Variable bei der Gewinnung intakter RNA aus TissueTek® eingebetteten Präparaten war die Verwendung von einer ausreichenden Menge TriReagent® (Abb. 4-7).

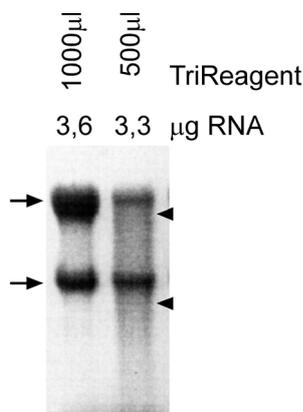


Abbildung 4-7: Northern Blot Membran mit Gesamt-RNA von eingefrorenem Gehirn, das in TissueTek® eingebettet wurde. Die RNA wurde mit TriReagent® isoliert (vgl. 3.7.3), auf Hybond N-Membran gebロットet und mit Methylenblau angefärbt (vgl. 3.9.3). Spur 1: 3,6 µg RNA aus 25 mg Gehirn in 1000 µl TriReagent® homogenisiert. Die intakte RNA zeichnet sich durch eine 28S rRNA-Bande aus, die intensiver als die 18S rRNA Bande ist (Pfeile). Spur 2: 3,3 µg RNA aus 25 mg Gehirn in 500 µl TriReagent® homogenisiert. Die teilweise degradierte RNA zeigt eine schwächere 28S Bande und Abbauprodukte (Pfeilköpfe).

Aus einem Milligramm Gehirn wurden unter optimalen Bedingungen 0,6 bis 0,8 µg Gesamt-RNA gewonnen. Für eine gelelektrophoretische Analyse war die RNA (3 bis 4 µg) aus einem Gehirn (5 bis 6 mg) ausreichend. Die erreichte Ausbeute betrug etwa 50 % der Menge, die für Gehirngewebe erwartet wurde (Chomczyinski, 1993). Eine Ursache könnte in der geringen

Größe und damit in einem ungünstigeren Verhältnis von Oberflächenstrukturen zu zellreicheren, inneren Strukturen liegen. Eine unvollständige Homogenisierung könnte ebenfalls zu einer geringeren Ausbeute führen; sie ist jedoch aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ausbeute unwahrscheinlich.

4.2.2 Aus in TissueTek® eingebetteten kompletten *Bulbi olfactorii* wird mit dem „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ intakte cDNA amplifiziert

Die RNA-Isolierung aus einigen kompletten *Bulbi olfactorii* sollte die Reaktionsbedingungen prüfen und einen Anhaltspunkt über die Anzahl der lateralen und medialen Bulbusabschnitte geben, die für die Konstruktion der subtrahierten cDNA-Bibliothek benötigt wurden.

Von den 32 olfaktorischen Bulbi wurden jeweils acht in 1000 µl TriReagent® homogenisiert, aufgearbeitet (vgl. 3.7.3) und die resultierende RNA gemeinsam zur Synthese des Erststranges der cDNA eingesetzt (vgl. 3.10.2). Unter der Annahme, dass der cDNA-Synthese etwa 0,1 µg Gesamt-RNA zu Grunde lagen, wurde 1/5 des resultierenden RNA/ cDNA-Hybridgemisches für die cDNA-Amplifikation und zur Optimierung der Zykluszahl verwendet (Abb. 4-8).

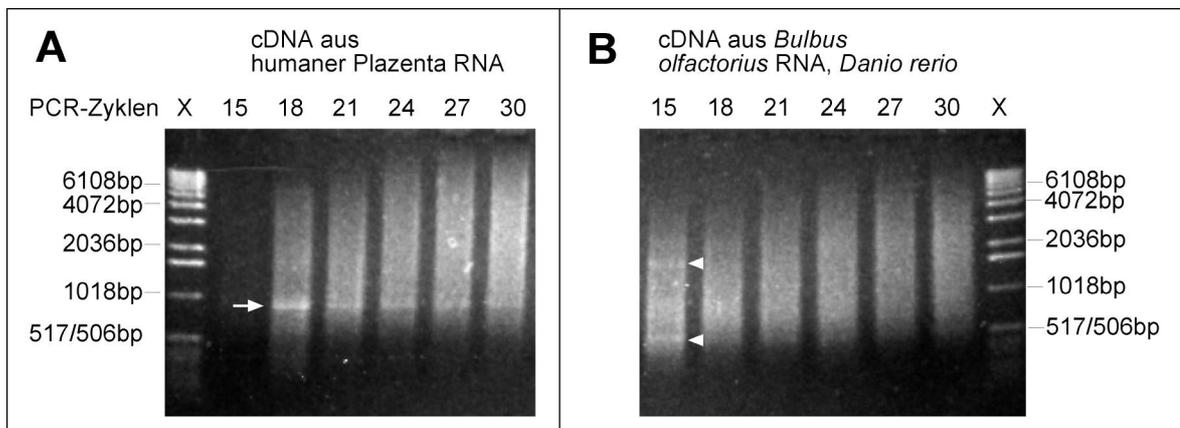


Abbildung 4-8: Analyse zur Integritätsabschätzung der cDNA und zur Optimierung der PCR-Parameter. 5 µl PCR-Produkt wurden nach verschiedenen PCR-Zyklen aus dem Reaktionsansatz entnommen und auf einem 1,2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Standard: 0,5 µg von Marker X. A) Amplifikation der Kontroll cDNA aus humaner Plazenta. Der Pfeil zeigt die für Plazenta cDNA charakteristische 900 bp Bande. Die optimale PCR-Zykluszahl in diesem Experiment war 17. B) Amplifikation der cDNA aus kompletten *Bulbi olfactorii*. Die optimale Zykluszahl in diesem Experiment lag bei 14 Zyklen. Pfeilköpfe: distinkte Banden innerhalb der cDNA-Verteilung.

Die Verteilung der Kontroll cDNA von 0,4 bis 6 kb war typisch für cDNA, die aus Säugetieren stammt (Abb. 4-8A). Die cDNA aus *Danio rerio* verteilte sich über 0,3 bis 5 kb in einer für Nicht-Säugetiere typischen Größenverteilung (Molecular Research Center, 1997) und zeigte nach 15 Zyklen bei 0,5 und 1,7 kb jeweils eine Bande (Abb. 4-8B). Die distinkten Banden und die Größenverteilung wiesen auf die Synthese kompletter cDNA aus intakter RNA hin.

Für die cDNA der Kontrolle wurde eine optimale Zykluszahl von 17 Runden erreicht. Nach Zyklus 21 kam es zur „Überzyklisierung“ der cDNA, die sich in einer Verschiebung der PCR-Produkte in den höhermolekularen Bereich manifestierte (Abb. 4-8A). Die Amplifikation der cDNA aus den *Bulbi olfactorii* hatte ihr Plateau nach 15 Zyklen erreicht, so dass hier nach 14 Zyklen die cDNA intakt und in größtmöglicher Amplifizierung, also unter optimalen Bedingungen, vorlag (Abb. 4-8B; vgl. 3.10.4).

4.2.3 Die Anzahl der für eine erfolgreiche cDNA-Amplifikation benötigten *Bulbus olfactorius* Kappen konnte abgeschätzt werden

Die Anzahl der benötigten *Bulbi olfactorii* wurde unter der vereinfachten Annahme, die *Bulbi olfactorii* seien Kugeln mit einem Radius von 250 μm , abgeschätzt.

Das Volumen eines kompletten *Bulbus olfactorius* mit einem Radius von 250 μm ist etwa zehnmal so groß wie das Volumen eines 100 μm hohen äußeren Bulbusabschnitts (Abb. 4-9). Vereinfacht wurde davon ausgegangen, dass zehnmal mehr Bulbuskappen als Bulbi für die Isolierung der gleichen Menge RNA benötigt werden. Im Vorexperiment wurde für cDNA aus 32 olfaktorischen Bulbi eine optimale Zykluszahl von 14 ermittelt. Bei einer Steigerung der Zyklen auf 17 oder mehr, könnte eine 8-fach geringere Menge Ausgangsmaterial eingesetzt werden (etwa 37 Bulbuskappen pro Seite). Da jedoch die zellarmen glomerulären Strukturen im Randbereich der olfaktorischen Bulbi liegen, wurden jeweils 50 bis 100 *Bulbi olfactorii* für die Gewinnung der lateralen und der medialen Abschnitte angestrebt.

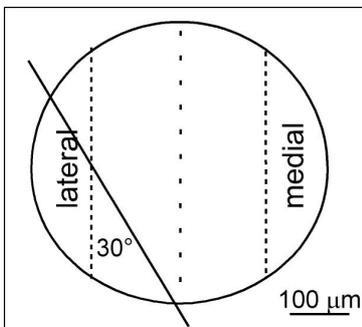


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der medialen und lateralen Bulbuskappe als Kugelabschnitte. Ein 100 μm tiefes Einschnitten in Kugeln mit einem Radius von 250 μm erlaubt einen Fehlwinkel von 30°; ohne dass sich die beiden entgegengesetzten gelegenen Kugelabschnitte überlappen.

Mit der Gefriereinbettung und dem -schneiden der olfaktorischen Bulbi war die definierte und RNA schonende Gewinnung der lateralen und medialen Bulbuskappen möglich. Aus den gefrorenen Gewebeschnitten konnte intakte RNA isoliert werden. Da die Gewebemenge sehr gering war, konnte aus der gewonnenen RNA keine ausreichende Menge cDNA für die Herstellung der cDNA-Bibliotheken gewonnen werden. Deswegen wurde die synthetisierte cDNA amplifiziert. Um eine gleichmäßige Amplifizierung von allen Transkriptspezies zu erreichen, wurden pro Gewebefraktion 50 bis 100 Bulbuskappen oder 5 bis 10 komplette olfaktorische Bulbi benötigt.

Für die Konstruktion der subtrahierten „lateralen“ und „medialen“ cDNA-Bibliotheken waren daher also für die RNA-Gewinnung 50 bis 100 gefriereingebettete Bulbuskappen je Seite notwendig.

4.3 Bereitstellung von cDNA für die subtraktive Hybridisierung mit Hilfe des „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits“ (Clontech)

Für die subtraktive Hybridisierung werden von jeder Fraktion 2 µg cDNA benötigt. Da diese cDNA-Menge nicht aus der zur Verfügung stehenden mRNA-Menge unmittelbar gewonnen werden konnte, wurde die cDNA amplifiziert. Dazu wurde das „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ (Clontech, Heidelberg) verwendet, da es cDNA ausgehend von 50 ng Gesamt-RNA amplifizieren kann. Die Mengenverhältnisse in der cDNA-Mischung entsprechen dabei weitgehend denen der mRNA (Endege *et al.*, 1999). Für die Herstellung der cDNA-Bibliotheken ist die Beibehaltung der Mengenverhältnisse in den amplifizierten cDNA-Gemischen wichtig, denn artifizielle Verschiebungen können differentiell exprimierte Transkripte maskieren und gleichmäßig exprimierte mRNAs differentiell erscheinen lassen. Um eine Verschiebung der Mengenverhältnisse zu vermeiden und vollständige cDNAs zu amplifizieren, müssen alle cDNAs unter optimalen Bedingungen amplifiziert werden. Ein besonders kritischer Parameter ist die Anzahl der PCR-Runden, mit denen die cDNA Erststrang-Gemische amplifiziert werden. Ist sie zu gering, wird nur wenig PCR-Produkt gewonnen, ist sie dagegen zu hoch, kommt es zur Überzyklisierung, d.h. zu einer unspezifischen Bildung von kleineren Abbruchprodukten und verlängerten cDNA-Fragmenten (vgl. 3.10.4).

4.3.1 Gewinnung von Gesamt-RNA

Nach der Ermittlung des geeigneten Zeitpunktes im Verlauf der Regeneration bzw. einer geeigneten Methode zur Isolierung der lateralen und medialen Bulbusabschnitte, wurde mRNA aus den entsprechenden olfaktorischen Bulbi oder Bulbusabschnitten isoliert.

Gesamt-RNA wurde für die subtrahierte „Regenerations“-cDNA-Bibliothek aus olfaktorischen Bulbi an Tag 8 nach der Zinksulfat-induzierten Degeneration und von unbehandelten *Danio rerio* gewonnen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Bulbi olfactorii* von behandelten Fischen wurden die linken olfaktorischen Bulbi (degenerierte Seite) von zehn adulten Zebrabärblingen an Tag 8 nach der Zinksulfat-Behandlung verwendet. Die mRNA der Kontrolle wurde aus olfaktorischen Bulbi von fünf unbehandelten Geschwisterfischen gewonnen. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von TriReagent® isoliert (vgl. 3.7.3).

Gesamt-RNA wurde für die „laterale“ und „mediale“ subtrahierte cDNA-Bibliothek aus den in TissueTek® eingebetteten lateralen und medialen Kappen des *Bulbus olfactorius* gewonnen
Insgesamt wurden für Gewinnung des lateralen Gewebes 91 und für die des medialen Gewebes 90 *Bulbi olfactorii* verwendet (vgl. 3.3.2). Obwohl einige der 20 µm tiefen Schnitte verloren gingen, waren beide Gewebefractionen bezogen auf die Schnittpositionen der enthaltenen Schnitte gleichwertig.

4.3.2 cDNA wurde mit Hilfe des „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits“ synthetisiert und amplifiziert

Für die subtraktive Hybridisierung sollten 2 µg cDNA pro Fraktion eingesetzt werden. Aus dem olfaktorischen Bulbus mit einem Durchmesser von 0,5 mm konnte jedoch nur sehr wenig mRNA gewonnen werden, so dass die Präparation von einigen Hundert olfaktorischen Bulbi notwendig gewesen wäre. Stattdessen wurde cDNA aus 10 kompletten olfaktorischen Bulbi oder 90 Bulbuskappen gewonnen und nach der cDNA-Synthese amplifiziert (vgl. 3.10.3).

Zur Amplifizierung der Regenerations- und der Kontroll-cDNA wurden 1/40 des cDNA/RNA-Hybridgemisches eingesetzt und für die cDNA aus den lateralen und medialen Abschnitten jeweils 1/5. Die optimale Zykluszahlen für die Amplifizierungen wurden bestimmt, indem nach 9 PCR-Runden und nach jeden weiteren drei Runden 10 µl PCR-Produkt entnommen und elektrophoretisch analysiert wurden. Beispielhaft zeigt Abbildung 4-10 die Optimierung der Zykluszahl für die cDNA aus dem lateralen und medialen Abschnitt des olfaktorischen Bulbus.

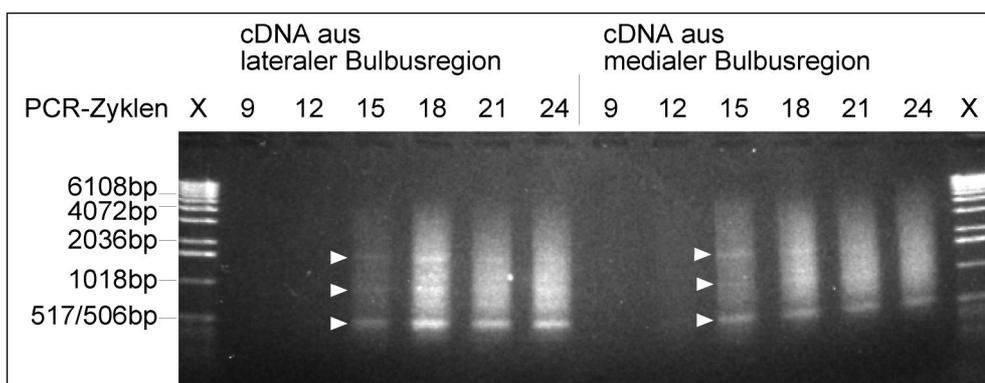


Abbildung 4-10: Analyse zur Optimierung der PCR-Parameter für die cDNA, die aus dem lateralen und medialen Abschnitt des olfaktorischen Bulbus gewonnen wurde. 10 µl PCR-Produkt wurden nach 9, 12, 15, 18, 21 und 24 PCR-Runden auf einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Pfeilspitzen: distinkte Banden innerhalb der cDNA Population.

Die resultierende cDNA-Population erstreckte sich ähnlich wie die cDNA vom kompletten *Bulbus olfactorius* von 0,3 kb bis zu 5 kb (Molecular Research Center, 1997; vgl. 4.3.2). Die Banden waren am intensivsten nach 18 Zyklen zu erkennen. Die optimale Zykluszahl wurde auf 14 festgelegt. Sie war sehr vorsichtig geschätzt und führte nach der Reinigung der PCR-Produkte (vgl. 3.11.2) und bei den folgenden Schritten dazu, dass sich die Menge der PCR-Produkte an den unteren Nachweisgrenzen der Analysen bewegten.

Für die cDNA, die aus olfaktorischen Bulbi unter regenerierenden Bedingungen gewonnen wurde, wurde eine optimale Zykluszahl von 18 ermittelt. Unter diesen Bedingungen konnten etwa 10 ng/ µl intakte cDNA in einem 100 µl Reaktionsansatz gewonnen werden. Die Kriterien für die „optimale Zykluszahl“ sind unter 3.10.3 beschrieben.

Die amplifizierte cDNA-Population aus den lateralen Bulbuskappen wird im folgenden verkürzt *Lateral* genannt und die aus den medialen verkürzt *Medial*. Entsprechend wird für die cDNA-Population aus den Kontroll Bulbi die Bezeichnung *Kont* und für cDNA, die aus den regenerierenden Bulbi gewonnen wurde, *Reg* verwendet.

Die cDNA-Gemische (*Lateral*, *Medial*, *Reg*, *Kont*), die für die Herstellung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken erforderlich waren, wurden damit gewonnen.

4.4 Erstellung der subtrahierten cDNA Bibliotheken mit Hilfe des „CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits“

In einer subtrahierten cDNA-Bibliothek sind die cDNA-Fragmente angereichert, die mit mRNAs korrespondieren, die in höherer Konzentration in dem „Tester“ als in dem „Driver“ cDNA-Gemisch vorliegen.

Für die Herstellung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken mit Hilfe der *Suppression* subtraktive Hybridisierung (SSH) wird die „Tester“ cDNA-Population zunächst in zwei Fraktionen geteilt. Anschließend wird die eine Hälfte mit Adapter 1 und die andere mit Adapter 2R ligiert. Beide Adapter-ligierten „Tester“ cDNA-Fragment Gemische werden separat mit einem Überschuß „Driver“ cDNA-Fragmenten hybridisiert. Dabei bleiben differentiell verteilte „Tester“ cDNA-Fragmente vermehrt einzelsträngig. Nach der Vereinigung von beiden Hybridisierungsansätzen können diese Fragmente Hybride bilden, die sich durch zwei unterschiedliche Adaptoren auszeichnen. Dadurch werden sie als einzige Hybridspezies in den anschließenden *Suppression* subtraktive PCR-Reaktionen (SS-PCR) exponentiell amplifiziert und so in der resultierenden subtrahierten cDNA-Bibliothek angereichert.

Das experimentelle Vorgehen für die Herstellung der subtrahierten cDNA-Bibliotheken ist unter 3.11 ausführlich beschrieben.

Zwei Schritte in dem Verfahren gelten als besonders kritisch: die Ligation der Adaptoren und die SS-PCR. Beide Reaktionen werden deswegen in sogenannten Effizienztests überprüft. An deren Ergebnis wird dann entschieden, ob die Konstruktion der cDNA-Bibliothek fortgesetzt werden kann oder ob der Reaktionsschritt wiederholt werden muss.

4.4.1 Für den Einsatz in die subtraktive Hybridisierung werden die cDNAs in kleinere Fragmente gespalten und mit Adaptoren ligiert

Die Spaltung der cDNA-Gemische (*Lateral*, *Medial*, *Reg* und *Kont*) entfernt die Adaptoren, die für die cDNA-Amplifikation benötigt wurden, und erzeugt kleinere cDNA-Fragmente, die für die Subtraktion vorteilhaft sind und die Ligation von neuen Adaptoren ermöglichen (vgl. 3.11.2). Die Adapterligationen an einen Teil der gespaltenen cDNAs führt zur Bildung von „Tester“ cDNA (*Lateral_T*, *Medial_T*, *Reg_T* und *Kont_T*) und von nicht-ligierter „Driver“ cDNA (*Lateral_D*, *Medial_D*, *Reg_D* und *Kont_D*).

Zur Kontrolle der *RsaI*-Spaltung wurden Aliquots der gereinigten cDNA-Populationen *Reg* und *Kont* vor und nach der *RsaI*-Inkubation über ein 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Nach der Spaltung war der Molekulargewichtsbereich auf 0,2 bis 2,0 kb gesunken, so dass von einer erfolgreichen Reaktion ausgegangen wurde (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Reinigungs- und Konzentrierungsschritten, in denen Verluste bis zu 70 % tolerierbar sind, sank die cDNA-Ausbeute auf 35 bis 45 %.

Da in die Aufarbeitung für *Lateral* und *Medial* zu Beginn nur sehr wenig Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, waren auf den Gelen nur schwache Banden zu erkennen, die eine Abschätzung der Ausbeute nicht zuließen. Die Größe der Fragmente lag zwischen 0,2 und 1,0 kb.

Nach der Reinigung der cDNA-Spaltprodukte wurde ein Teil der lateralen, der medialen, der Regenerations- und der Kontroll-cDNA in jeweils drei getrennten Reaktionsansätzen mit Adapter 1, mit Adapter 2R und mit einer äquimolaren Mischung aus beiden Adaptoren ligiert (vgl. 3.11.2). Der letztgenannte Ansatz wurde zur Kontrolle der experimentellen Subtraktionen herangezogen. Die Effizienz der Ligation für die beiden ersten Ansätze wurde in einer semiquantitativen PCR-Reaktion bestimmt (vgl. 3.11.2; Abb. 4-11A). Hier werden die PCR-Produkte, die mit zwei *Danio rerio* β -Aktin spezifischen Primern erhalten werden, denen gegenübergestellt, die mit einem β -Aktin spezifischen und einem Adapter-spezifischen Primer erhalten werden. Exemplarisch ist die Ligationseffizienzanalyse für *Lateral_T*- und *Medial_T*-cDNA dargestellt (Abb. 4-11B). Die Ligationseffizienz für die parallel bearbeitete Kontrolle (Muskel/ ϕ X174; vgl. 3.11.2) wird mit dem gleichen Verfahren über die Spezies-spezifischen Primer G3PDH3' und G3PDH5' überprüft.

Die Ligrationsanalyse des Muskel/ ϕ X174 „Testers“ führte mit der G3PDH3'/G3PDH5' und der G3PDH3'/PCRPrimer1 Primerkombination zu etwa gleich intensiven PCR-Produkt Banden. Die gleiche Fluoreszenzintensität der Banden bei 500 bp und 750 bp zeigte, unter Berücksichtigung der verschiedenen Fragmentmassen, dass die Ligationen der *Kontroll Muskel/ ϕ X174_{T-1}* und *-2* zu ca. 65 % erfolgreich waren. Während der Adapter 2R zu etwa 75 % an die cDNA-Fragmente von *Lateral_{T-2}* ligierte, konnte für die Ligation von Adapter 1 nur eine 30 %-ige Effizienz festgestellt werden (*Lateral_{T-1}*). Die *Medial_{T-2}* cDNA Fragmente wurden mit Adapter 2R zu rund 50 % und mit Adapter 1 zu etwa 75 % ligiert.

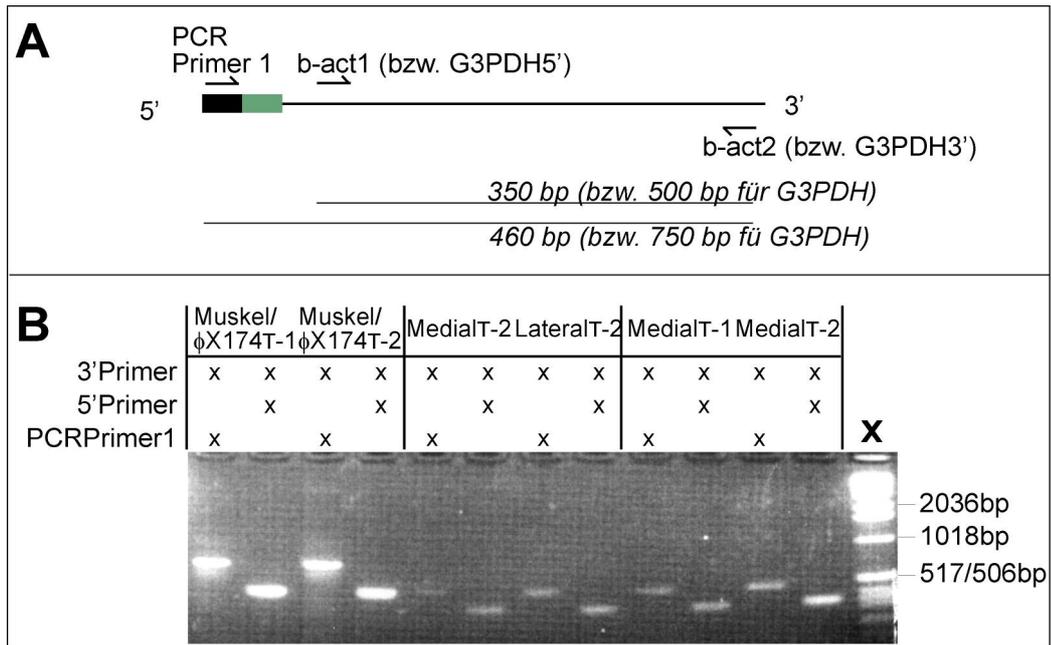


Abbildung 4-11: Ligationseffizienzanalyse am Beispiel der experimentellen „Tester“ *Medial_{T-1}* und *Medial_{T-2}*, *Lateral_{T-1}* und *Lateral_{T-2}*. A) Schematische Darstellung der Primerkombinationen; mit b-act1/b-act2 wird eine 350 bp und mit b-act2/PCR Primer 1 eine 460 bp Bande erwartet. Analog dazu werden mit G3PDH3', G3PDH5' und PCR Primer 1 eine 500 bp und eine 750 bp Bande erwartet. B) Ligationseffizienzanalyse von *Medial_{T-1}* und *Medial_{T-2}*, *Lateral_{T-1}* und *Lateral_{T-2}* sowie der Kontroll „Tester“ *Muskel/ ϕ X174T-1* und *Muskel/ ϕ X174T-2*. 3'Primer: b-act2 bzw. G3PDH3'; 5'Primer: b-act1 bzw. G3PDH5'.

Für die Ligationen der *Reg_T* und *Kont_T* an die Adapter 1 und 2R wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch überprüft und fluoreszenzphotometrisch vermessen. Es wurden Effizienzen zwischen 40 und 50 % bestimmt.

Die angestrebten und für eine erfolgreiche Subtraktion erforderlichen 25 % Ligationseffizienz wurden in allen Kombinationen erreicht.

4.4.2 In zwei subtraktiven Hybridisierungen und zwei „Suppression“ PCRs wird β -aktin in den subtrahierten Bibliotheken reduziert

In der ersten Hybridisierungsrunde wurden die „Tester“ cDNA-Populationen separat mit den zugehörigen „Driver“ cDNAs denaturiert und hybridisiert (vgl. 3.11.3). Für die zweite Hybridisierungsrunde wurden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung (z.B. *Medial_{T-1}/Lateral_D* und *Medial_{T-2}/Lateral_D*) miteinander vermischt und gleichzeitig mit frisch denaturiertem „Driver“ versetzt (vgl. 3.11.3). Aliquots der resultierenden Subtraktionen wurden zur Bildung der cDNA-Bibliotheken und *Muskel/ ϕ X174-Bib* amplifiziert (vgl. 3.11.4). Die nicht-subtrahierten Kontroll Bibliotheken *Lateral-C*, *Medial-C*, *Reg-C*, *Kont-C* und *Muskel/ ϕ X174-C* wurden von den entsprechenden Ligationsansätzen ausgehend exponentiell vermehrt (vgl. 3.11.4).

Erste und zweite Suppressions-PCR

Für die Überprüfung der Reaktionsbedingungen wurden zwei Kontrollen vom Hersteller des „CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kits“ (Clontech, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die subtraktive Hybridisierung wurde durch die Verwendung synthetisch differentieller cDNA getestet (vgl. 3.11.2; Muskel/ ϕ X174 cDNA-Bibliothek). Die Reaktionsbedingungen während der Amplifikation wurde durch die Mitamplifikation einer vom Hersteller bereits erfolgreich subtrahierten cDNA getestet (vgl. 3.11.4; „PCR Control Subtracted cDNA“).

Bei einer elektrophoretischen Auftrennung (2 % Agarosegel) der *Hae III*-verdauten ϕ X174 Phagen-DNA wurden sechs Fragmente sichtbar (nicht gezeigt). Die beiden kleinsten Fragmente waren in der Kontrolle der Hybridisierungsbedingungen (Abb. 4-12, Spur 1; Muskel/ ϕ X174 Bibliothek) nicht zu detektieren, was auf die geringere DNA-Konzentration und auf den *Suppressions* Effekt der PCR bezüglich kleineren Fragmenten zurückzuführen war. In der Kontrolle der Amplifikationsbedingungen (Abb. 4-12, Spur 2; „PCR Control Subtracted cDNA“) wurde eine Bande in dem Bereich, in dem die beiden kleinen Fragmente erwartet werden, detektiert. Da die kleinen Fragmente in einer erfolgreich subtrahierten cDNA des Herstellers ebenfalls nicht vorhanden sind (Clontech Laboratories, 1997), wurden beide cDNA-Bibliotheken als „erfolgreich subtrahiert“ eingestuft. Die PCR-Bedingungen und die subtraktive Hybridisierung waren demnach geeignet, subtrahierte cDNA-Bibliotheken zu generieren.

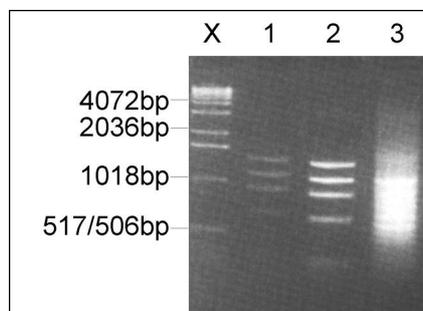


Abbildung 4-12: Produkte der ersten *Suppression* PCR von den Kontrollen *Muskel/ ϕ X174-Bib* (Spur 1), „PCR Control Subtracted cDNA“ (Spur 2), und *Muskel/ ϕ X174-C* (Spur 3). *Muskel/ ϕ X174-Bib* wurde parallel mit *Lateral-Bib*, *Medial-Bib*, *Reg-Bib* und *Kont-Bib* hybridisiert und amplifiziert und stellt damit eine gute Kontrolle für diese subtrahierten cDNA-Bibliotheken dar (vgl. 3.11.2). In dieser Bibliothek sollten die Produkte von *HaeIII*-gespaltenem ϕ X174-Phagen angereichert sein (1,3 kb, 1,1 kb, 0,9 kb, 0,6 kb, 0,3 kb und 0,2 kb). *Muskel/ ϕ X174-C* ist die nicht-subtrahierte Kontrolle der *Muskel/ ϕ X174-Bib*. Die „PCR Control Subtracted cDNA“ ist eine vom Select-Kit Hersteller zur Verfügung gestellte erfolgreich subtrahierte *Muskel/ ϕ X174-Bib* (vgl. 3.11.4) Die resultierenden *HaeIII*-Spaltprodukte des ϕ X174-Phagen zeigen, dass die Hybridisierungs- und die Amplifikationsbedingungen geeignet waren, um subtrahierte cDNA-Bibliotheken herzustellen.

Als Beispiel für primäre und sekundäre PCR-Produkte der experimentellen subtrahierten cDNA-Bibliotheken zeigt Abbildung 4-13 die Amplifikation von *Lateral-Bib* und *Medial-Bib*. In den Produkten der sekundären PCR waren einzelne Banden innerhalb der cDNA-Populationen zu erkennen, die eine erste Beurteilung der Subtraktion erlaubten. Im Vergleich der subtrahierten Bibliotheken zu ihren nicht-subtrahierten Kontrollen fiel in *Lateral-C* eine 500 bp-Bande auf, die in der *Lateral-Bib* reduziert war. Die mediale Subtraktionskontrolle *Medial-C* zeichnete sich im Gegensatz zur *Medial-Bib* durch einen größeren Anteil längerer Produkte aus.

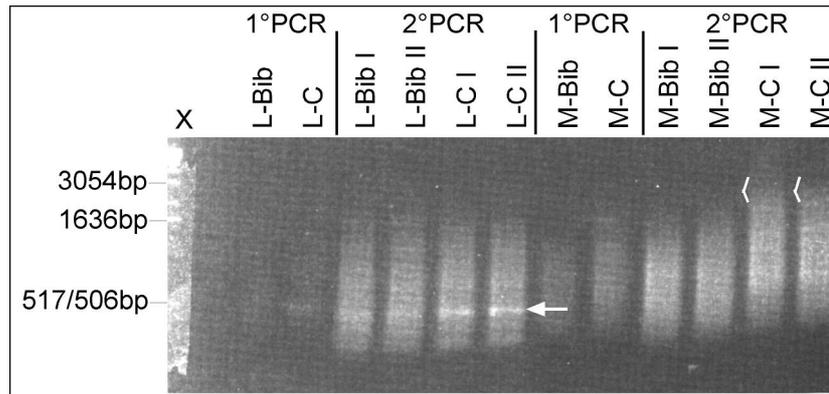


Abbildung 4-13: PCR-Produkte der experimentellen Bibliotheken nach der primären und sekundären „Suppression“ PCR in einem 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt. Der Pfeil zeigt eine 500 bp Bande, die in *Lateral-C* intensiver als in *Lateral-Bib* ist. Die Klammern weisen auf die höher molekularen cDNAs in *Medial-C* hin.

Analyse der Subtraktionseffizienz

Ein Maß für die Güte der Subtraktion ist die Differenz zwischen den PCR-Runden, die benötigt werden, nicht-differentiell oder differentiell exprimierte Gene aus den subtrahierten Bibliotheken und den zugehörigen nicht-subtrahierten Kontrollen zu amplifizieren (vgl. 3.11.4). Da bisher keine Gene bekannt waren, die differentiell im lateralen bzw. medialen Abschnitt des *Bulbus olfactorius* exprimiert wurden und da keine Sequenzen von Genen vorlagen, die während der Regeneration des glomerulären Musters reguliert werden, konnte die Güte der Bibliotheken zunächst nur über die Reduktion von nicht-differentiellen Sequenzen, wie z. B. β -aktin, abgeschätzt werden.

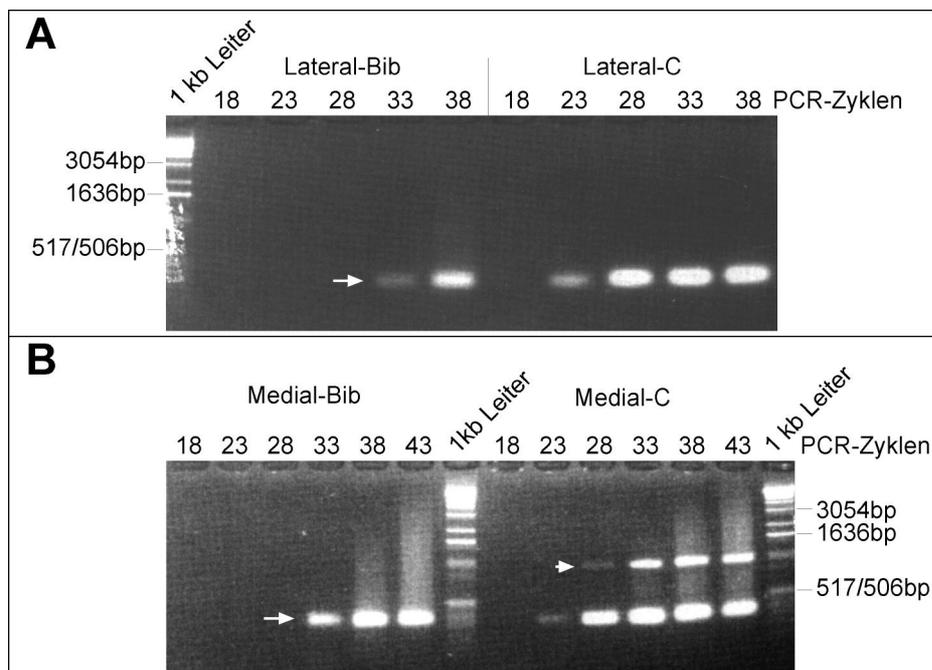


Abbildung 4-14: Semiquantitative PCR zur Analyse der Subtraktionseffizienz am Beispiel von A) *Lateral-Bib* und B) *Medial-Bib*. Ausgehend von subtrahiertem und nicht-subtrahiertem sekundären PCR-Produkt wird mit den b-act1 und b-act2 Primern ein 460 bp β -aktin Fragment amplifiziert.

In Abbildung 4-14 ist das Ergebnis des Subtraktionseffizienztests für zwei der subtrahierten Bibliotheken gezeigt, die die Grundlage der folgenden Untersuchungen bildeten (*Lateral-Bib* und *Medial-Bib*). Während bei *Medial-Bib* die erste β -aktin Bande nach 33 Zyklen zu sehen war, wurde sie bei *Medial-C* schon nach 23 Zyklen detektiert. Unter Berücksichtigung der Banden-Intensitäten lagen ungefähr 8 PCR-Runden zwischen den ersten Detektionen. Die höhermolekulare β -aktin Bande deutet darauf hin, dass einige cDNAs in *Medial-C* überzykliert waren und höher molekulare Transkripte bildeten (vgl. 3.10.4). Eine genomische Kontamination kann an dieser Stelle ausgeschlossen werden, da das erwartete Fragment ebenfalls 460 bp groß wäre.

Für die „laterale“ Bibliothek und *Lateral-C* wurde eine Differenz zwischen den ersten detektierbaren β -aktin Signalen von über 10 Runden ermittelt. Bei einer Verdopplung der Produktmenge je Zyklus wäre die β -aktin Matrize in den subtrahierten Bibliotheken um den Faktor 256 bzw. um den Faktor 1024 reduziert. Die tatsächlich vorliegenden Reduktionen sind vermutlich geringer, da in Experimenten unter vergleichbaren Bedingungen nur eine 1,8-fache Vermehrung des PCR-Produkts pro PCR-Zyklus festgestellt wurde. Damit ergab sich für die Reduktion der β -aktin Sequenz in *Medial-Bib* gegenüber der nicht-subtrahierten Kontrolle ein Faktor von 110 und für die *Lateral-Bib* ein Faktor von 360.

In der *Reg-Bib* war die β -aktin Matrize um 10 PCR-Runden reduziert, während in der *Kont-Bib* keine Verringerung von β -aktin detektierbar war.

Die Subtraktion in der *Kont-Bib* cDNA-Bibliothek wurde deswegen als fehlgeschlagen eingestuft und nicht weiter analysiert.

Die für eine „erfolgreiche“ Subtraktion angestrebten 5-15 PCR-Runden Differenz zwischen den ersten detektierbaren β -aktin PCR-Produkten wurden demzufolge in *Lateral-Bib*, *Medial-Bib* und *Reg-Bib* erreicht. In diesen cDNA-Bibliotheken waren demnach die subtraktive Hybridisierungen und die SS-PCR erfolgreich verlaufen, d.h. cDNA-Fragmente, die mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondierten, waren angereichert worden.

Diese effizient subtrahierten cDNA-Bibliotheken wurden also im folgenden verwendet, um differentiell exprimierte Transkripte zu isolieren.

4.5 Differentielles Screening der subtrahierten cDNA-Bibliotheken

Wie jede subtrahierte cDNA-Bibliothek enthalten auch die hergestellten *Lateral-Bib*, *Medial-Bib* und *Reg-Bib* cDNA-Fragmente, die nicht mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondieren und die den sogenannten Hintergrund bilden.

Im differentiellen *Screening* wird versucht, die differentiell exprimierten Sequenzen zu isolieren.

4.5.1 Experimentelles Vorgehen beim differentiellen Screening

Die subtrahierten Bibliotheken wurden in den pGEM-T-Vektor ligiert und aus den *Insert*-tragenden Transformanden wurden Kolonie Dot Blots, Plasmid Dot Blots oder PCR-Produkt Dot Blots (vgl. 3.12.3) hergestellt. Zum differentiellen Screening wurden die Dot Blots vergleichend mit zwei cDNA-Gemischen hybridisiert (vgl. 3.12.4).

Die PCR-Produkt Dot Blots aus der *Reg-Bib* wurden gegen Sonden aus den subtrahierten cDNA-Bibliotheken *Reg-Bib* und *Kont-Bib* (Abb. 4-15A) und gegen Sonden aus den nicht-subtrahierten cDNA-Populationen *Reg-C* und *Kont-C* hybridisiert (vgl. 3.12.2; Abb. 4-15B). cDNA-Fragmente, die mit den „vorwärts“ Sonden (*Reg-C* und *Reg-Kont*) ein stärkeres Signal erzeugen, wurden hier als Kandidaten_{PCR} bezeichnet.

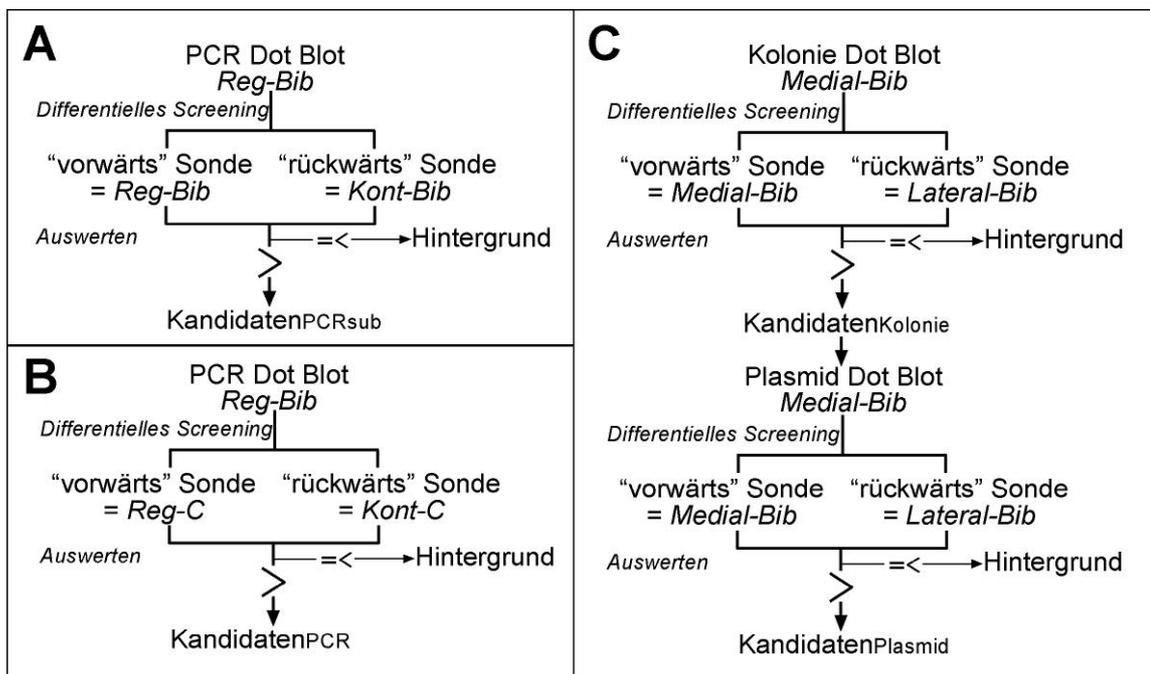


Abbildung 4-15: Schematische Darstellung des subtraktiven Screenings. A) und B) Die Transformanden aus der *Reg-Bib* werden mit Hilfe von PCR-Produkt Dot Blots differentiell gescreent. Als Sonden werden die subtrahierten (A) und die nicht-subtrahierten (B) cDNA-Bibliotheken verwendet. Nach der ersten *Screening* Runde werden Kandidaten_{PCR} zur weiteren Analyse bestimmt. C) Die Transformanden aus der *Lateral-Bib* und der *Medial-Bib* werden im Kolonie Dot Blot und im Plasmid Dot Blot differentiell gegen die subtrahierten Bibliotheken hybridisiert. Nach der ersten subtraktiven Hybridisierung werden die differentiellen Kandidaten_{Kolonie} ausgewählt und nach der zweiten Hybridisierungsrunde werden Kandidaten_{Plasmid} für die weiteren Analysen identifiziert.

Kolonie Dot Blots wurden aus den Transformanden der *Lateral-Bib* und der *Medial-Bib* hergestellt. Sie wurden „vorwärts“ mit Sonden aus der gleichen cDNA-Bibliothek und „rückwärts“ mit Sonden aus der revers hergestellten cDNA-Bibliothek hybridisiert (vgl. 3.12.4; Abb. 4-15C). Kolonien, die mit subtrahierten „vorwärts“ Sonden stärker als mit den „rückwärts“ Sonden hybridisieren, wurden als Kandidaten_{Kolonie} bezeichnet. Kandidaten_{Plasmid} waren in der Plasmid Dot Blot (vgl. 3.12.3) Hybridisierung erfolgreich verifizierte Kandidaten_{Kolonie} und wurden sequenziert.

4.5.2 Differentielles *Screening* der subtrahierten „Regenerations“- cDNA-Bibliothek
Insert-tragende Transformanden wurden durch „Blau-Weiß-Selektion“ ausgewählt und für bakterielle Kolonie-PCR vorbereitet (vgl. 3.8.3). Nach der Kolonie-PCR wurden die PCR-Produkte auf Membrane übertragen und zum differentiellen *Screening* eingesetzt. Mit den ausgewählten Kolonien wurden 10 PCR-Produkt Dot Blots in doppelter Ausführung hergestellt.

Differentielles *Screening* mit Sonden aus den nicht-subtrahierten Kontroll cDNA-Populationen

In einem ersten Ansatz werden die PCR-Dot Blots mit cDNA-Sonden aus den nicht-subtrahierten Kontrollen *Kont-C* und *Reg-C* hybridisiert. Da auf den meisten Dot Blots eine unerwartete Vielzahl von Kandidaten_{PCR} detektierbar war, wurden zunächst zwei Dot Blots eingehender untersucht, indem die Hybridisierungen mit frisch hergestellten Sonden wiederholt wurden.

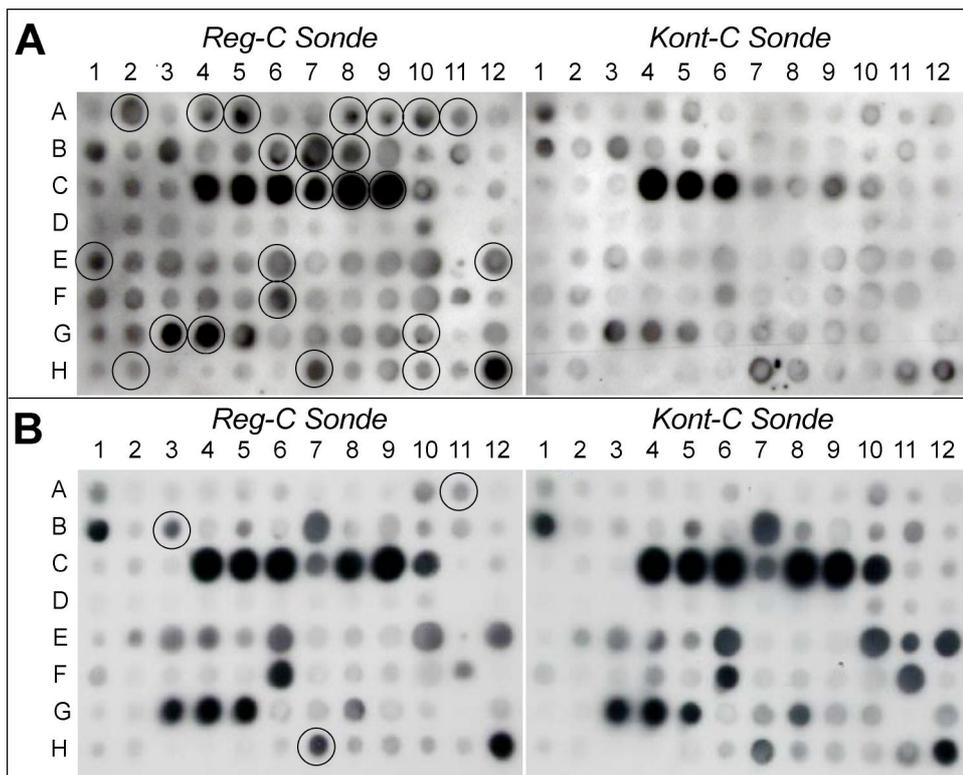


Abbildung 4-16: Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek *Reg-Bib* mittels PCR-Produkt Blot am Beispiel von PCR Dot Blot 9. A) Hybridisierung mit *Reg-C* und *Kont-C* Sonden. B) Wiederholung der Hybridisierung mit getauschten Blots. Als Kandidaten_{PCR} eingestufte Signale sind eingekreist.

Von den 172 aufgetragenen experimentellen *Inserts* konnten 37 den differentiellen Kandidaten_{PCR} zugerechnet werden. Die Abb. 4-16 zeigt am Beispiel von PCR-Dot Blot 9 die erste Hybridisierung mit den Sonden aus *Kont-C* und *Reg-C* (Abb. 4-16A). In der zweiten Hybridisierung stellte sich heraus, dass in PCR Dot Blot 9, alle bis auf zwei zuvor detektierten Kan-

didaten_{PCR} Artefakte gewesen waren, denn die Mehrheit der differentiellen Signale waren nicht reproduzierbar. Stattdessen stimmten die beiden Blots nach der zweiten Hybridisierung beinahe vollständig überein (Abb. 4-16B). Von den 37 Kandidaten_{PCR} der ersten Hybridisierung waren damit insgesamt 93 % artifiziellen Ursprungs. Möglicherweise entstanden die differentiellen Signale durch ungleichmäßige Hybridisierungen in einem zu kleinen Volumen Hybridisierungslösung. Da die Hybridisierungen mit den nicht-subtrahierten Sonden *Kont-C* und *Reg-C* sehr wenige differentielle Kandidaten_{PCR} identifizieren konnte, wurden diese Hybridisierungen nicht fortgesetzt.

Differentielles Screening mit Sonden aus den subtrahierten cDNA-Bibliotheken

Nach der Hybridisierung der Blots mit den subtrahierten Sonden *Reg-Bib* und *K-Bib*, wurde die Effizienz des differentielle Screenings an drei Membranpaaren beispielhaft untersucht. Der PCR-Produkt Dot Blot 10 wies nach den Hybridisierungen neun cDNA-Fragmente auf, die mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondieren könnten (Abb. 4-17). Auf den beiden anderen Dot Blot Duplikaten wurden 21 weitere Kandidaten_{PCR} identifiziert. Von diesen insgesamt 29 Kandidaten_{PCR} wurden 14 im „cDNA Southern“ überprüft und als nicht-differentiell eingestuft. 40 weitere, willkürlich ausgewählte cDNA-Fragmente zeigten im „cDNA Southern“ ebenfalls kein differentielles Signal.

Da die Isolierung von cDNA-Fragmenten, die mit differentiell exprimierten mRNAs korrespondieren, in der *Reg-Bib* mit dem differentielle Screening nicht erfolgreich war, wurde von einer weiteren Analyse der subtrahierten cDNA-Bibliothek *Reg-Bib* abgesehen.

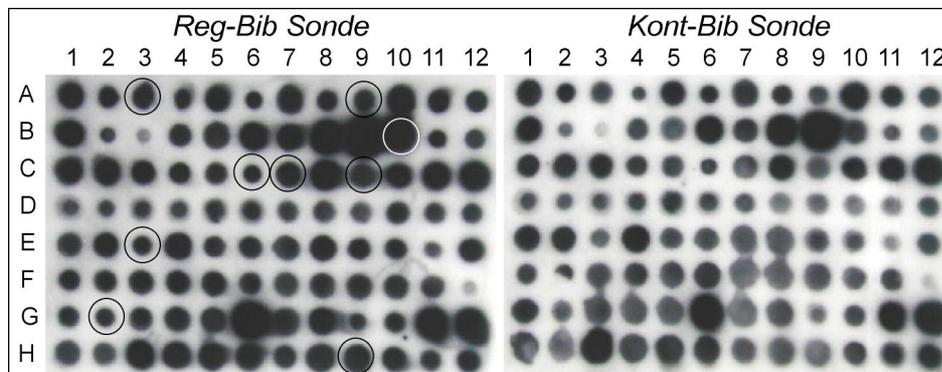


Abbildung 4-17: Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek *Reg-Bib* mittels PCR-Produkt Blot am Beispiel von Dot Blot 10. Hybridisiert wurde mit den subtrahierten cDNA-Sonden *Reg-Bib* und *Kont-Bib*. Als Kandidaten_{PCR} eingestufte Signale sind eingekreist.

4.5.3 Differentielles Screening der subtrahierten „lateralen“ cDNA Bibliothek führte zu 28 Kandidaten_{Plasmid}

Nach der Vorauswahl der Transformanden in der „Blau-Weiß-Selektion“ wurden etwa 1320 *Insert*-tragende Bakterien in Kolonie Dot Blots aufgereiht (vgl. 3.12.3) und mit den „vorwärts“ (hier: *Lateral-Bib*) und „rückwärts“ (hier: *Medial-Bib*) subtrahierten cDNA-Sonden

hybridisiert (vgl. 3.12.4). Klone, die stärker mit den „vorwärts“ als mit den „rückwärts“ Sonden hybridisierten, wurden als Kandidaten_{Kolonie} ausgewählt. Eine komplette Aufstellung von allen für diese Studie relevanten Kolonie Dot Blots befindet sich im Anhang.

Die Abbildung 4-18 zeigt das Kolonie Dot Blot Filterpaar 4. Die Kandidaten_{Kolonie} wurden visuell ausgewählt, weil Computer-gestützte Verfahren Varianten in der Größe und in der Lokalisation der Kolonien unzureichend berücksichtigen (vgl. 3.12.4). Der Klon 4A10 (Kolonie Dot Blot Filter 4, Reihe A, Spalte 10) wurde zum Beispiel ausgewählt, weil er in der Hybridisierung mit der subtrahierten „vorwärts“ Sonde (hier: *Lateral-Bib*) ein Signal zeigte, jedoch mit der „rückwärts“ hybridisierten Sonde (hier: *Medial-Bib*) unterhalb der Nachweisgrenze blieb. Da „falsch positive“ Signale leicht entstanden, wenn die Hybridisierungslösung über einen Kolonie Dot Blot ungleichmäßig verteilt war, wurden die umliegenden Signale in die Beurteilung des Signals einbezogen. Die umliegenden Kolonien zeigten ein anderes Hybridisierungsverhalten als 4A10, der damit als differentieller Kandidat_{Kolonie} eingestuft wurde. Aus etwa 1320 Kolonien auf 14 Kolonie Dot Blot Filtern wurden 103 Kandidaten_{Kolonie} ermittelt.

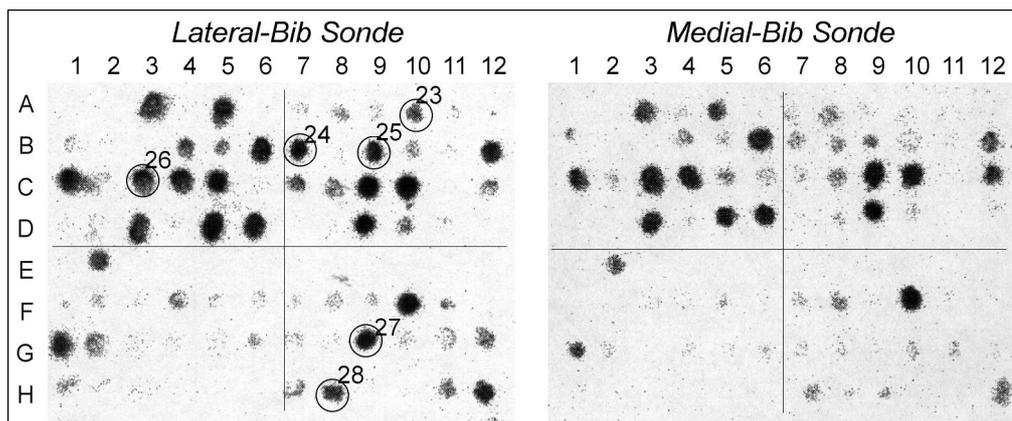


Abbildung 4-18: Auffinden von differentiell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek *Lateral-Bib* am Beispiel der Kolonie Dot Blot Filter 4. Zwei parallel hergestellte Kolonie Dot Blot Filter wurden mit radioaktiv-markierter subtrahierter „vorwärts“ (hier: *Lateral-Bib*) bzw. „rückwärts“ (hier: *Medial-Bib*) cDNA Sonde hybridisiert. Neben Klon 4A10 wurden von diesem Blot die Klone 4B7, 4B9, 4C5, 4G9 und 4H8 als Kandidaten_{Kolonie} ermittelt (eingekreiste Signale).

Die im Kolonie Dot Blot identifizierten differentiellen Kandidaten_{Kolonie} wurden in einer weiteren Hybridisierung gefiltert (Abb. 4-19). Hierzu wurden aus den entsprechenden Transformanden gewonnene Plasmidlösungen auf eine Nylonmembran übertragen und mit den subtrahierten „vorwärts“ und der „rückwärts“ Sonden hybridisiert (vgl. 3.12.4). Von den 103 Kandidaten_{Kolonie}, die mit dem oben beschriebenen Verfahren ausgewählt wurden, konnten 28 Transformanden im Plasmid Dot Blot bestätigt werden. Die Plasmid Dot Blots erwiesen sich somit als deutlich stringenter als die Kolonie Dot Blots, da hier Unterschiede beim Auftragen und in der Fixierung der Nukleinsäuren geringer waren.

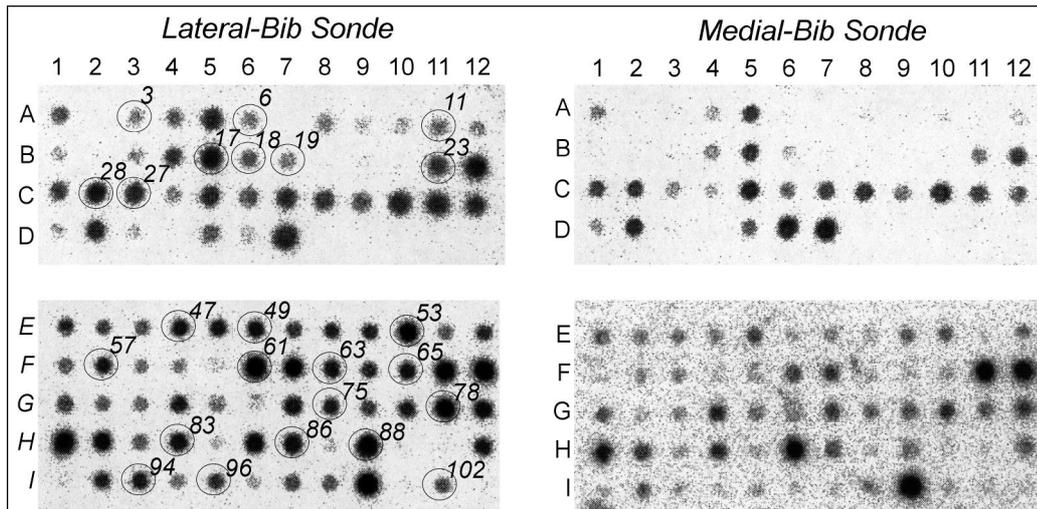


Abbildung 4-19: Überprüfung der im Kolonie Dot Blot differenziell hybridisierenden Klone durch einen Plasmid Dot Blot. Die Plasmid Dot Blot Duplikate der lateralen Kandidaten_{Kolonie} wurden mit der subtrahierten „vorwärts“ (hier: *Lateral-Bib*) bzw. „rückwärts“ (hier: *Medial-Bib*) Sonde hybridisiert. Zeigten Dots mit der „vorwärts“ Sonde ein stärkeres Hybridisierungssignal als mit der „rückwärts“ Sonde, wurden sie als Kandidaten_{Plasmid} eingestuft (eingekreiste Signale mit Arbeitsnummern; vgl. Tabelle 4-1).

4.5.4 Differentielles Screening der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek führte zu 18 Kandidaten_{Plasmid}

Für die Kolonie Dot Blot Analyse wurden nach der „Blau-Weiß-Selektion“ ca. 940 Transformatanten ausgewählt und differenziell *gescreent* (vgl. 3.12.1). Die „vorwärts“ Sonde geht auf die cDNA-Population der subtrahierten Bibliothek *Medial-Bib* und die „rückwärts“ Sonde auf die ebenfalls subtrahierte *Lateral-Bib* zurück (vgl. 3.12.2). Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe des Phosphoimagers detektiert und anschließend analysiert (vgl. 3.12.4). Die Hybridisierungsergebnisse von allen verwendeten Kolonie Dot Blots befinden sich im Anhang.

Die Abbildung 4-20 zeigt beispielhaft die Hybridisierung des Kolonie Dot Blot Filterpaares 4 aus der subtrahierten Bibliothek *Medial-Bib* und die identifizierten Kandidaten_{Kolonie}.

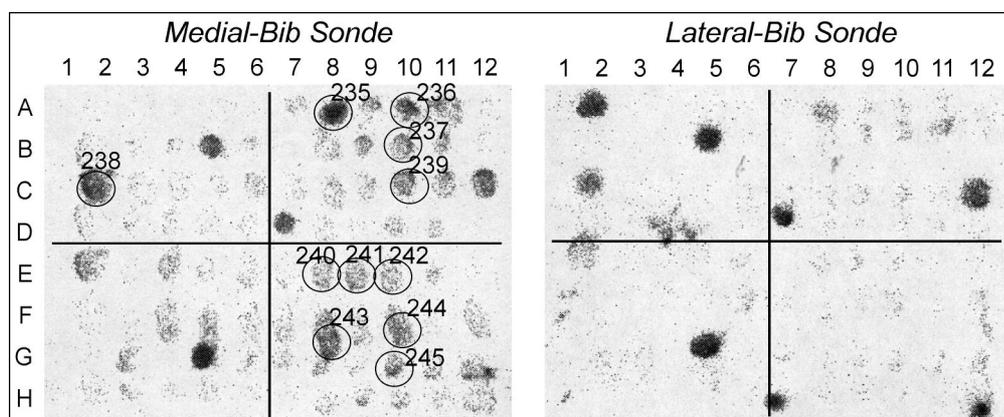


Abbildung 4-20: Auffinden von differenziell hybridisierenden Klonen aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek *Medial-Bib* mittels Kolonie Dot Blot. Zwei parallel hergestellte Kolonie Dot Blots wurden mit radioaktiv-markierter subtrahierter „vorwärts“ (hier: *Medial-Bib*) bzw. „rückwärts“ (hier: *Lateral-Bib*) cDNA Sonde hybridisiert. Die Klone 4A8, 4A10, 4B10, 4C2, 4C10, 4E8, 4E9, 4E10, 4F8, 4F10 und 4G10 wurden als Kandidaten_{Kolonie} ermittelt.

Im Plasmid Dot Blot wurden von den 89 Kandidaten_{Kolonie} aus zehn Kolonie Dot Blots 18 Kandidaten_{Plasmid} erhalten (Abb. 4-21).

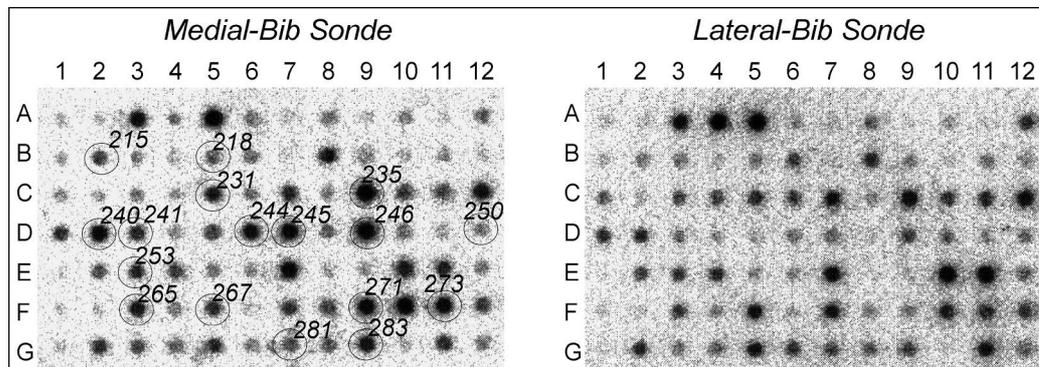


Abbildung 4-21: Überprüfung der im Kolonie Dot Blot differenziell hybridisierenden Klone durch einen Plasmid Dot Blot. Die Plasmid Dot Blot Duplikate der medialen Kandidaten_{Kolonie} wurden mit der subtrahierten „vorwärts“ (hier: *Medial-Bib*) bzw. „rückwärts“ (hier: *Lateral-Bib*) Sonde hybridisiert. Zeigten die Plasmid Dots mit der „vorwärts“ Sonde ein stärkeres Hybridisierungssignal als mit der „rückwärts“ Sonde, wurden sie als Kandidaten_{Kolonie} eingestuft (eingekreiste Signale mit Arbeitsnummern; vgl. Tabelle 4-4).

Zusammengefasst zeigte sich im differentiellen *Screening*, dass die „Regenerations“ cDNA-Bibliothek trotz eines positiven Subtraktionseffizienz-Tests nur äußerst wenige cDNA-Fragmente enthielt, die möglicherweise mit differentiell exprimierten Transkripte korrespondierten. Die Anreicherung von differentiellen cDNA-Fragmenten war also überschätzt worden. Da der Aufwand des *Screenings* einer cDNA-Bibliothek, in der differentielle Fragmente nur gering angereichert worden waren, nicht überschaubar war, wurde von einer weiteren Analyse der „Regenerations“ cDNA-Bibliothek abgesehen.

Demgegenüber ergab die Analyse der „lateralen“ und „medialen“ cDNA-Bibliothek ein wesentlich besseres Ergebnis. Hier wurden aus 1320 untersuchten cDNA-Fragmenten der „lateralen“ cDNA-Bibliothek 28 und aus den 940 untersuchten cDNA-Fragmenten der „medialen“ 18 Kandidaten nach dem differentiellen *Screening* als differentiell verteilt eingestuft und weiter analysiert.

4.6 Charakterisierung der Kandidaten_{Plasmid} aus der „lateralen“ cDNA-Bibliothek

Die cDNA-Fragmente werden sequenziert, um eine Vorauswahl treffen zu können und so mehrfach gefundene sowie konstitutiv exprimierte Sequenzen von den Expressionsanalysen auszuschließen. Von den in diesem Schritt ausgewählten Kandidaten wurde die differentielle Expression stellvertretend in „cDNA Southern“ Hybridisierungen überprüft, da die Menge des zur Verfügung stehenden Gewebes sehr gering ist. Von danach verifizierten, differentiell ver-

teilten Kandidaten wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt, um die differentielle Expression abschließend beurteilen zu können.

4.6.1 In der subtrahierten „lateralen“ cDNA-Bibliothek wurden zehn unabhängige Kandidaten_{Plasmid} identifiziert

Von den 28 Kandidaten_{Plasmid} wurden 27 sequenziert und mit Hilfe von Datenbankrecherchen zehn unabhängigen Sequenzen zugeordnet (Tabelle 4-1). Damit fiel als erstes die hohe Redundanz in dieser cDNA-Bibliothek auf.

Von den 27 Kandidaten korrespondierten zehn mit *ependymin* aus *Danio rerio*. Sie besaßen den größten Anteil an der hohen Redundanz in dieser cDNA-Bibliothek (Tabelle 4-2). Drei cDNA-Sequenzen korrespondierten mit einem *Est* aus *Danio rerio*, dem die hypothetische Proteinsequenz DJ0777O23.1 unbekannter Funktion zugeordnet ist. Sechs cDNA-Sequenzen konnten dem humanen Gen für das *t-complex protein 11* zugeordnet werden und zwei Sequenzen waren mit *pBs6.2* der Maus identisch. Diese beiden cDNA-Fragmente dienten als negative Kontrollen für das differentielle *Screening* (vgl. 3.12.2) und sind hier also als Ergebnis einer Kontamination aufzufassen. Eine cDNA-Sequenz zeigte Homologie zu einer *Est*-Sequenz aus *Danio rerio*, die in ihrem translatierten Bereich dem humanen Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydroxylase Isozym L1 ähnlich ist, und für eine andere konnte eine Homologie zu *connexin 34.7* gefunden werden (Gap Junction Baustein). Zwei Klonen wurden uncharakterisierte *Est*-Sequenzen aus *Danio rerio* zugeordnet, während für ein cDNA-Fragment unter den öffentlich zugänglichen Sequenzen keine Homologen gefunden werden konnten.

Tabelle 4-2: Vorkommen bzw. Funktion der lateralen Kandidaten_{Plasmid}. Die Ziffer in Klammern gibt die Anzahl unabhängiger cDNA-Fragmente an.

Vorkommen bzw. Funktion	Anzahl der cDNA-Fragmente	Anteil der cDNA-Fragmente an seq. Kandidaten _{Plasmid}
Nervensystem (Ependymin)	10 (1)	37 %
unbekannt (1B9, 10D3, 12A8, 13G5, 14A8, 14G6)	6 (4)	22 %
Ubiquitin-Abbausystem (Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydroxylase Isozym L1)	1	4 %
Zell-Zell Kommunikation (Connexin 34.7)	1	4 %
Mitochondrium (16S rRNA)	1	4 %
<i>Screening</i> Kontrollen (pBs6.2, T-Complex Protein 11)	8 (2)	30 %

Damit korrespondierten zehn der Kandidaten_{Plasmid} der subtrahierten „lateralen“ cDNA-Bibliothek mit einem im Nervensystem exprimierten Gen und sechs zu vier Genen unbekannter Identität (Tabelle 4-2). Diese Sequenzen wären prinzipiell für die weitere Analyse interessant.

Tabella 4-1: Ergebnis der Nukleinsäure Sequenzanalyse für die Kandidaten^{Plasmid} aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek *Lateral-Bib*.

#	Blot- position	Identität [bp]	Accession- Nummer	BLAST Nukleotid Suchergebnis
3	1B9	201/203	AW076990	fj33e02.x1 zebrafish adult brain Danio rerio cDNA 3'
6	1D5	170/212	X52129	Mouse mRNA for testis-specific protein, pBs6.2
8	1D11	82/90	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
11	1H7	106/131	X52129	Mouse mRNA for testis-specific protein, pBs6.2
16	2G9	312/337	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
17	2G10	340/365	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
18	3A8	213/259	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
19	3D5	251/252	XM 004289.3	Homo sapiens t-complex 11 (a murine top-homolog) (TCP11), mRNA
23	4A10	306/335	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
24	4B7	236/236	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
26	4C5	421/428	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
27	4G9	251/252	XM 004289.3	Homo sapiens t-complex 11 (a murine top-homolog) (TCP11), mRNA
35	6B7	197/201	AF793906	fc55h08.x1 Zebrafish WashU MPMG EST Danio rerio cDNA 3' similar SW-ub11_human P09936 UBIQUITIN CARBOXYL TERMINAL HYDROXYLASE ISOENZYME L1, mRNA sequence
36	6B9	319/340	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
47	10D3	171/175	BG308837	f190b03.x1 Zebrafish adult retina cDNA Danio rerio cDNA clone 4144060 3' similar to contains element MER30 repetitive element
49	10G4	431/435	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
53	11A12	251/252	XM 004289.3	Homo sapiens t-complex 11 (a murine top-homolog) (TCP11), mRNA
57	11E7	251/252	XM 004289.3	Homo sapiens t-complex 11 (a murine top-homolog) (TCP11), mRNA
61	12A8	352/367	AW281077	fj49f12.y1 zebrafish adult brain Danio rerio cDNA 5' similar to TR:075223 075223 WUGSC:H_DJ0777023.1 PROTEIN.
63	12B12	251/252	XM 004289.3	Homo sapiens t-complex 11 (a murine top-homolog) (TCP11), mRNA
65	12F12	251/252	XM 004289.3	Homo sapiens t-complex 11 (a murine top-homolog) (TCP11), mRNA
75	13G5	---		keine Homologie gefunden
78	14A8	345/352	AW281077	fj49f12.y1 zebrafish adult brain Danio rerio cDNA 5' similar to TR:075223 075223 WUGSC:H_DJ0777023.1 PROTEIN.
86	14F6			nicht sequenziert
88	14G6	377/386	AW281077	fj49f12.y1 zebrafish adult brain Danio rerio cDNA 5' similar to TR:075223 075223 WUGSC:H_DJ0777023.1 PROTEIN.
94	15B6	137/194	AF059184	Morone americana connexin 34.7 (Cx34.7) mRNA, complete cds
96	15D6	177/196	X52502.1	Zebrafish mRNA for ependymin
102	9F5	337/340	AF036006	Danio rerio 16S ribosomal RNA gene, mitochondrial gene for mitochondrial RNA, complete sequence

#: Arbeitsnummer

4.6.2 Die Analyse der Kandidaten_{Plasmid} wurde auf *Ependymin* beschränkt

Das Fragment 9F5 wurde nicht weiter untersucht, denn es kodierte für 16S rRNA, die vermutlich nicht regulativ in den Aufbau der Glomeruli involviert ist.

Die Fragmente, die Homologien zu *connexin 34.7* und zu einer Ubiquinol Hydroxylase (Ubiquitin-Abbausystem) besaßen, wurden ebenso wie die cDNA-Fragmente, deren korrespondierende mRNAs unbekannt waren, zunächst zurückgestellt.

Die dreifache Isolierung des cDNA-Fragmentes, das zum hypothetischen Protein DJ0777O23.1 korrespondierte (Klon 12A8, 14A8, 14G6), empfahl diese Sequenz für eine Expressionsanalyse. Im „cDNA Southern“ stellte sich heraus, dass das korrespondierende Transkript nicht auf einem höheren Niveau im lateralen Bulbusabschnitt, aber insgesamt auf einem sehr hohen Niveau exprimiert wurde.

Die hohe Redundanz des *ependymin*-Fragmentes machte es zu einem interessanten Kandidaten. Die Expression des Gehirn-spezifischen *ependymins* wurde deswegen im „cDNA Southern“ analysiert (Abb. 4-22). Dabei stellte sich heraus, dass das *ependymin* Transkript auf einem höheren Niveau in der lateralen *Bulbus olfactorius* Region als in der medialen vorliegt.

Auf eine genauere Analyse der *pBs6.2*- und *t-complex protein 11*-Fragmente tragenden Transformanten wurde verzichtet, da sie Kontrollen für das subtraktive *Screening* repräsentieren. Sie könnten während der SS-PCR die *Lateral-Bib* Ansätze kontaminiert haben. Gemeinsam machten sie etwa 30 % der Kandidaten_{Plasmid} aus. Die hohe Kontamination durch die *pBs6.2*- und *t-complex protein 11*-Fragmente widersprach einer weiteren Durchsichtung der subtrahierten „lateralen“ cDNA-Bibliothek. Der Fokus wurde deswegen auf die mediale cDNA-Bibliothek gelegt und die Analyse von Kandidaten_{Plasmid} aus der „lateralen“ cDNA-Bibliothek weitgehend zurückgestellt.

4.6.3 Der Anteil differentiell exprimierter Sequenzen lag unter einem Prozent

Aus der „lateralen“ cDNA-Bibliothek konnten zehn cDNA-Fragmente isoliert werden, die mit dem gleichen Transkript korrespondierten (*ependymin*). Diese mRNA wird im lateralen Bulbusabschnitt stärker als im medialen exprimiert.

Wie effizient die Anreicherung von differentiell exprimierten Transkripten in dieser subtrahierten cDNA-Bibliothek war, zeigt Tabelle 4-3. Knapp 1 Prozent der *Insert*-tragenden Kolonien trugen ein *ependymin*-Fragment und waren so differentiell exprimiert.

Ob und wie viele andere differentiell verteilte cDNA-Fragmente darüber hinaus in dieser cDNA-Bibliothek enthalten sind, ist unklar, denn die Untersuchung von weiteren Kandidaten_{Plasmid} steht noch aus.

Tabelle 4-3: Zusammenstellung der in den einzelnen Schritten analysierten cDNA-Fragmente aus der subtrahierten „lateralen“ cDNA-Bibliothek. Die Ziffer in Klammern gibt die Anzahl unabhängiger cDNA-Fragmente an.

<i>Analyseschritt bzw. Ergebnis</i>	<i>Anzahl der cDNA-Fragmente</i>	<i>[%] Ausbeute bezogen auf Kandidaten_{Plasmid}</i>	<i>Gesamt-ausbeute [%]</i>
Kolonie Dot Blot Analyse	1320		100
Kandidaten _{Kolonie}	103		7,8
Plasmid Dot Blot Analyse	103		7,8
Kandidaten _{Plasmid}	28	100	2,1
Sequenzierung	27 (9)	96,4	2,0
Transkripte aus dem olfaktorischen Bulbus	19 (8)	67,0 (28,6)	1,4 (0,6)
Screening Kontrollen	8 (2)	28,6 (7,1)	0,6 (0,2)
im cDNA Southern/ in ISH analysiert	13 (2)	46,4 (7,1)	1,0 (0,2)
laterale Expression	10 (1)	35,7 (3,6)	0,8 (<0,1)

4.7 Charakterisierung der Kandidaten_{Plasmid} aus der „medialen“ cDNA-Bibliothek

Die Kandidaten_{Plasmid} der „medialen“ cDNA-Bibliothek wurden wie die Kandidaten_{Plasmid} der „lateralen“ cDNA-Bibliothek sequenziert und im „cDNA Southern“ analysiert, um die differentielle Expression der korrespondierenden Transkripte zu überprüfen.

4.7.1 Die Kandidaten_{Plasmid} der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek setzten sich aus 15 unabhängigen Sequenzen zusammen

Die 17 Kandidaten_{Plasmid} aus der Plasmid Dot Blot Hybridisierung wurden sequenziert und die Sequenzen anschließend in einer vergleichenden Homologiesuche 15 korrespondierenden *Est*-Einträgen oder Genen zugeordnet (Tabelle 4-4).

Unter den acht Sequenzen, die mit bekannten Gensequenzen überlappten, befanden sich zwei, die mit der mRNA einer Histon-Acetyltransferase (*Tip60B*), und jeweils eine Sequenz, die mit *neutral endopeptidase (NEP)* mRNA aus Kaninchen, *proenkephalin A* Gen aus *Xenopus laevis*, *synaptosom-associated protein 25.2* mRNA aus *Danio rerio*, *cytochrom c oxidase polypeptid II* aus Goldfisch, humaner *alpha enolase* oder mit einer Ubiquitin-Ligase (*nedd 4 WW-Binding protein*) korrespondierten. Für zwei cDNA-Fragmente wurden Homologien mit genomischen Klonen aus *Danio rerio* gefunden. In der *dbest* Datenbank wurden sieben Kandidaten sechs verschiedene *Est* Sequenzen zugeteilt. Im Verlauf der Studie wurde gezeigt, dass eine davon mit einer Beta-Tubulin Isoform korrespondiert.

Tabelle 4-4: Ergebnis der Nukleinsäure Sequenzanalyse für die Kandidaten^{Tipasmid} aus der subtrahierten cDNA-Bibliothek.

#	Blot- position	Identität [bp]	Accession- Nummer	BLAST Nukleotid Suchergebnis
215	3E11	162/166	BI326433	fr10f10.y1 zebrafish fin day3 regeneration Danio rerio cDNA clone 4927651 4927651 5' similar to SW:COX2_CARAU_078682 CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE II
218	3G1	118/141	AC091300	Danio rerio clone 127K3, complete sequence
231	10G2	284/351	AF333984	Rattus norvegicus TIP60B (Tip60b) mRNA, partial cds
235	4A8	488/491	AI721996	fd18b07.y1 Sugano Kawakami zebrafish DRA Danio rerio cDNA clone 2351893 5', mRNA
240	4E8	99/113	NM_030571.13	Homo sapiens hypothetical protein MGC10924 similar to Nedd4 WW-Binding protein 4 (MGC10924), mRNA
241	4E9	75/89	BC002225	Mus musculus, RIKEN cDNA 2310047O13 gene, clone IMAGE: 3491153, mRNA
244	4F10	261/285	BF156371	fl51c03.y1 Sugano Kawakami zebrafish DRA Danio rerio cDNA clone 3817325 5'
245	4G10	348/365	AF091594	Danio rerio synaptoneme-associated protein 25.2 (Shap) mRNA, complete cds
246	5A6	332/332	AI721996	fd18b07.y1 Sugano Kawakami zebrafish DRA Danio rerio cDNA clone 2351893 5', mRNA
250	5D10	306/377	AF333984	Rattus norvegicus TIP60B (Tip60b) mRNA, partial cds
253	5E6	420/427	AI721524	fc28g05.x1 Zebrafish WashU MPIMG EST Danio rerio cDNA 3' similar gb:M14328 ALPHA ENOLASE (HUMAN); mRNA sequence
265	6F12	431/449	AI477357	fb52d09.x1 Zebrafish WashU MPIMG EST Danio rerio cDNA clone IMAGE:3715505 3'
267	7A10	52/60	XO5338	Rabbit mRNA for neutral endopeptidase (NEP) (enkephalinase, EC 3.4.24.11)
271	7C9	43/47	X00853.1	Xenopus laevis proenkephalin gene A2
273	7F5	455/469	AI626492	fc06h07.x1 Zebrafish WashU MPIMG EST Danio rerio cDNA 3'
281	8G11	417/465	AL590134	Zebrafish DNA sequence from clone RP71-10G3, complete sequence (Danio rerio)
283	9C11	50/54	AI794506	fc45c01.y1 Zebrafish WashU MPIMG EST Danio rerio cDNA clone IMAGE: 3724320 5'

#: Arbeitsnummer

Damit konnten vier spezifisch im Nervensystem exprimierte Gene und ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden (Tabelle 4-5). Wird ihre differentielle Expression im olfaktorischen Bulbus bestätigt, könnten sie möglicherweise an der Etablierung des glomerulären Musters beteiligt sein.

Tabelle 4-5: Vorkommen bzw. Funktion der medialen Kandidaten_{Plasmid}. Die Ziffer in Klammern gibt die Anzahl unabhängiger cDNA-Fragmente an.

<i>Vorkommen bzw. Funktion</i>	<i>Anzahl der cDNA-Fragmente</i>
spezifisch im Nervensystem (Proenkephalin, NEP, Alpha Enolase, SNAP 25.2)	4
Transkriptionsfaktoren (TIP60B)	2 (1)
Strukturproteine (Beta-5 Tubulin)	1
Atmungskette (Cytochrom C Oxidase)	1
Ubiquitin-Abbausystem (ähnlich zu Nedd4)	1
unbekannt (3G1, 4A8, 4E9, 4F10, 5A6, 6F12, 8G11, 9C11)	8 (7)

4.7.2 Fünf Fragmente der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek zeigten im „cDNA Southern“, dass sie differentuell exprimiert werden

In der Analyse der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek wurden von den 15 unabhängigen Kandidaten_{Plasmid} 11 im „cDNA Southern“ überprüft (4A8/5A6, 4E8, 4G10, 5D10/10G2, 5E6, 6F12, 7A10, 7C9, 7F5, 8G11, 9C11). Die Expressionsanalyse von 3G1, 4E9 und 4F10 steht noch aus. Nicht getestet wurde das cDNA-Fragment 3E1, da es ein mitochondriales Gen repräsentiert und daher vermutlich nicht an der Etablierung des glomerulären Musters beteiligt ist.

Fünf der getesteten cDNA-Fragmente zeigten Unterschiede in der Hybridisierung mit der „lateralen“ und der „medialen“ cDNA (Abb. 4-22). *NEP* und das mit 8G11 korrespondierende Transkript wurden in beiden cDNA-Gemischen in verschiedenen langen Varianten detektiert, während *Tip60*, *proenkephalin* und *beta-5 tubulin* auf einem höheren Niveau in der „medialen“ als in der „lateralen“ cDNA vorlagen. Bezogen wurden die Signalstärken jeweils auf das entsprechende Signal der β -aktin Sonde.

4.7.3 Der Anteil differentuell exprimierter Sequenzen lag unter einem Prozent

In der medialen Bibliothek konnten demnach von etwa 940 Transformanten drei differentuell exprimierte cDNA-Fragmente isoliert werden, deren Expression im medialen Bulbusabschnitt stärker als im lateralen ist (Tabelle 4-6). Ähnlich wie in der lateralen Bibliothek wurden nach der Kolonie Dot Blot und der Plasmid Dot Blot Analyse etwa 2 % der Transformanten als

Kandidaten_{Plasmid} eingestuft. Eine erhöhte Expression im medialen Abschnitt des olfaktorischen Bulbus zeigten 17,6 % der Kandidaten_{Plasmid} bzw. 0,3 % von allen untersuchten cDNA-Fragmenten. Beide Werte könnten jedoch zu gering sein, da nicht alle Kandidaten_{Plasmid} bezüglich ihrer differentiellen Expression untersucht wurden. Ein Korrekturfaktor unter der Annahme der gleichen Häufigkeit differentieller Expression von 1,3 würde jedoch die Größenordnung der differentiell exprimierten cDNA-Fragmente nicht ändern.

Tabelle 4-6: Zusammenstellung der Effizienzen während der Identifizierung differentiell exprimierter Sequenzen aus der subtrahierten „medialen“ cDNA-Bibliothek. Klammern: unabhängige Sequenzen.

<i>Analyseschritt bzw. Ergebnis</i>	<i>Anzahl der cDNA-Fragmente</i>	<i>Ausbeute bezogen auf Kandidaten_{Plasmid}</i>	<i>Gesamtausbeute [%]</i>
Kolonie Dot Blot Analyse	940		100
Kandidaten _{Kolonie}	89		9,5
Plasmid Dot Blot Analyse	89		9,5
Kandidaten _{Plasmid}	17	100	1,8
Sequenzierung	17	100	1,8
im cDNA Southern/ in ISH analysiert	13 (11)	76,5 (64,7)	1,4 (1,2)
mediale Expression	3	17,6	0,3

4.7.4 Aus anderen subtrahierten cDNA-Bibliotheken stammende cDNA-Fragmente

Gemeinsam mit den bisher beschriebenen cDNA-Fragmenten wurden in den folgenden Abschnitten zwei von H. Korte (2001) isolierte Fragmente, M1 und M10, näher analysiert. Ihre differentielle Expression in der medialen Hälfte des olfaktorischen Bulbus war von H. Korte auf der Ebene des „cDNA Southern“ gezeigt worden.

Sie wurden als Kandidaten_{PCR} in einer subtrahierten cDNA-Bibliothek isoliert, in der Sequenzen angereichert wurden, die in der medialen *Bulbus olfactorius* „Hälfte“ exprimiert werden. In diesem Ansatz wurden halbe olfaktorische Bulbi miteinander verglichen, um Zellschichtspezifische Differenzen auszugleichen (insbesondere einen größeren Anteil der Körnerzellschicht im medialen Abschnitt). Dieses Ziel wurde erreicht, allerdings unter Verlust der Sequenzen, die nur am medialen und lateralen Extrem differentiell exprimiert werden. Denn neben M1 und M10 konnten nur noch mit *ependymin* korrespondierende cDNA-Fragmente als differentiell exprimiert identifiziert werden.

4.8 Charakterisierung der differentiell exprimierten Kandidaten

Die im „cDNA Southern“ verifizierten Kandidaten wurden vollständig sequenziert und die Homologiesuche auf Proteinebene fortgesetzt. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen im olfaktorischen Bulbus von adulten Zebrabärblingen wurden die differentiellen Transkriptlokalisationen im Gewebe überprüft. Die Zuordnung zu bestimmten Zelltypen oder Zellschichten erlaubte Hinweise auf die Funktion der zugehörigen Proteine. Die Expressionsanalyse wurde für einige der neuartigen Sequenzen mit *in situ* Hybridisierungen an Embryonen ergänzt, um Rückschlüsse auf die Funktion der Transkripte im gesamten Tier zu erhalten oder ggf. eine Spezifität für das olfaktorische System nachzuweisen.

4.8.1 Zusammenstellung der isolierten differentiell exprimierten mRNAs

Aus den beiden untersuchten cDNA-Bibliotheken *Lateral-Bib* und *Medial-Bib* konnte insgesamt für sechs cDNA-Fragmente eine differentielle Verteilung der entsprechenden Transkripte im „cDNA Southern“ gezeigt werden (Abb. 4-22). Ihre Sequenzen wurden auf Proteinebene und ihre Expressionen in olfaktorischen Bulbi analysiert.

Die vorhandenen Protein-kodierenden cDNA-Fragmentabschnitte wurden ihren Homologen zugeordnet, um die Identitäten der entsprechenden Transkripte besser beschreiben zu können (Tabelle 4-7). Dadurch konnte die Identität von 7A10 mit der Zuordnung zu NEP II spezifiziert werden. Da die isolierten cDNA-Fragmente 7F5, 8G11 und M10 keine offenen Leseraster enthielten (und keinen bekannten Genen zugeordnet werden konnten), wurde eine *full-length* cDNA-Bibliothek aus Gehirn von *Danio rerio* durchsucht oder das 5'-Ende mit RACE erschlossen. 7F5 und M10 konnten so Beta-5 Tubulin bzw. RFamid Vorläuferprotein zugeordnet werden.

Die identifizierten, differentiell exprimierten Transkripte werden bis auf *TIP60* spezifisch im Nervensystem exprimiert.

Die cDNA-Fragmente 7A10 (*NEP*) und 8G11 (unbekannt) zeichneten sich durch differentiell exprimierte Transkript-Varianten aus, während die Gesamthäufigkeiten aller Formen zusammen nicht unterschiedlich waren. Dagegen waren die Expressionsniveaus von 1D11 (*ependymin*), 5D10 (*TIP60*), 7C9 (*proenkephalin*), 7F5 (*beta-5 tubulin*), M1 (*sGnRH Vorläuferprotein*) und M10 (*RFamid Vorläuferprotein*) jeweils in der cDNA-Fraktion, aus der sie angereichert worden waren („Tester“), 1,2- bis 7,0-fach höher als auf der anderen Seite („Driver“). In den anschließenden *in situ* Hybridisierungen wurden die Einschätzungen bezüglich der Verteilung zwischen dem lateralen und medialen Bulbusabschnitt, der durch die „cDNA Southern“ vermittelt wurde, für alle untersuchten Transkripte bestätigt.

Eine weitere Korrelation zwischen den „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierung Ergebnissen war die absolute Häufigkeit von einzelnen cDNA-Fragmenten in den lateralen

Tabelle 4-7: Ergebnis der Homologiesuche auf Proteinebene für die differentiell exprimierten Transkripte.

Kandidat _{Kolo-} nie/ Position	Länge [bp]	ORF [AA]	homologer Bereich [AA]	identisch	konservativ ersetzt	Accession- Nummer	BLAST Protein Suchergebnis	Name in <i>Danio rerio</i>
26/ 1D11 ¹	614	130	130	100 %	100 %	CAA36742. 1	Ependymin <i>Danio rerio</i>	Ependymin
250/ 5D10 ²	399	132	132	96 %	97 %	AAH00166. 1	HIV-1 Tat Interactive Protein <i>Homo sapiens</i>	TIP60
267/ 7A10	1149	383	383	63 %	81 %	AF176569_ 1	Nepriylisin-Like Metalloendopeptidase 1 <i>Mus musculus</i>	NEP II
271/ 7C9	816	216	232 ⁵	37 %	46 %	AF232671_ 1	Proenkephalin <i>Neoceratodus forsteri</i>	Proenkephalin
273/ 7F5 ³	2274	444	444	97 %	98 %	AAA5675.1	Beta 5 Tubulin <i>Xenopus leavis</i>	Beta-5 Tubulin
281/ 8G11	632	n. d.					keine Homologie	8G11
M1 ⁴	431	94	38	92 %	97 %	CAC18539. 1	Salmon-type gonadotropin-releasing hormone <i>Danio rerio</i>	GnRH Vorläu- ferprotein
M10 ³	826	75	63	50 %	62 %	AF148699	FMRFamide-related peptides precursor <i>Bos taurus</i>	RF-amid Vorläu- ferprotein

1: und 2G9, 2G10, 3A8, 4B10, 4B7, 4C5, 6B9, 15D6

2: und 4+G2

3: cDNA-Sequenz aus „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek

4: Originalsequenz

5: verlängert durch Alignment-bedingte Lücken

n.d.: nicht detektiert

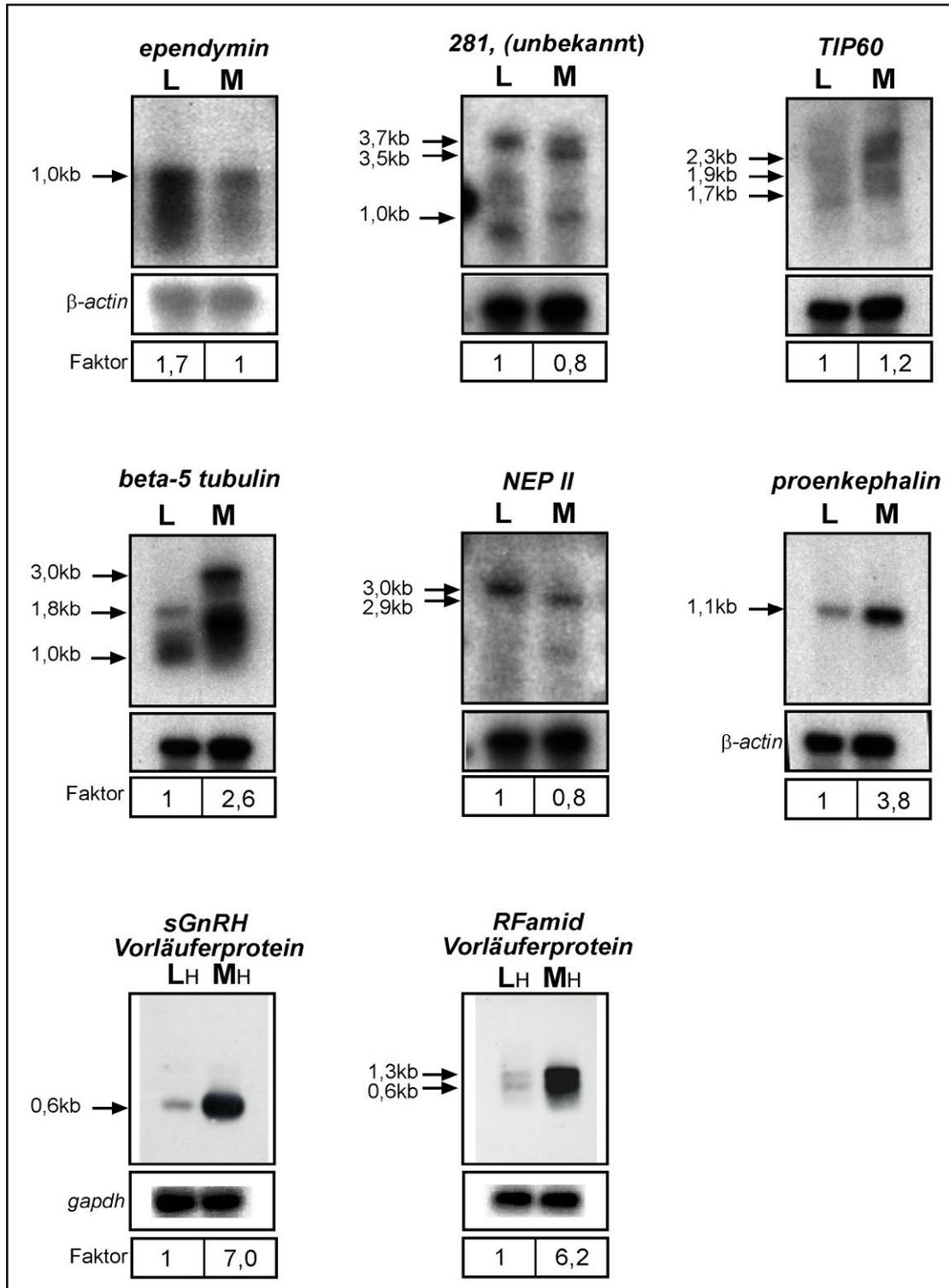


Abbildung 4-22: Ergebnis der „cDNA Southern“ Analyse für die cDNA-Fragmente, die mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondieren. Pro Spur wurden 0,2 µg cDNA aufgetragen und auf Hybond N Membran geblottet. Die [α -P³²] dCTP markierten cDNA-Fragment Sonden hybridisierten in ULTRAhyb™ bei 42°C über Nacht an die Membranen (vgl. 3.9.4). Zum Abgleich wurden die Membranen anschließend mit einem β -aktin oder *gapdh* cDNA-Fragment hybridisiert (vgl. 3.12.4). L, M: cDNA aus den lateralen bzw. medialen Bulbusabschnitten; L_H, M_H: cDNA aus der lateralen bzw. der medialen Hälfte des olfaktorischen Bulbus. Die Abbildungen für sGnRH und RFamid wurden freundlicherweise von H. Korte zur Verfügung gestellt.

oder medialen Bulbusabschnitten. Die Einstufung von *proenkephalin* (7C9) als seltenes Transkript wurde ebenso bestätigt wie die häufige Expression von *ependymin* (1D11).

Darüber hinaus stimmten im „cDNA Southern“ die geschätzten Transkriptgrößen in der Regel gut mit den erwarteten überein. Sie entsprachen den bekannten Transkripten aus anderen Spezies und wurden für M10 (*RFamid Vorläuferprotein*) und 273 (*beta-5 tubulin*) durch die Isolierung der *Danio rerio* full-length cDNAs experimentell bestätigt.

Der „cDNA Southern“ repräsentiert also gut die Transkriptverteilung, die Größe der Transkripte und ihre relativen Häufigkeiten.

Insgesamt konnten in dieser Studie vier cDNA-Fragmente identifiziert werden, von denen die entsprechenden Transkripte höher in dem einen als in dem anderen Bulbusabschnitt exprimiert werden. Zwei weitere Fragmente zeichnen sich durch die Expression von verschiedenen langen Transkripten in beiden Bulbuskappen aus. Die Sequenz- und Expressionsanalysen für die einzelnen cDNA-Fragmente sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.8.2 Das Glykoprotein Ependymin ist differentiell exprimiert

Die Klone 1D11, 2G9, 2G10, 3A8, 4B10, 4B7, 4C5, 6B9, 10G4 und 15D6 stimmen auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene (130 Reste) vollständig mit der *Danio rerio* Ependymin überein (Tabellen 4-1 und 4-7; X52502 bzw. CAA36742.1). Bis auf 10G4 sind alle Fragmente vom CDS-Primer/ PolyA-Schwanz und einer *RsaI*-Schnittstelle begrenzt (Abb. 4-23). Dagegen trägt das 10G4-Fragment am 5'-Terminus neun Nukleotide des SMART II Oligonukleotids, die auf eine Entstehung während der Erststrangsynthese hindeuten. Das 10G4-cDNA-Fragment repräsentiert daher ein degradiertes oder ein unvollständig revers transkribiertes mRNA-Fragment.

Ependymin ist ein sekretorisches Produkt der Leptomeninx, der innen liegenden Hirnhaut, und bildet den überwiegenden Teil der Glykoproteine in der Cerebrospinalflüssigkeit (zusammengefasst in Schmidt, 1995).

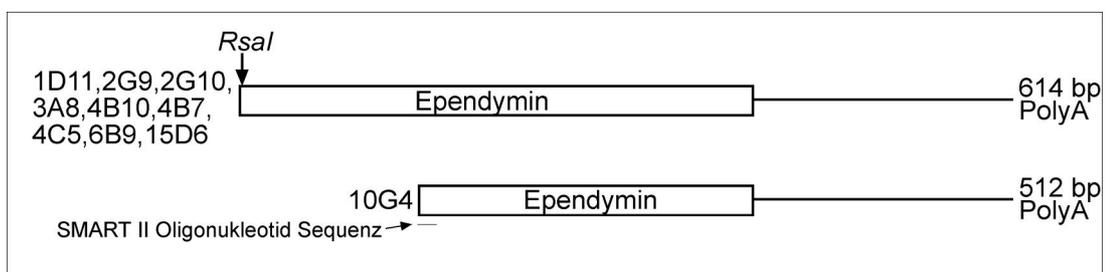


Abbildung 4-23: Schematische Darstellung der mit *ependymin* korrespondierenden cDNA-Fragmente.

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierung

Im „cDNA Southern“ hybridisierte das *ependymin*-Fragment bei 1000 bp stärker (Faktor 1,7) an die cDNA aus dem lateralen Bulbusabschnitt als an die cDNA aus dem medialen Abschnitt (Abb. 4-22). Die differentielle Expression von *ependymin* war damit bestätigt und die Transkripthöhe entsprach der erwarteten Länge (*ependymin* mRNA mit 857 bp zuzüglich 80 bp Adaptersequenz).

Die *in situ* Hybridisierung zeigte ein Signal in der Hirnhaut, die die olfaktorischen Bulbi umgibt (Abb. 4-24A,B). Innerhalb der Leptomeninx war die Expression des *ependymin*-Transkripts medial genauso ausgeprägt wie lateral, so dass hier nicht die Ursache für die differentielle Verteilung liegt. Allerdings überzieht die Leptomeninx beide olfaktorische Bulbi wie ein zusammenhängendes Gewebestück, so dass die innenliegenden medialen Kappen nicht bedeckt werden (Abb. 4-24A). Das differentielle Signal im „cDNA Southern“ und in den Dot Blots wurde also dadurch verursacht, dass in den lateralen Bulbusabschnitten der Anteil der Meninx höher als in den medialen war.

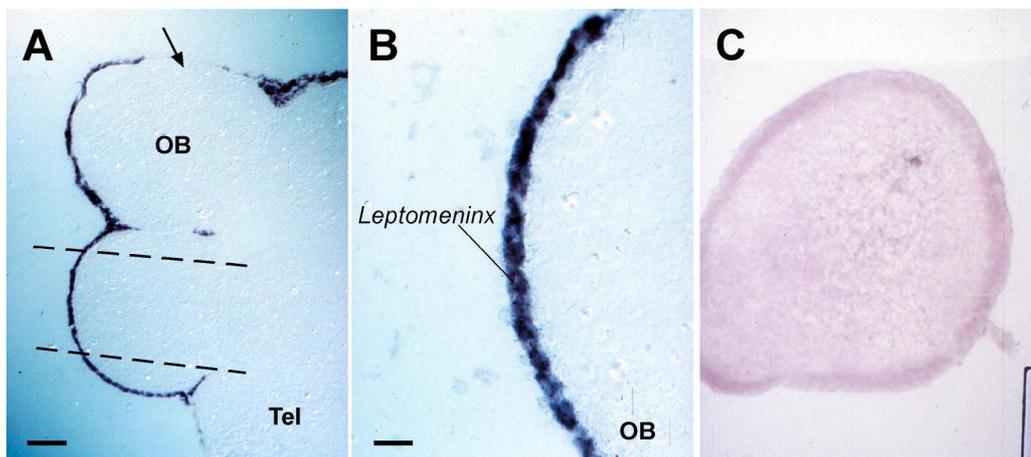


Abbildung 4-24: Lokalisation der *ependymin*-Transkripte im olfaktorischen Bulbus von adulten Zebra-bärblingen mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung. A) Horizontaler Schnitt durch die olfaktorischen Bulbi und das Telencephalon. B) Stärkere Vergrößerung von A). C) Sense-Sonde. Pfeil: artifizielle Unterbrechung der Leptomeninx, die während der Dissektion vorkommen kann; gestrichelte Linien: hypothetische Grenze des „lateralen“ und „medialen“ Abschnitts. Links ist anterior. Der Maßstab beträgt in A) 100 µm, in B) 25 µm und in C) 50 µm. OB: olfaktorischer Bulbus; Tel: Telencephalon.

Da Ependymin in *Danio rerio* gut beschrieben ist, wurde von einer phylogentischen Analyse und *in situ* Hybridisierungen im Embryo abgesehen (Sterrerr *et al.*, 1990; Rinder *et al.*, 1992).

Die Identifizierung von *ependymin* trotz Kontamination der „lateralen“ cDNA-Bibliothek zeigte, dass die Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte grundsätzlich geklappt hatte. Die „laterale“ cDNA, die aus den lateralen Bulbuskappen gewonnen wurde, enthielt vermutlich einen relativ großen Anteil Meninx cDNA, so dass die hohe Redundanz der *ependymin*-Fragmente die hohe Häufigkeit und die differentielle Expression des Transkriptes widerspiegelt.

4.8.3 Das differentielle cDNA-Fragment 8G11 konnte keinem bekannten Gen zugeordnet werden

Sequenzanalyse

Das cDNA-Fragment 8G11 korrespondierte zum 3'-untranslatierten Bereich einer mRNA und ließ keine Rückschlüsse auf die Identität der Sequenz zu.

Die größte Homologie (88 %) konnte auf Transkriptebene mit einem genomischen Klon aus *Danio rerio*, Klon RP71-10G3 (AL590134.7), erreicht werden. Kürzere ähnliche Bereiche wiesen neben weiteren nicht-spezifizierten genomischen DNA-Klonen, die *Danio rerio* Sequenzen *odorant receptor gene cluster* (AF112374.1), *brain cytochrome P450 aromatase (cyp19b)* (AF226619.1), *vitellogenin 3 precursor* (AF254639) und *double-stranded RNA-specific editase (RED1)* (AF124333) auf. Die Vielfalt der Homologen deutete darauf hin, dass es sich bei diesem Abschnitt um ein Sequenzmotiv handelt, das in vielen Transkripten aus *Danio rerio* vorkommt (vgl. 4.8.9).

Suche nach dem kompletten Transkript

In einer 5'-RACE Reaktion (vgl. 3.8.3) konnten keine spezifischen Produkte amplifiziert werden (nicht gezeigt). Um das zu 8G11 korrespondierende Gen zu identifizieren, wurde deswegen die *full-length* „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek mit zwei verschiedenen langen cDNA-Fragmenten durchsucht (Abb. 4-25).

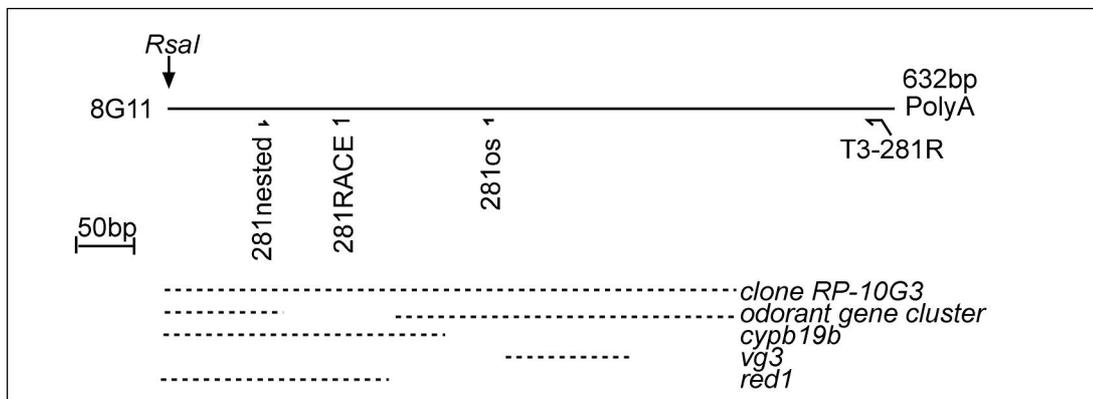


Abbildung 4-25: Schematische Darstellung des 8G11 cDNA-Fragments und homologer Sequenzen.

Im ersten *Screening* wurden mit dem gesamten cDNA-Fragment 8G11 als Sonde rund 240 Kolonien pro Replika-Filter markiert. Fünf ausgewählte Kolonien wurden im *Rescreening* bestätigt und sequenziert. Sie waren zu dem Sequenzmotiv von 8G11 homolog, jedoch nicht zu der 3'-gelegenen Region. Im zweiten Ansatz wurde ein cDNA-Fragment, das mit den Primern 281 Nested und 281os gewonnen wurde, als Sonde eingesetzt. Hier gaben 50 Kolonien auf den Replika-Filtern ein Hybridisierungssignal, aber keine der acht isolierten Kolonien konnte dem 8G11-Fragment zugeordnet werden.

Möglicherweise war die Spezifität der verwendeten Sonden zu gering. Mit einem Fragment, dass hauptsächlich aus den letzten 100 Nukleotiden besteht, könnte vielleicht ein *full-length* Klon isoliert und das zugehörige Gen identifiziert werden.

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierungen

In der „cDNA Southern“ Hybridisierung markierte das 8G11 cDNA-Fragment bei 1,0 kb, 3,5 kb und 3,7 kb die mediale cDNA, während es mit der lateralen cDNA bei 0,8 kb und 3,7 kb zu einem Hybridisierungssignal kam. Auf beiden Spuren kam es zu einem durchgängigen Hintergrundsignal, das vermutlich durch das oben beschriebene Sequenzmotiv entstand. Die Bande auf 3,7 kb war in der lateralen cDNA-Population intensiver als in der medialen. Dagegen war die Bande bei 3,5 kb nur medial detektierbar. Diese differentielle Verteilung von cDNAs, die mit 8G11 korrespondieren, qualifizierte den 8G11-Klon für die weitere Analyse. Allerdings waren die Hybridisierungssignale über den gesamten lateralen und medialen cDNA-Auftrag gesehen etwa gleich intensiv (Faktor 0,8), so dass dieses Fragment entweder in den Dot Blots spezifischer (bevorzugt mit der zum 3,5 kb Transkript korrespondierenden Sonde) hybridisierte oder die differentiellen Signale dort einen artifiziellen Ursprung hatten.

In den *in situ* Hybridisierungen am adulten olfaktorischen Bulbus und Telencephalon zeigte sich, dass die mRNA, zu der das 8G11-Fragment korrespondierte, in allen Zellen im olfaktorischen Bulbus exprimiert wurde (Abb. 4-26). Im Telencephalon wurde das Transkript im ventralen, im dorsalen und im zentralen Kern des ventralen Telencephalons detektiert. Der Verlauf des medialen olfaktorischen Traktes war ausgespart.

Die Expression im olfaktorischen Bulbus spiegelte das Ergebnis des „cDNA Southern“ gut wider, denn eine mediale oder laterale Gewichtung der Expression war nicht zu erkennen. Inwieweit die detektierten Transkripte mit 8G11 oder mit dem Sequenzmotiv korrespondieren, lässt sich ohne weitere Experimente mit spezifischeren Sonden nicht beantworten.

Im Embryo 48 hpf wurden sehr intensive Signale im olfaktorischen Bulbus und im anterioren ventralen Telencephalon detektiert (Abb. 4-26J-L). Diese Färbungen wurden ebenfalls im 72 hpf Embryo beobachtet, fielen hier jedoch deutlich schwächer aus (Abb. 4-26M,N). Möglicherweise konnte die Sonde in dem älteren Embryo nicht ausreichend das Gewebe penetrieren. Gegen diese Annahme spricht, dass längere Sonden in Parallelexperimenten zu intensiven Signalen in den 72 hpf Entwicklungsstadien führten. Eine alternative Erklärung ist, dass das korrespondierende Transkript nur in den früheren Entwicklungsstadien exprimiert wird. Dieses würde jedoch der Situation im adulten *Danio rerio* widersprechen. Die Untersuchung weiterer Gehirnregionen in adulten Zebrafischarten und die Erhöhung der Penetrationsfähigkeit der Sonde in *whole mount* Studien könnten darüber Aufschluss geben.

Außerhalb des olfaktorischen Systems wurden das dorsale Telencephalon (Abb. 4-26I), die trigeminalen Ganglien (Abb. 4-26J) und Zellen in den otischen Vesikeln (Abb. 4-26O) sowie in den Flossenanlagen (Abb. 4-26O) detektiert.

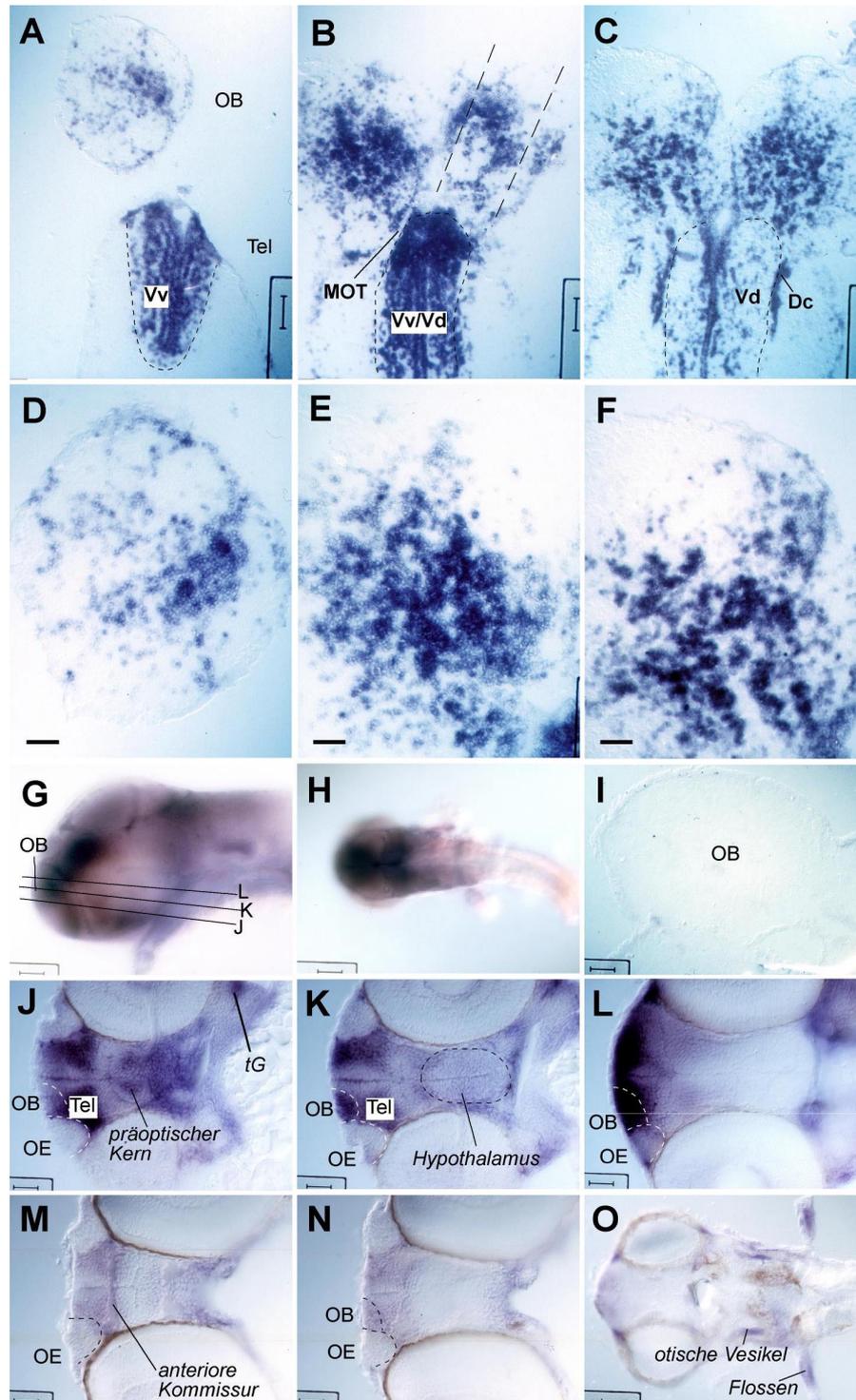


Abbildung 4-26: Lokalisation der mit 8G11 korrespondierenden Transkripte im adulten und embryonalen Zebrafisch mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen. A) bis F) und I) Olfaktorische Bulbi und Telencephalon von adulten Zebrafischen in horizontalen Schnitten. A) und D) Ventraler, B) und E) zentraler, C) und F) dorsaler Schnitt. D) bis F) sind Vergrößerungen von A) bis C). I) Sense Sonde. Gestrichelte Linien: hypothetische Grenzen des lateralen und medialen Bulbusabschnitts. G) und H) und J) bis L) *Whole mount* gefärbte Embryonen, 48 hpf. G) Laterale, H) dorsale *whole mount* Ansicht. J) bis L) horizontale Schnitte. Positionen wie in G) eingetragen. M) bis O) *Whole mount* gefärbte Embryonen, 72 hpf. M) bis O) Ventrale Horizontal-schnitte. Der Maßstab beträgt in A) bis C), H) 100 μm ; in D) bis G), O) 50 μm ; in J) bis N) 25 μm . Die Schnitthöhe beträgt 15 μm . Abkürzungen: Dc: zentraler Kern des dorsalen Telencephalons; MOT: medialer olfaktorischer Trakt; OB: olfaktorischer Bulbus; OE: olfaktorisches Epithel; Tel: Telencephalon; tg: trigeminale Ganglion; V: ventrales Telencephalon; Vd: dorsaler Kern des V; Vv: ventraler Kern des V.

Im Gegensatz zu dem „cDNA Southern“ Ergebnis, deutet die Expression im Nervensystem des Embryos daraufhin, dass die *in situ* Hybridisierung spezifisch war (oder dass das Sequenzmotiv gewebespezifisch ist).

4.8.4 Die differentiell verteilten cDNA-Fragmente 5D10 und 10G2 entsprechen der Histonacetyltransferase TIP60

Sequenz- und phylogenetische Analyse

Die von zwei *RsaI*-Schnittstellen begrenzte Nukleotidsequenz der cDNA-Fragmente 5D10 und 10G2 ließ sich vollständig translatieren (Abb. 4-25A). Die größten Sequenzübereinstimmungen wurden mit dem humanen HIV-1 Tat Interactive Protein (HTATIP; AAH00166.1) und Tat Interactive Protein 60 B aus Ratte (TIP60B; AAK20836.1) gefunden (Tabelle 4-7). HTATIP gehört zu der MYST-Familie (MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, TIP60) der Histonacetyltransferasen (HAT; zusammengefasst in Marmorstein, 2001). Diese Enzyme sind als katalytische Untereinheiten in großen HAT-Komplexen integriert und fördern durch die Acetylierung von Histonen die transkriptionale Aktivität.

Von den 132 Aminosäuren wurden 116 der konservierten HAT-Domäne zugeordnet (Abb. 4-27B).

Im radialen Stammbaum wurde die translatierte cDNA-Sequenz 5D10/10G2 mit einigen der homologen Proteinsequenzen verglichen (Abb. 4-27C). Die neuartige Sequenz aus dem Zebrafisch ordnete sich bei der TIP60-Untergruppe ein und wurde deswegen als *Danio rerio* TIP60 bezeichnet. Die Identitäten zu den anderen TIP60-Sequenzen lagen zwischen 90 und 96 %, während mit den Histonacetyltransferasen aus der HAT-Gruppe nur 66 bis 69 % Übereinstimmung nachgewiesen wurde.

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierung

Die differentielle Expression wurde zunächst im „cDNA Southern“ untersucht (Abb. 4-22). Mit der cDNA-Population, die aus den medialen Abschnitten des *Bulbus olfactorius* gewonnen wurde, hybridisierte das 5D10/10G2 cDNA-Fragment bei 1,7, 1,9, 2,3 und 2,6 kb. Neben den distinkten Banden führte eine schwache Hybridisierung über die gesamte cDNA-Populationen auf beiden Seiten zu einem Hintergrundsignal. Die am intensivsten markierte cDNA konnte bei 2,3 kb ausgemacht werden. Diese Bande könnte *Danio rerio* TIP60 repräsentieren, denn nach der Entfernung der Adaptoren würde die Transkriptgröße gut mit dem größten humanen Transkript (2215 bp) übereinstimmen. Die anderen Banden könnten Spleißvarianten oder Mitgliedern der MYST-Familie entsprechen. TIP60 Spleißvarianten sind bekannt, denn in *H. sapiens* sind bisher vier alternative Varianten nachgewiesen worden (Ran und Pereira-Smith, 2000; Hlubek *et al.*, 2001). Für die Hintergrundhybridisierung an die gesamte cDNA-Population könnten kurze konservierte Bereiche innerhalb der HAT-Domäne verantwortlich sein.

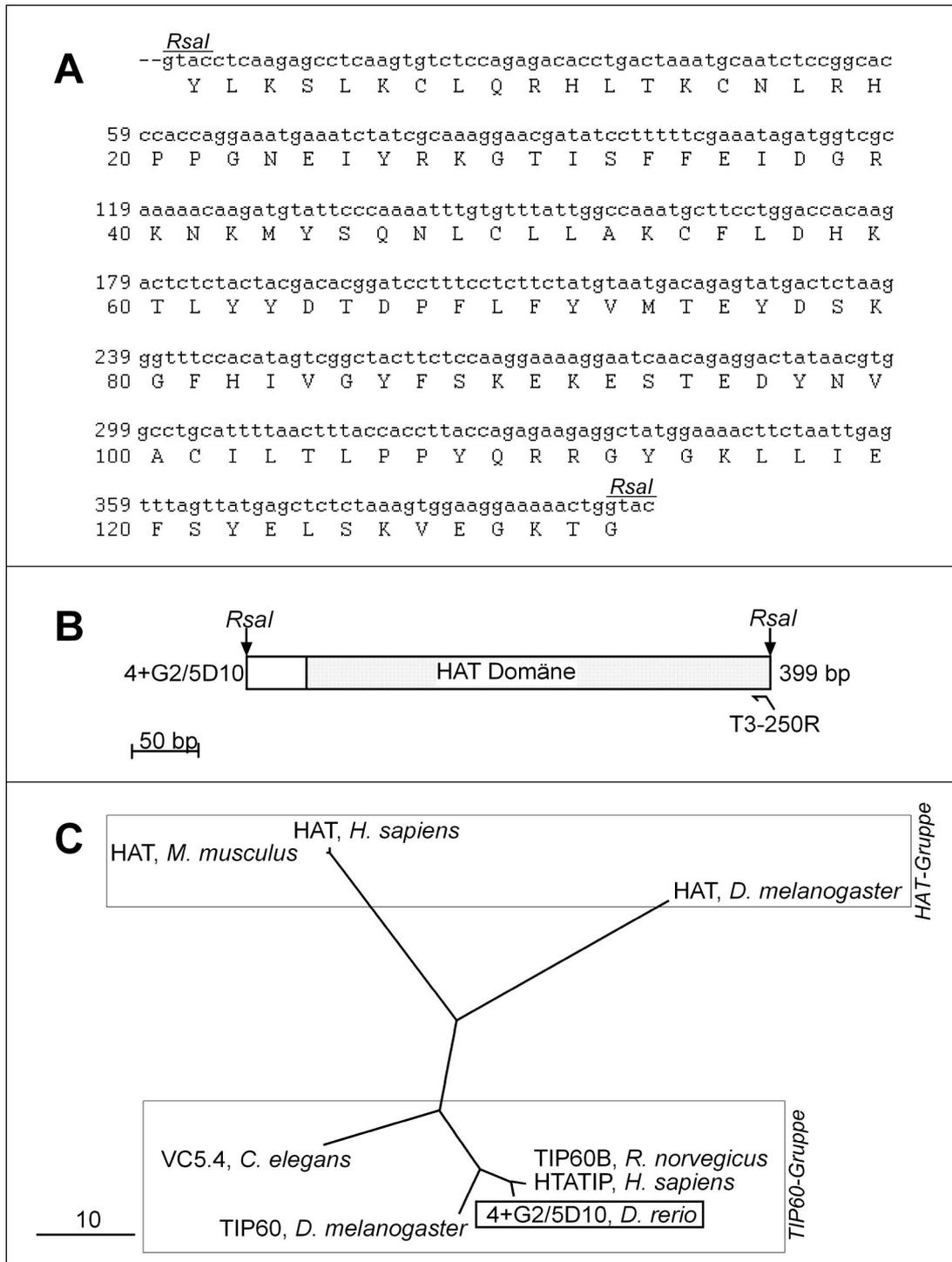


Abbildung 4-27: Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 5D10/10G2 (TIP60). A) Nukleinsäure- und translatierte Peptidsequenz des 5D10/10G2 cDNA-Fragments. B) Schematische Darstellung des 5D10/10G2 cDNA-Fragments. C) Phylogenetischer Stammbaum der TIP60-Proteine und anderen HAT. Der phylogenetische Stammbaum beruht auf einem Sequenzvergleich in ClustalW; alle Proteinsequenzen sind dem 5D10/10G2-Fragment in der Länge angepasst. Die TIP60 Untergruppe ist markiert. Die *Accession* Nummern sind: HTATIP *Homo sapiens* (AAH00166.1), TIP60B Ratte (AAK20836.1), TIP60 hypothetisch *Drosophila melanogaster* (CAA21829.1), Histonacetyltransferase HAT hypothetisch Maus (BAB22680.1), Histonacetyltransferase HAT *Homo sapiens* AF260665.1, Histonacetyltransferase *Drosophila melanogaster* (AAF4428.1), hypothetisches Protein VC5.4 *Caenorhabditis elegans* (T33814). Der radiale Stammbaum wurde mit dem UPGMA Algorithmus erzeugt. Der Maßstrich entspricht 10 Aminosäureauswechslungen pro 100 Reste.

In *in situ* Hybridisierungen mit der etwa 400 Basen langen 5D10/10G2 RNA-Sonde konnte trotz wiederholter Sondensynthese und Variationen in den Konzentrationen kein spezifisches Signal nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die gleichmäßige Färbung könnte wie beim „cDNA Southern“ ein Hintergrundsignal sein, welches eine eventuell vorhandene spezifische Expression verdeckt.

Das Ergebnis der „cDNA Southern“ Analyse konnte für *TIP60* nicht mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen überprüft werden, so dass eine endgültige Verifizierung noch aussteht.

4.8.5 Das differentielle cDNA-Fragment 7F5 entspricht Beta-5 Tubulin

Identifizierung des kompletten Transkripts

Das 657 bp lange cDNA-Fragment 7F5 wurde am 5'-Ende von einer *RsaI*-Schnittstelle und am 3'-Ende von der CDS Primer/ PolyA-Sequenz begrenzt (Abb. 4-29B).

Da für die Nukleinsäuresequenz des cDNA-Fragments 7F5 in der Datenbank des *NCBI* keine übereinstimmenden Sequenzen gefunden werden konnten, und die homologen *Ests* aus *Danio rerio* keine weiteren Informationen über die Identität boten, wurde das 5'-Ende des Transkriptes ausgehend von der „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek mit 5'-RACE amplifiziert (vgl. 3.8.3).

Ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 2 kb wurde amplifiziert (Abb. 4-28A), in einer Hybridisierung mit der 7F5-Sonde bestätigt (Abb. 4-28B) und ligiert. Von 96 Transformationen zeigten in einer bakteriellen Kolonie PCR mit dem RACE 273 und 273 Nested Primer fünf Kolonien die erwartete 200 bp Bande. Aus den Kolonien B3 und F2 konnte mit dem Primerpaar T7 RACE/ 273 RACE ein PCR-Produkt von 2,0 kb amplifiziert werden. Nach der Sequenzierung zeigte sich, dass beide identisch waren und mit der Sequenz von 7F5 überlappen.

Sequenzanalyse des kompletten Transkriptes

Die Klone F2 und 7F5 resultierten in einem 2274 bp langen cDNA-Abschnitt, der zu 84 % mit *beta-2 tubulin* aus *Gadus morhua* (Atlantischer Dorsch ; AF184596) übereinstimmte.

Das offene Leseraster war 444 Aminosäuren lang und zeigte zu Beta-5 Tubulin aus *Xenopus laevis* mit 97 % die höchste Identität (Tabelle 4-7; AAA56751.1). Für weitere Beta-Tubuline wurden Identitäten über 95 % ermittelt.

Allgemein assoziiert jeweils ein Beta-Tubulin mit Alpha-Tubulin zu dem Heterodimer Tubulin, der Baustein der zylindrischen Mikrotubuli-Filamente ist (zusammengefasst in Sullivan, 1988). Mikrotubuli sind involviert in Chromosomaggregation, intrazellulären Transport und die Bildung und den Erhalt der Zellmorphologie. In Vertebraten sind die sehr homologen Beta-Tubuline (4 bis 16 % Divergenz) in sechs Klassen eingeteilt.

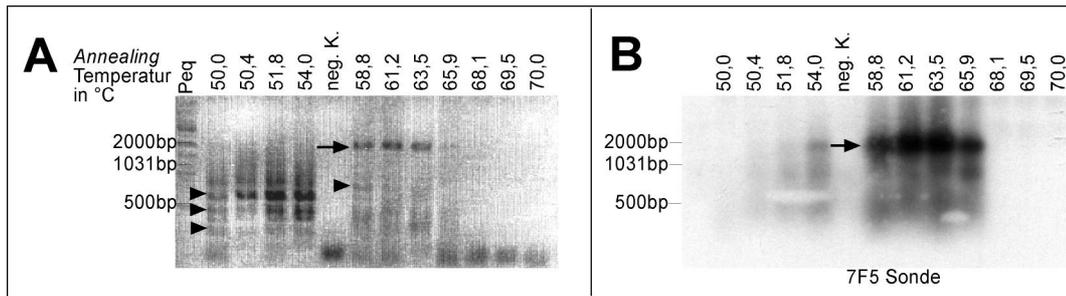


Abbildung 4-28: 5'-RACE des zu 7F5 korrespondierenden Transkriptes und Überprüfung der RACE-Produkte in einer Hybridisierung. A) 5'-RACE Gradienten PCR-Reaktion (50 - 70°C). Als Matrize diente in den 20 µl Ansätzen jeweils 1 µl der 1:100 verdünnten Plasmidpräparation des Filters 1 („Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek). Nach 30 Zyklen wurden 10 µl der Ansätze auf einem 1,0 %igem Agarosegel aufgetrennt. Neben spezifischen Produkten (Pfeil) entstanden bei niedrigeren Temperaturen vermehrt Nebenprodukte (Pfeilköpfe). B) Das 7F5-Fragment detektierte das RACE-Produkt bei 2,0 kb (Pfeil). neg. K.: negative PCR-Kontrolle (ohne Matrize).

Die in der phylogenetischen Analyse verwendeten Algorithmen gaben die Klassenzugehörigkeiten nicht zufriedenstellend wider, da die eng verwandten Klassen I, II und IV (2 bis 4 % Divergenz) nicht getrennt werden konnten. Für die Einordnung der *Danio rerio* Sequenz erwies sich jedoch die Analyse des Carboxy-Terminus und einiger Aminosäurepositionen, die über die Klassen variabel besetzt sind, als geeignet (zusammengefasst in Sullivan, 1988). Da nach der Analyse des Carboxyterminus die Zuordnung nicht eindeutig war (nicht gezeigt), wurde einzelne variable Aminosäuren letztendlich für die Zuordnung herangezogen (Abb. 4-29C). Dadurch konnte das zu 7F5 korrespondierende Protein in die Beta-Tubulin Klasse I eingeordnet werden, der unter anderen Beta-5 Tubulin aus *X. laevis* angehört. Diese Zuordnung wurde durch das Expressionsmuster unterstützt (vgl. 5.3.3).

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierungen

Das cDNA Fragment 7F5 hybridisierte im „cDNA Southern“ bei 3,0 kb, 1,8 kb und zwischen 1,8 und 1,2 kb mit der „medialen“ cDNA. Die Signale waren etwa 2,6 mal intensiver als die Signale, die mit der „lateralen“ cDNA erhalten wurden. Dort hybridisierte das Fragment bei 1,8 und 1,2 kb.

Aus anderen Spezies (Maus, Rind, *H. sapiens*) ist bekannt, dass der 3'-nicht-kodierende Bereich an 1,8 und 2,8 kb lange Transkripte hybridisiert (Lewis *et al.*, 1985, und Referenzen darin). Beide mRNA Spezies werden vermutlich von einem Gen mit zwei alternativen Polyadenylierungsstellen transkribiert, wie es für das humane Gen gezeigt werden konnte. Die Funktion der beiden Transkripte ist unklar.

In adulten Zebrafärblingen hybridisierte die 7F5 RNA-Sonde im olfaktorischen Bulbus an Körnerzellen der inneren Schicht, die sich zu einem größeren Anteil im medialen als im lateralen Abschnitt befinden (Abb. 4-30A-E). Möglicherweise werden die Transkripte zusätzlich in einem medio-lateralen Gradienten innerhalb der Körnerschicht exprimiert, was das Resultat des „cDNA Southern“ erklären könnte. Für die Verifizierung einer graduellen Verteilung wären allerdings genauere Auswertungen notwendig.

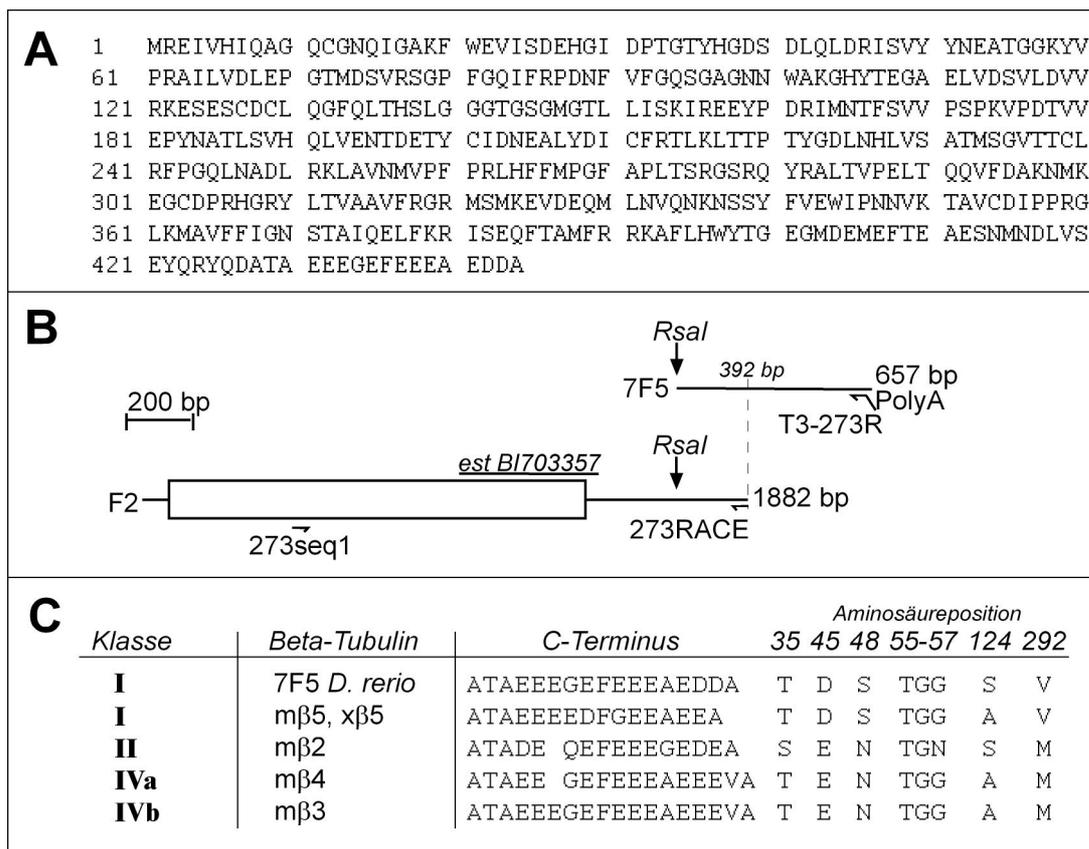


Abbildung 4-29: Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 7F5 (Beta-5 Tubulin). A) Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz. B) Schematische Darstellung des 7F5 und des F2 cDNA-Fragments. C) Übersicht über die Besetzung der variablen Regionen innerhalb der Beta-Tubulin Klassen. Die Sequenzen des C-Terminus wurden in ClustalW ausgerichtet. Die variablen Regionen und Aminosäuresequenz Positionen sind Sullivan (1988) entnommen.

Eine andere Erklärung für die differentielle Hybridisierung im „cDNA Southern“ könnte sein, dass in die Fraktion der medialen Gewebeabschnitte kleine Mengen des Telencephalonventrikels gelangten. Von einer vollständigen Abtrennung des Telencephalons während der Gefrierschnitttherstellung kann nicht ausgegangen werden (vgl. 3.3.2). Der Telencephalonventrikel ist medial am anterioren Rand des Telencephalons lokalisiert. Die Zellschichten um den Ventrikel herum sind die ventrikuläre Proliferationszone, in der die Körnerzellen des olfaktorischen Bulbus gebildet werden (Ekeström *et al.*, 2001). Eine Expression in diesem Bereich weist auf eine denkbare Involvierung in die Neurogenese von Körnerzellen hin.

Während der Entwicklung des olfaktorischen Systems wurde das zu 7F5 korrespondierende Transkript im olfaktorischen Bulbus und im Telencephalon exprimiert (Abb. 4-30J,K,L,O). Im Stadium 48 hpf war der gesamte *Bulbus olfactorius* ebenso wie der anteriore Abschnitt des Telencephalons gleichmäßig gefärbt (Abb. 4-30K,L). Im ventralen Bereich erstreckte sich die Färbung nach caudal bis an den Hypothalamus (Abb. 4-30L). Nach 72 hpf war im Embryo verglichen zu anderen Körperregionen das Vorderhirn verhältnismäßig schwach markiert (Abb. 4-30N,O).

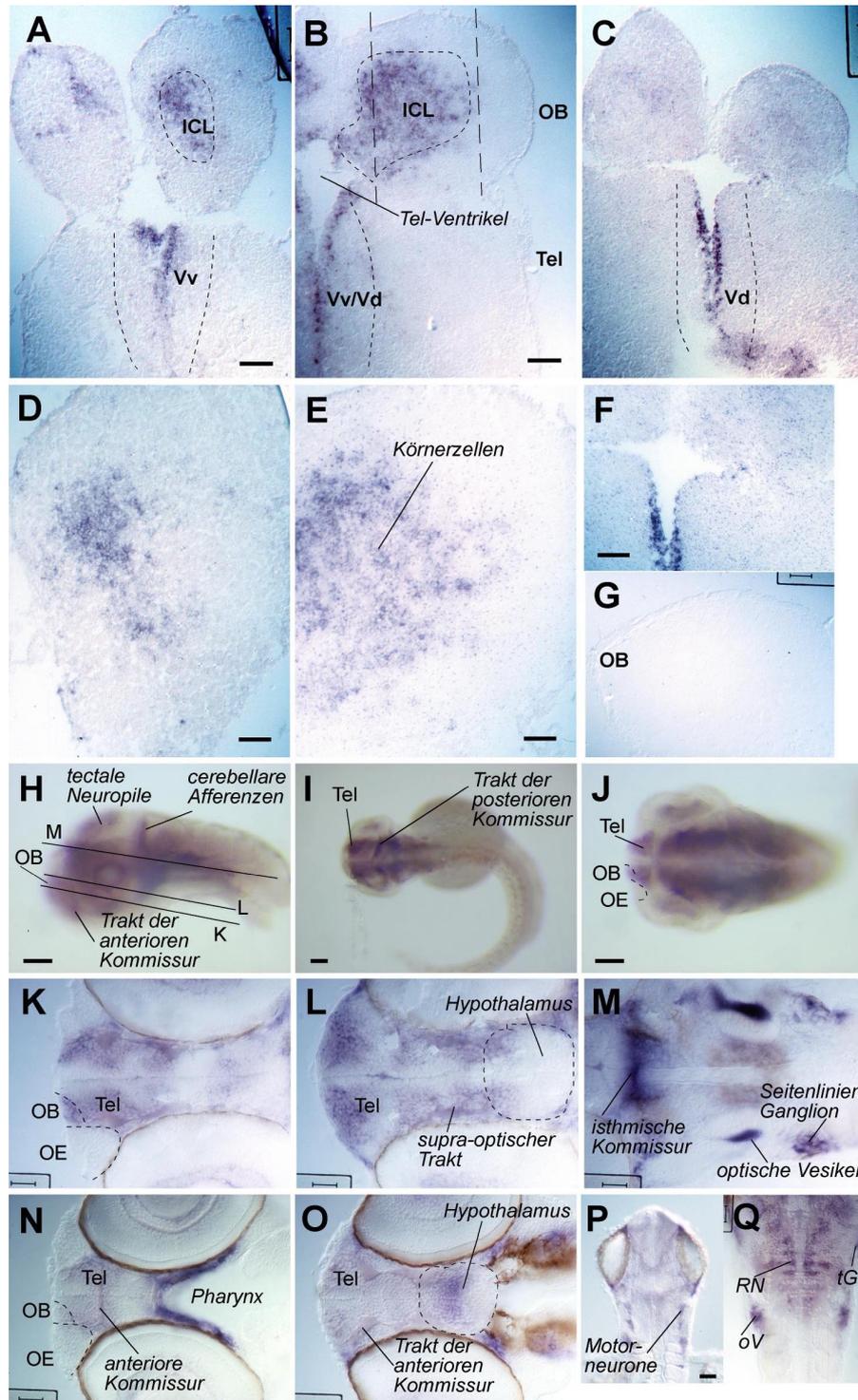


Abbildung 4-30: Lokalisation des *beta-5 tubulin* Transkriptes im adulten und embryonalen Zebra-bärbling mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen. A) bis F) Olfaktorische Bulbi und Telencephalon von adulten Zebra-bärblingen in horizontalen Schnitten. A) und D) Ventraler, B) und E) zentraler, C) und F) dorsaler Schnitt. D) bis F) sind Vergrößerungen von A) bis C). gestricheltete Linie: hypothetische Grenze zu lateraler und medialer Bulbuskappe. H) bis M) *Whole mount* gefärbte Embryonen, 48 hpf. G) Laterale, I) und J) dorsale *whole mount* Ansicht. K) bis M) horizontale Schnitte. Positionen wie in G) eingetragen. N) bis Q) *Whole mount* gefärbte Embryonen, 72 hpf. N) und O) Horizontalschnitte. Der Maßstab beträgt in A) bis C) 100 μ m, in D) bis G) 50 μ m, in H) bis O) und Q) 25 μ m und in P) 50 μ m. Die Schnitthöhe beträgt 15 μ m. A) bis F) anterior ist oben; H) bis O) rostral ist links; P) und Q) rostral ist oben. Abkürzungen: ICL: innere Zellschicht (enthält Körnerzellen); OB: olfaktorischer Bulbus; OE: olfaktorisches Epithel; oV: otischer Vesikel; RN: Rhombomer Neuronen; Tel: Telencephalon; tG: trigeminale Ganglion; V: ventrales Telencephalon; Vd: dorsaler Kern des V; Vv: ventraler Kern des V.

Außerhalb des olfaktorischen Systems waren im Embryo verschiedene Kommissuren und Trakte angefärbt, wie z. B. der Trakt der posterioren Kommissur (nicht gezeigt) und die Isthmische Kommissur (Abb. 4-30M). Des Weiteren wurden detektiert: die tectalen und die cerebralen Neuropile (Abb. 4-30H), medial gelegene Zellen der Rhombomere (Abb. 4-30Q), Zellen im otischen Vesikel (Abb. 4-30Q), das posteriore Ganglion der Seitenlinie (Abb. 4-30G), das trigeminale Ganglion (Abb. 4-30Q) und einige Motorneuronen (Abb. 4-30P).

Die Expressionen im Embryo zeigen, dass *beta-5 tubulin* spezifisch im Nervensystem lokalisiert ist. Der Abfall des Expressionsniveaus vom 48 hpf zum 72 hpf Stadium deuten an, dass das Transkript in die Entwicklung des Nervensystems bzw. die Neurogenese involviert ist.

4.8.6 Das differentielle cDNA-Fragment 7A10 entspricht der neutralen Endopeptidase NEP II

Sequenz- und phylogenetische Analyse

Das cDNA-Fragment 7A10 war auf Nukleinsäure- und Proteinebene zu Neprilysin II homolog (Tabelle 4-4 und 4-7; Abb. 4-31A). Diese M13-Zink Metalloendopeptidase gehört zu der NEP (Neprilysin; neutrale Endopeptidase)/ ECE (Endothelin-Converting Enzyme) Genfamilie (Abb. 4-31B; zusammengefasst in Turner *et al.*, 2001). Die NEP/ ECEs sind in den Metabolismus von vielen regulatorischen Peptiden des Nerven-, des kardiovaskulären und des Immunsystems involviert.

Die phylogenetische Analyse bestätigte, dass das vorhandene cDNA-Fragment zu einer Peptidsequenz gehört, die der Neprilysin II-Gruppe näher als der Neprilysin I-Gruppe steht (Abb. 4-31C). Proteine, die zu der Neprilysin I-Gruppe zählen, waren zwischen 55 und 57 % zu dem mit 7A10 korrespondierenden Transkript identisch, während Mitglieder der NEP II-Gruppe 61 bis 62 % Identität aufwiesen. Das cDNA-Fragment repräsentiert damit vermutlich ein *Danio rerio* Ortholog zu Neprilysin II (NEP II).

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierungen

Im „cDNA Southern“ hybridisierte das 7A10 Fragment bei 2,9 kb geringfügig schwächer an die „mediale“ als bei über 3,0 kb an die „laterale“ cDNA-Population (Abb. 4-22). Die Größen der korrespondierenden cDNAs stimmten gut mit den erwarteten mRNA-Längen (2,3 bis 3,9 kb) überein, die sich an bekannten Homologen aus anderen Spezies orientierten.

Obwohl die mit dem cDNA-Fragment korrespondierenden Transkripte zusammen genommen beurteilt, nicht vermehrt im medialen Bulbusabschnitt anzutreffen waren (Abb. 4-32), wurde die Analyse des cDNA-Fragments aus zwei Gründen fortgesetzt: Zum einen waren die verschieden langen Transkripte einzeln betrachtet differentiell zwischen dem lateralen und medialen Abschnitt des *Bulbus olfactorius* verteilt. Zum anderen wurde mit dem cDNA-Klon

A RsaI
 1 gtacgcgaggcctacctggagttcatggtttcaatggcgaggattgcaaggggaagacaga
 1 V R E A Y L E F M V S M A R I A R E D R

61 aatttgacccaagatgaagagcgtgtgttgaggacatgtctcaagtcctggagctggag
 21 N L T Q D E E R V L E D M S Q V L E L E

121 acagacatcgctaacgctacctcaccagcagaagaacgcaatgacatcactgtgctctac
 41 T D I A N A T S P A E E R N D I T V L Y

181 aacaagatgacgctgaggggaagcgcagaaaaacgttcaacctcaatggctttaactggacg
 61 N K M T L R E A Q K T F N L N G F N W T

241 cgctacatccagggtatcatgtccagcgtgtccatttcagtgcaatcagatgagccatt
 81 R Y I Q G I M S S V S I S V Q S D E P I

301 gttatttactgctccccttacctggagaagctcagcgaggctcctgtccaaacacagccac
 101 V I Y C S P Y L E K L S E V L S K H S H

361 aggactctgcagaactatctggtgtggatgctgatcatggacagggttagcagtatgagc
 121 R T L Q N Y L V W M L I M D R V S S M S

421 cgtcgcttcaaagatgtgagagcgcactatagaaaggctctgcacggcactacagtagaa
 141 R R F K D V R A H Y R K A L H G T T V E

481 gaggctcgggtggagagactgtgtccgatacgttcagggttaacatggagaatgcggtcgga
 161 E A R W R D C V R Y V Q G N M E N A V G

541 gctctatacgtgcgggaaaccttctctggaacagcaaacgcatggtgggagaactgatc
 181 A L Y V R E T F S G N S K R M V G E L I

601 aagaagattcaggaagcttatgtagaaactctggaggaactgagctggatggatgaacag
 201 K K I Q E A Y V E T L E E L S W M D E Q

661 tccaaagtgaaggccagagagaaggccatgcccataatcagaacagattggttatcccgac
 221 S K V K A R E K A M A I S E Q I G Y P D

721 cacatccttgaagagggaaaataagaagctggaccaggaatatgctcaccttaatttcagt
 241 H I L E E E N K K L D Q E Y A H L N F S

781 gagaaaaactacttcgagaacattctggaacacctggcagcatcggcccagaaaggatcat
 261 E E N Y F E N I L E N L A A S A Q K G H

841 aaaaagctgcgggagcccggtgatcctgacatgtggattattggtgcgccagtggtcaac
 281 K K L R E P V D P D M W I I G A A V V N

901 gccttttactcacacaacagaaatcagattgtgtttcctgctggcctcctcaacctcag
 301 A F Y S H N R N Q I V F P A G I L Q P P

961 ttcttcagtgagaaacagctgcaagctctaaactttggaggaatcgggatgggttatagga
 321 F F S E K Q L Q A L N F G G I G M V I G

1021 catgaaatcactcatggatttgatgatcacggccgtaattttgacaaggatggaaacatg
 341 H E I T H G F D D H G R N F D K D G N M

1081 tataactggtggagcaactactctgctgaacgcttcgaggatcagctctaaatgcatggtg
 361 Y N W W S N Y S A E R F E D Q S K C M V

RsaI
 1141 gagcagtac
 381 E Q Y

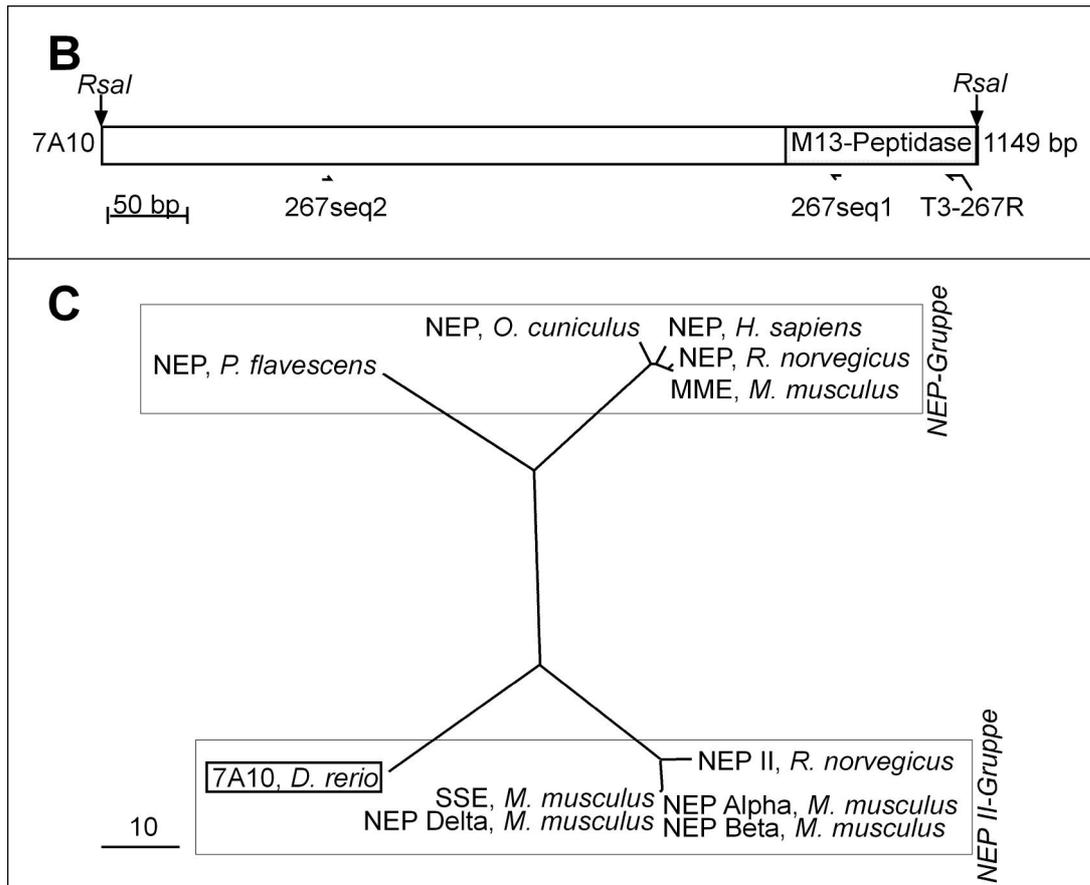


Abbildung 4-31: Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 7A10 (NEP II). A) Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz des 7A10 Fragments. B) Schematische Darstellung der 1149 bp langen Sequenz des 7A10 cDNA-Fragments. Die Sequenz wird durch die *RsaI*-Schnittstellen begrenzt. B) Phylogenetischer Stammbaum der Neprilysine. Der phylogenetische Stammbaum beruht auf einem Sequenzvergleich in ClustalW; basierend auf diesem Alignment wurden die Längen der Proteinsequenzen auf die Länge des 7A10-Fragmentes gekürzt. Die NEP I- und die NEP II-Subfamilienmitglieder sind zusammengefasst. Die *Accession* Nummern sind: NEP II *Rattus norvegicus* (Neprilysin II, Ratte; JC7265), NEP Alpha *Mus musculus* (Neprilysin-ähnliche Peptidase Alpha, Maus; AF302075_1), NEP Beta *Mus musculus* (Neprilysin-ähnliche Peptidase Beta, Maus; AF302076_1), NEP Delta *Mus musculus* (Neprilysin-ähnliche Peptidase Delta, Maus; AF157106.1), SSE *Mus musculus* (lösliche sekretierte Endopeptidase, Maus; NP_038811.1), MME *Mus musculus* (Membran Metalloendopeptidase, Maus; NP_032630.1), NEP *Rattus norvegicus* (Neprilysin, Ratte; NP 036740.1), NEP *Homo sapiens* (Neprilysin; XP_030170.1), NEP *Oryctolagus cuniculus* (Neprilysin, Kaninchen; P08049), NEP *Perca flavescens* (Neprilysin, Flussbarsch; AAC28366.1). Der radiale Stammbaum wurde mit dem UPGMA Algorithmus erzeugt, und der Maßstrich beträgt 10 Aminosäureauswechslungen pro 100 Reste.

7C9 das Proenkephalin Propeptid identifiziert, das für ein Substrat für Neprilysin I kodiert (Roques *et al.*, 1980). Da erwartet wird, dass die Substratspezifität von NEP II der von NEP ähnelt (Ikeda *et al.*, 1999; Ghaddar *et al.*, 2000), wird Proenkephalin möglicherweise auch durch NEP II gespalten und die cDNA-Fragmente 7C9 und 7A10 stehen miteinander in Beziehung.

Im olfaktorischen Bulbus von adulten Zebraquärlingen wurde das zu 7A10 korrespondierende Transkript in Teilen der olfaktorischen Nervenschicht (unter Aussparung des olfaktorischen

Nervs) exprimiert (Abb. 4-32A,D). In dieser Schicht befinden sich neben den olfaktorischen Nervenfasern Gliazellen, die hier vermutlich angefärbt sind.

Die Expression in der inneren Zellschicht, die die Körnerzellen enthält, deutete sich bereits im ventralen Schnitt (Abb. 4-32A,D) an und ist im zentralen Abschnitt prominent (Abb. 4-32B,E). Die Färbung in der Körnerschicht ist inhomogen und besonders am medialen Rand fallen intensiv gefärbtere Zellgruppen auf. Diese Zellen könnten der Ursprung des medialen Signals im „cDNA Southern“ sein, während für das laterale Signal die gleichmäßig gefärbten Körnerzellen verantwortlich sein könnten (Abb. 4-32B,D). Die Zellen in der Nervschicht könnten ebenfalls involviert sein, allerdings machten sie nur einen vergleichsweise geringen Teil der angefärbten Zellen aus und können deswegen nicht die Hauptquelle der Signale im „cDNA Southern“ sein.

Im 48 hpf Embryonalstadium waren im olfaktorischen Bulbus in einer caudal gelegenen Population intensiv und im Telencephalon schwach gefärbte 7A10-positive Zellen detektierbar (Abb. 4-32G,H,I). Im 72 hpf Embryo hatte sich die Färbung im caudalen Bereich des olfaktorischen Bulbus verstärkt (Abb. 4-32N). Während sie dorsal homogen wirkte (Abb. 4-32N), war sie weiter ventral von ungefärbten Abschnitten durchsetzt (Abb. 4-32M). Die markierten Zellen könnten aufgrund ihrer Lokalisation Körnerzellen entsprechen, denn ein Körnerzellmarker führte zu vergleichbaren Färbungen (*dlx2*; A. Celik, 2001).

Vom gleichmäßig angefärbten Telencephalon zogen im 72 hpf Embryo zwei Stränge nach caudal und terminierten in Kernen, die im Grenzbereich zum Diencephalon (Hypothalamus) lagen (Abb. 4-32N). In weiter ventral gelegenen Schnitten wurden Signale im medio-caudalen Telencephalon unmittelbar vor der anterioren Kommissur detektiert (Abb. 4-32M). Wie im adulten *Danio rerio* wurde das Telencephalon im Vergleich zum olfaktorischen Bulbus relativ schwach gefärbt (Abb. 4-32M,N).

Neben den Färbungen im olfaktorischen System wurden im Embryo weitere Strukturen als 7A10-positiv eingestuft. In beiden Entwicklungsstadien waren der optische Stiel (Abb. 4-32H,K) und einige Zellen im dorsalen Hypothalamus (Abb. 4-32K) schwach angefärbt. Auf eine hohe Expression des zu 7A10-gehörigen Transkripts deuteten die Signale in der postoptischen Kommissur (Abb. 4-32K,N), in dem Gewebe um die *Trabeculae* (Abb. 4-32N), beidseitig im ventralen caudalen Mesencephalon (Abb. 4-32J,G), in den otischen Vesikeln und im Hinterhirn hin (Abb. 4-32L).

Die Analyse des NEP II-Transkripts aus *Danio rerio* wies auf seine Involvierung in viele ZNS-Funktionen hin. Der Ursprung der Transkriptvarianten im olfaktorischen Bulbus liegt vermutlich innerhalb der Körnerzellschicht. Während die lateral lokalisierten Zellen gleichmäßig auf einem mittleren Niveau gefärbt werden, zeichnete sich die medial lokalisierte Subpopulation durch eine intensivere Färbung aus.

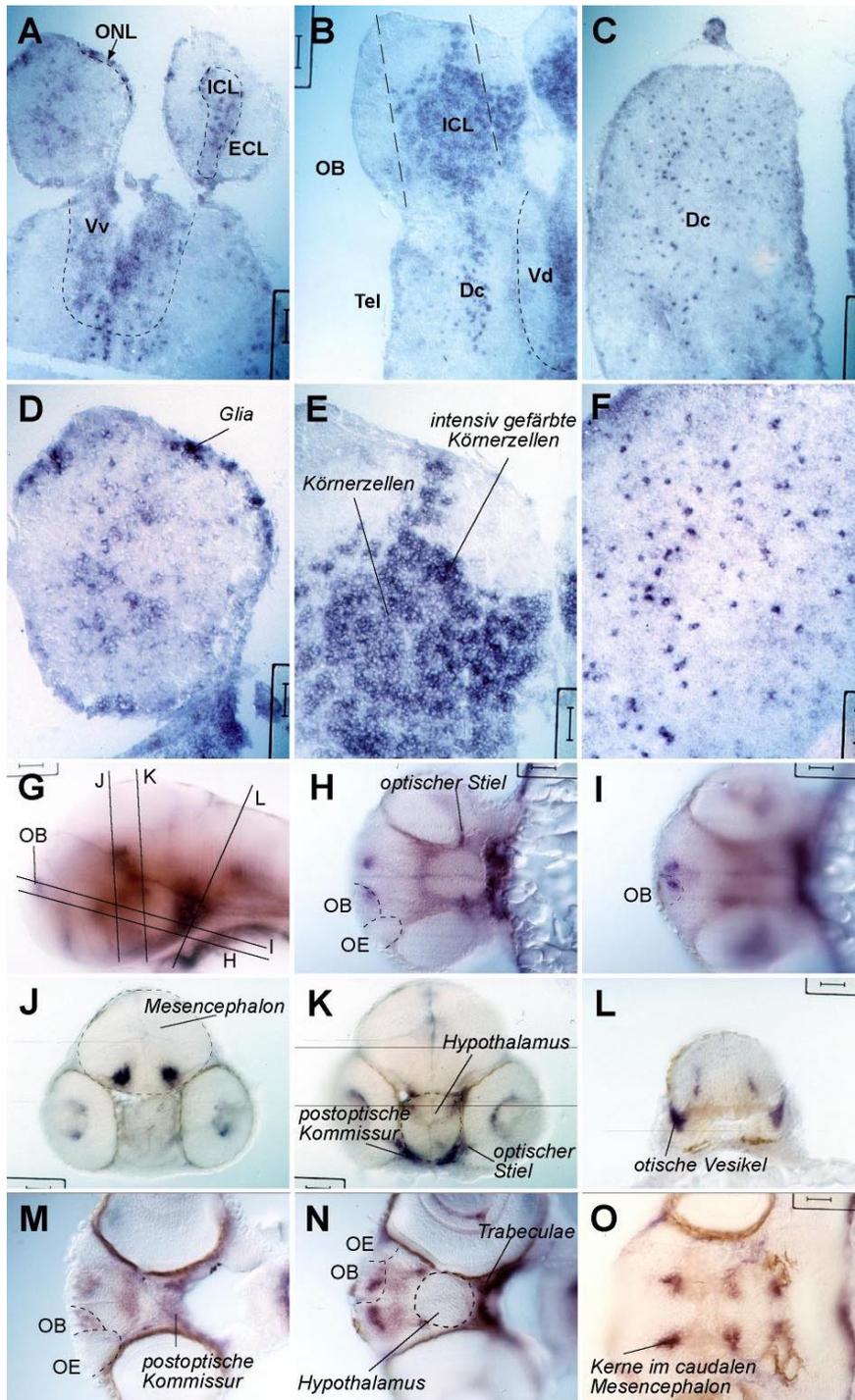


Abbildung 4-32: Lokalisation des *NEPII* Transkriptes im adulten und embryonalen Zebrafisch mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen. A) bis F) Olfaktorische Bulbi und Telencephalon von adulten Zebrafischen in horizontalen Schnitten. A) und D) Ventraler, B) und E) zentraler, C) und F) dorsaler Schnitt. D) bis F) sind Vergrößerungen von A) bis C). Lang-gestrichelte Linien: hypothetische Grenzen des „lateralen“ und „medialen“ Abschnitts. G) bis L) *Whole mount* gefärbte Embryonen, 48 hpf. G) Laterale *whole mount* Ansicht, H) und I) horizontale Schnitte, J) bis L) koronale Schnitte. Positionen wie in G) eingetragen. M) bis O) *Whole mount* gefärbte Embryonen, 72 hpf. M) bis O) Ventrale Horizontalschnitte. Der Maßstab beträgt in A) bis C) 100 μm , in D) bis F) 50 μm und in G) bis O) 25 μm . Die Schnitthöhe beträgt 15 μm . A) bis F) anterior ist oben; G) bis I) und M) bis O) rostral ist links; J) bis L) dorsal ist oben. Abkürzungen: Dc: zentraler Kern des dorsalen Telencephalons; ECL: externe Zellschicht oder Mitralzellschicht; ICL: innere Zellschicht (enthält Körnerzellen); OB: olfaktorischer Bulbus; OE: olfaktorisches Epithel; ON: olfaktorischer Nerv; ONL: olfaktorische Nervschicht; Tel: Telencephalon; V: ventrales Telencephalon; Vd: dorsaler Kern des V; Vv: ventraler Kern des V.

4.8.7 Das differentielle cDNA-Fragment 7C9 entspricht dem Opioidprohormon Proenkephalin

Sequenzanalyse und phylogenetische Analyse

Für die translatierte Peptidsequenz vom cDNA-Fragment 7C9 fand sich die höchste Übereinstimmung (37 % Identität) mit Proenkephalin aus dem australischen Lungenfisch, *Neoceratodus forsteri*, (Tabelle 4-7).

Proenkephalin gehört zur Opioid-Genfamilie, die vier evolutionär konservierte Vorläufermoleküle umfasst: Proenkephalin, Prodynorphin, Proopiomelanocortin und Proorphanin (zusammengefasst in Danielson und Dores, 1999). Jedes Mitglied kodiert für ein Neuropeptidvorläufer Protein, das sechs konservierte Cysteinreste in der N-terminalen Region trägt und für mindestens eine Opioid/Orphanin Kernsequenz kodiert. Die endogenen Opioide sind als Neurotransmitter oder Peptidhormone in Stress, Lernen und Erinnerung sowie in die Regulation der Schmerzempfindung, der Respiration, des Immunsystems und des kardiovaskulären Systems involviert.

In einem Vergleich der sieben bekannten Proenkephalin Proteinsequenzen untereinander wurde deutlich, dass dem translatierten 7C9-Peptid am Aminoterminus das Signalpeptid und zwei der sechs konservierten Cysteinreste fehlen (Abb. 4-33D). Dagegen ist die Proteinsequenz am Carboxy-Terminus komplett und terminiert gemeinsam mit den homologen Sequenzen. Die 216 Aminosäuren des 7C9-Fragments kodieren für vier Met-Enkephaline, ein Leu-Enkephalin und das Heptapeptid Met-Enkephalin-Gly-Tyr, während die anderen Proenkephaline jeweils für insgesamt sieben Neuropeptide kodieren (Abb. 4-33A,C). Die Zusammensetzung variiert hier jedoch unter den Spezies. Im Lungenfisch, in Kröte und Frosch gibt es im Gegensatz zu den Säugern und *Danio rerio* kein Leu-Enkephalin. Für das proteolytische Spalten von Neuropeptiden werden zwei Paare aus basischen Aminosäuren als essentiell angesehen (zusammengefasst in Seidah und Chretien, 1997). In dem vorliegenden Vorläuferprotein-Fragment aus *Danio rerio* sind alle Enkephaline von zwei basischen Aminosäuren begrenzt und deswegen als prozessierbar anzusehen. Dagegen sind in der Froschsequenz vermutlich zwei proteolytische Stellen inaktiviert (Wong *et al.*, 1991).

Die phylogenetische Analyse stellt die Abgrenzung des Proenkephalins aus *Danio rerio* von den bekannten Proenkephalinen aus anderen Spezies anschaulich dar (Abb. 4-33B).

Die Ähnlichkeit bezüglich des Leu-Enkephalins zu den Mammaliern spielt in diesem Sequenzvergleich, der sich über das gesamte Propeptid erstreckt, eine untergeordnete Rolle.

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierungen

Im „cDNA Southern“ hybridisierte das Fragment 7C9 auf einer Höhe von etwa 1,1 kb mit der aufgetragenen cDNA (Abb. 4-22). Die korrespondierende cDNA entsprach in ihrer Laufhöhe etwa der Länge der bekannten Proenkephalin-Transkripte (804 bis 1351 Nukleotide). Das

A

RsaI
 1gtactgtctgcagcagatgcccttcagctcaaacatcttaactcaatagaatgtgtgttg
 1 Y C L Q Q M P L Q L K H L N S I E C V L

62 gagggtgaggagcaaccgaacgcaggcagctcttggagtcagtgcaaacatttcatgcag
 21 E C E E Q P N A G S S W S Q C K H F M Q

122 aatgctgataacagtcctgagggttaaccgagcagccacacaaatcgaacactcaaacagc
 41 N A D N S P E G N R A A T Q I E H S N S

182 caacagcaccaggtagacaaaaaatatggcggcttcatgaaacgttctgaaagttaatc
 61 Q Q H Q V D K K Y G G F M K R S E S L I

242 aagcgttatggaggattcatgaagaaggcagctgaattctatgggctggagtcagaggat
 81 K R Y G G F M K K A A E F Y G L E S E D

302 gttgatcagggcagagcaatcctgactaatcatgatggttgaatgctggccaatcaagtt
 101 V D Q G R A I L T N H D V E M L A N Q V

362 gaggctgacggggagagggaggaagcggctctgacacgttcaaagggagggtgaagagggga
 121 E A D G E R E E A A L T R S K G G E E G

422 actgcaaaacgttatgggggtttatgagaaggggagggctttatgccttggagagtggg
 141 T A K R Y G G F M R R G G L Y A L E S G

482 gttagggaaactgcaaaaacgttatgggggcttcatgaggagagtaggcagaccagattgg
 161 V R E L Q K R Y G G F M R R V G R P D W

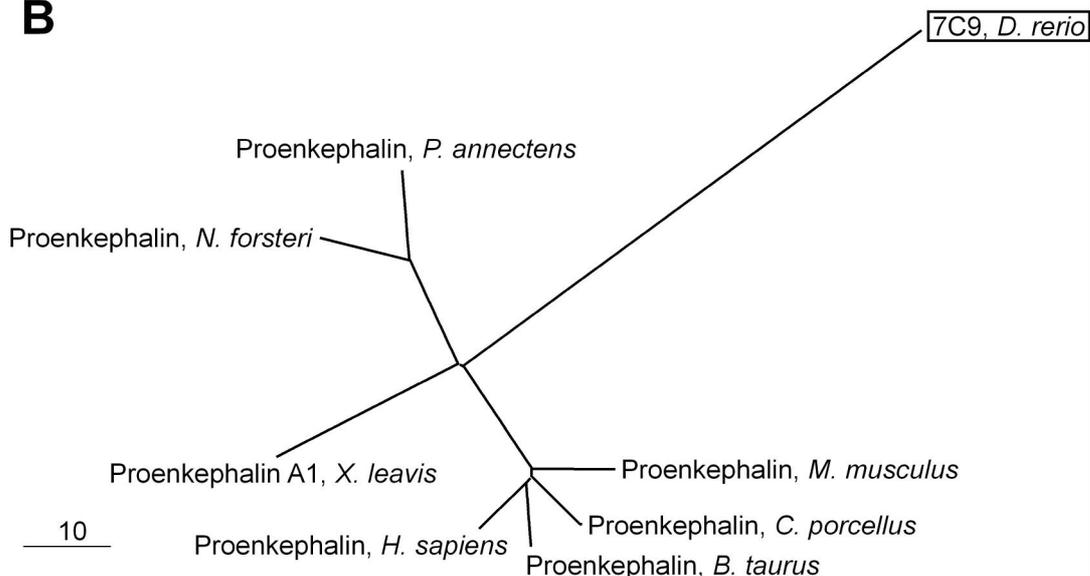
542 tggcaggagtctaaacgttacggaggttctttaaagcggctctcaagagcaagacgaggat
 181 W Q E S K R Y G G F L K R S Q E Q D E D

602 gaaaattcatcagaggtagaaaagaggtatgggtgatttatgggatattaagatgatgtc
 201 E N S S E V E K R Y G G F M G Y *

662 cgcgatgtccaagttcacttcctctttaagataaaaaaacacctgaaaactgaacagaaa

722 atatgcttaaaacacgctaatagttaataaaagtgttcattatgtctttattgtg

782 atggtattgtgtgagtaagaccattttaacagtac
RsaI

B

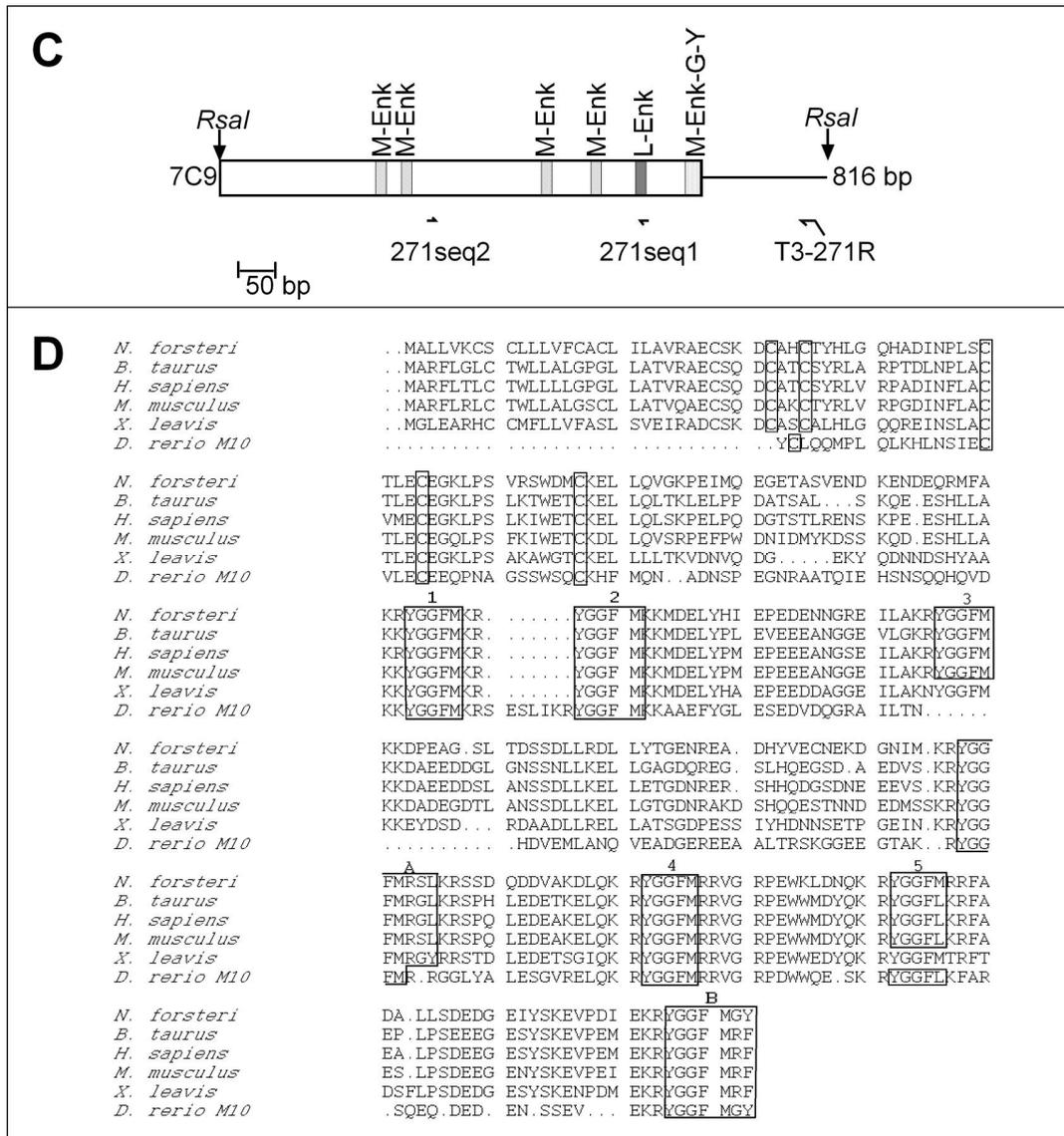


Abbildung 4-33: Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von 7C9 (Proenkephalin). A) Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz des 7C9 cDNA-Fragments. B) Phylogenetischer Stammbaum der Proenkephaline. Der phylogenetische Stammbaum beruht auf einem Sequenzvergleich in ClustalW; alle Proteinsequenzen wurden der Länge des 7C9-Fragments angepasst. Die Accession Nummern sind: Proenkephalin *Neoceratodus forsteri* (Australischer Lungenfisch; AF232671_1), Proenkephalin A *Cavia procellus* (Meerschweinchen; P47969), Proenkephalin A *Bos taurus* (Rind; P01211), Proenkephalin *Spea multiplicata* (Kröte; AF195886_1), Proenkephalin *Homo sapiens* (NP_006202.1), Proenkephalin A *Protopterus annectens* (afrikanischer Lungenfisch; AAF44657.1), Proenkephalin A1 *Xenopus laevis* (Krallenfrosch; P01212) und Proenkephalin A *Mus musculus* (Maus; P22005). Der Maßsstrich entspricht 10 Aminosäureauswechslungen pro 100 Aminosäurereste. C) Schematische Darstellung des Propeptid-Fragments 7C9. D) Ausrichtung der Proenkephalin Peptidsequenzen und des translatierten 7C9 cDNA-Fragments. Die prozessierbaren Neuropeptidsequenzen sind eingerahmt und innerhalb der Sequenz durch zwei basische Aminosäuren vor und hinter dem Peptid begrenzt. 1-4: Met-Enkephalin; 5: Met- oder Leu-Enkephalin; A: Met-Enkephalin-3AS (für 7C9: Met-Enkephalin); B: Met-Enkephalin-2AS; AS: Aminosäure. Das vorgeschlagene Alignment von ClustalW wurde für 7C9 zwischen (5) und (B) so verändert, dass die maximale Übereinstimmung an Aminosäureresten erreicht wurde.

Signal in der medialen cDNA-Population war 3,8 mal so intensiv wie das Signal in der lateralen cDNA-Population. Die differentielle Expression des 7C9-Fragments konnte also auf der cDNA-Ebene bestätigt werden.

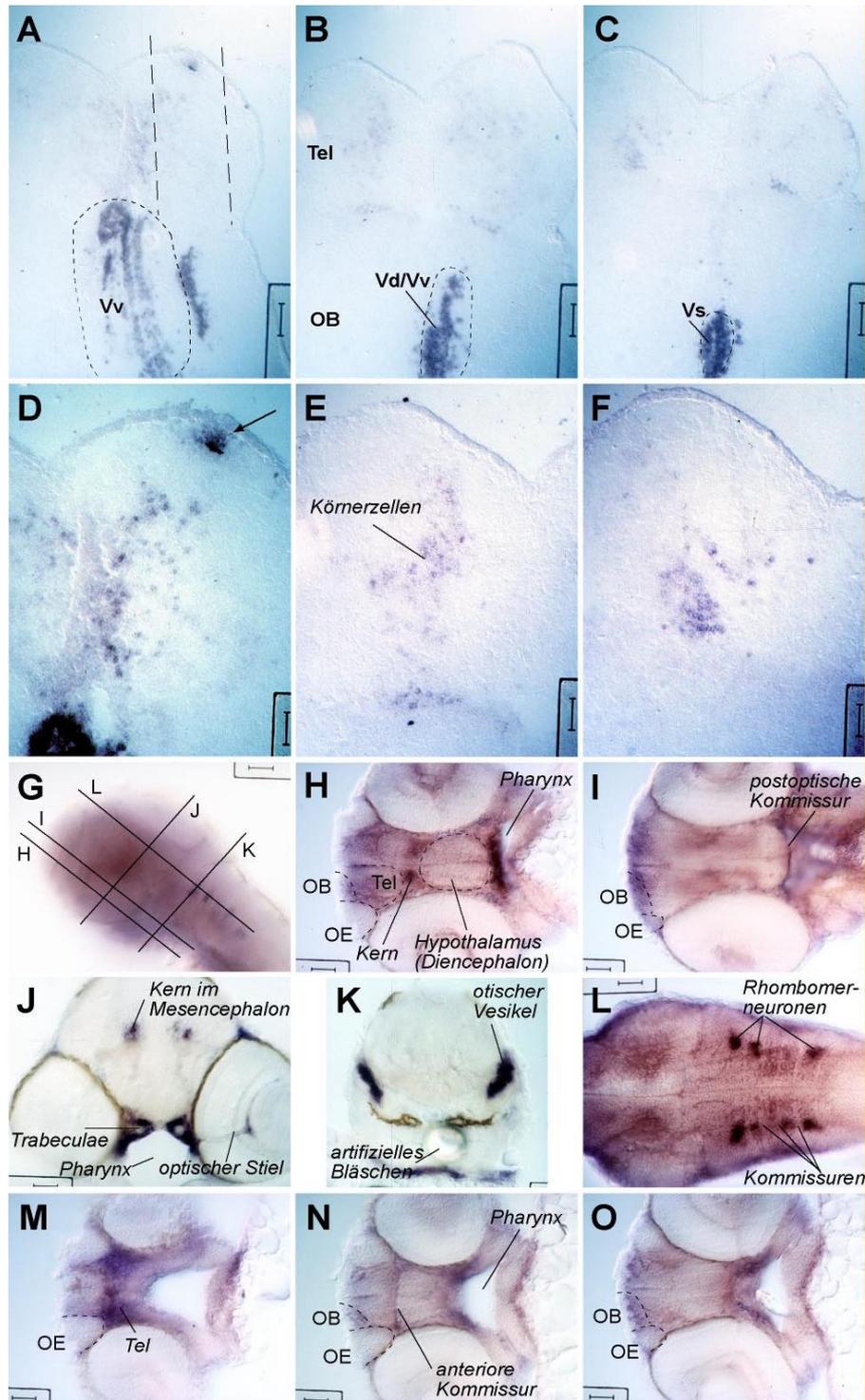


Abbildung 4-34: Lokalisation des *proenkephalin* Transkriptes im adulten und embryonalen Zebra- bärbling mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen. A) bis F) Olfaktorische Bulbi und Telencephalon von adulten Zebra- bärblingen in horizontalen Schnitten. A) und D) Ventraler, B) und E) zentraler, C) und F) dorsaler Schnitt. D) bis F) sind Vergrößerungen von A) bis C). Pfeil: künstliche Färbung. Lang- gestrichelte Linien: hypothetische Grenzen des „lateralen“ und „medialen“ Abschnitts. G) bis L) *Whole mount* gefärbte Embryonen, 48 hpf. G) Laterale *whole mount* Ansicht. H), I), L) horizontale Schnitte, J) bis K) koronale Schnitte. Positionen wie in G) eingetragen. M) bis O) *Whole mount* gefärbte Embryo- nen, 72 hpf. M) bis O) Ventrale Horizontalschnitte. Der Maßstab beträgt in A) bis C) 100 μ m, in D) bis F) 50 μ m und in G) bis O) 25 μ m. A) bis F) anterior ist oben; G) bis I) und L) bis O) rostral ist links; J) und K) dorsal ist oben. Die Schnitthöhe beträgt 15 μ m. Pfeil in K): künstliches Bläschen. Abkürzungen: OB: olfaktorischer Bulbus; OE: olfaktorisches Epithel; Tel: Telencephalon; V: ventrales Telencephalon; Vd: dorsaler Kern des V; Vs: Kern des V oberhalb der Kommissur; Vv: ventraler Kern des V.

Im olfaktorischen Bulbus von adulten *Danio rerio* wurde die zum cDNA-Fragment 7C9 korrespondierende mRNA in einigen Zellen der inneren Zellschicht exprimiert (Abb. 4-34A-F). Im ventralen olfaktorischen Bulbus waren die 7C9-positiven Zellen medial in der Körnerzellschicht lokalisiert und lagen in dem Bereich, der für die Gewinnung der medialen cDNA herangezogen wurde (Abb. 4-34A,D; vgl. auch Abb. 4-35). In dem zentralen und dorsalen Schnitt waren die *proenkephalin*-positiven Zellen hauptsächlich zentral in der Körnerzellschicht lokalisiert und nur sehr gering im lateralen Abschnitt (Abb. 4-34E,F). Also konnte die im „cDNA Southern“ beobachtete differentielle Expression im Gewebe verifiziert werden. Die Expression von *proenkephalin* im Telencephalon wird unten gemeinsam mit der Lokalisation von *NEPII* ausgewertet.

In den Embryonalstadien 48 und 72 hpf wurden die olfaktorischen Bulbi angefärbt (Abb. 4-34H,I,N,O). Vermutlich handelte es sich bei den Zellen um Körnerzellen. In beiden Stadien war das ventrale Telencephalon markiert (Abb. 4-34H,M). Im 48 hpf Stadium fielen zwei 7C9-positive Kerne auf, die an der Grenze zwischen Diencephalon und Telencephalon lagen (Abb. 4-34H). Sie könnten Kerne der sekundären olfaktorischen Projektion im präoptischen Bereich repräsentieren.

Im nicht-olfaktorischen System waren die Zirbeldrüse (nicht gezeigt), die posteriore Kommissur (nicht gezeigt), der optische Stiel (Abb. 4-34J), Kerne im Mesencephalon (Abb. 4-34J), die postoptische Kommissur (Abb. 4-34I), der rostrale Teil des die *Trabeculae* umgebenden Gewebes (Abb. 4-34J) und Zellgruppen in den Rhombomeren (Abb. 4-34L) sowie im otischen Vesikel (Abb. 4-34K) 7C9-positiv.

Zusammengefasst konnte das Vorkommen des *proenkephalin*-Transkriptes in den medialen Bulbusabschnitten in den *in situ* Hybridisierungen bestätigt werden. Ebenso bestätigte sich das niedrige Expressionsniveau. Anhand der Transkriptverteilung im Embryo wurde deutlich, dass die Enkephalin Neuropeptide in viele Prozesse involviert sind.

Vergleich der Expressionen von 7C9 (*Proenkephalin*) und (7A10) *NEP II*

Da mit *NEPII* eine Endopeptidase isoliert wurde, die vermutlich neben anderen Neuropeptiden auch Enkephaline zur Inaktivierung spaltet, wurden die Expressionen von beiden gemeinsam untersucht. In Verbindung mit den bekannten Projektionen könnten die Expressionsmuster Hinweise auf die Funktion von *NEPII* und der Enkephaline im olfaktorischen System geben.

Ventral im olfaktorischen Bulbus überlappt die Expressionsdomäne von *NEP II* mit der von *proenkephalin* (Abb. 4-35A,B). Ob die gleichen oder aneinander grenzende Zellen gefärbt werden, kann hier nicht unterschieden werden. In zwei alternierenden zentralen Schnitten (Abb. 4-35C,D) ist die *proenkephalin* Expression äußerst medial lokalisiert, während die *NEP II* Expression in der gesamten Körnerschicht prominent ist. Beide Expressionsdomänen könnten sich hier partiell überlappen (Abb. 4-35A-D). Weiter dorsal ist die *proenkephalin*

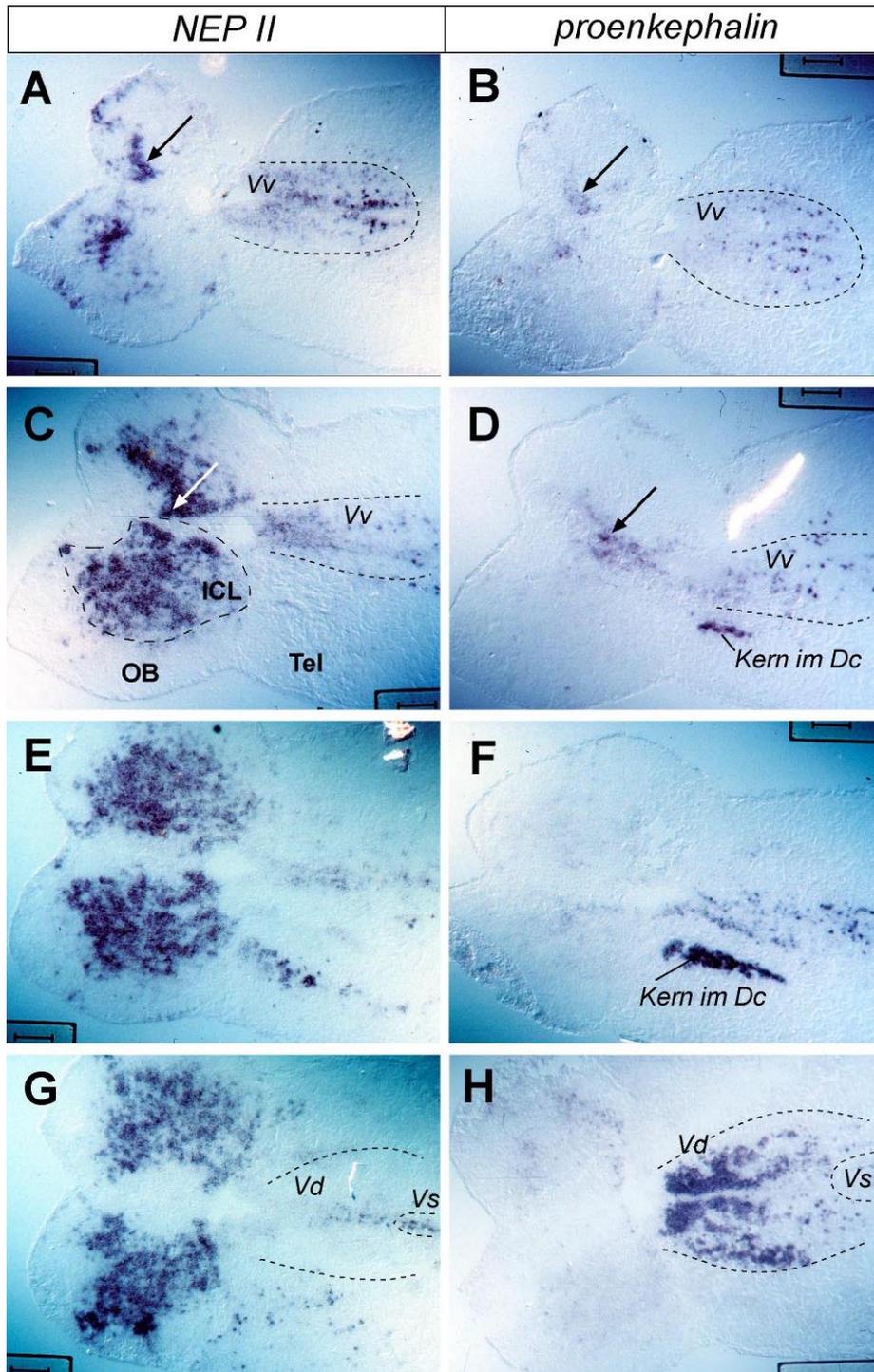


Abbildung 4-35: Lokalisation der *NEP II* und *proenkephalin* Transkripte im adulten Zebrafärbling mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen. A),C),E),G) *NEP II*-Sonde; B),D),F),H) *proenkephalin*-Sonde an Horizontalschnitten von olfaktorischen Bulbi und Telencephalon. Nebeneinander positionierte Bilder stammen von hintereinander liegenden Schnitten. Die Bilder sind von ventral (oberste Reihe) nach dorsal (untere Reihe) sortiert. Anterior ist links. Der Maßstab beträgt 100 μ m und die Schnitthöhe 15 μ m. Pfeil: überlappende Expressionsdomäne. Abkürzungen: Dc: zentrale Zone des dorsalen Telencephalons; OB: olfaktorischer Bulbus; Tel: Telencephalon; V: ventrales Telencephalon; Vd: dorsaler Kern des V; Vs: Kern des V oberhalb der Kommissur; Vv: ventraler Kern des V.

Expression breiter über die Körnerzellschicht verteilt und wird vermutlich vollständig von den *NEP II* exprimierenden Zellen überlagert (Abb. 4-35E-H).

Ebenso wie im olfaktorischen Bulbus überlappen die Expressionsdomänen im Telencephalon teilweise. Im ventralen Telencephalon wurde *NEP II* im ventralen Kern besonders im medialen Bereich exprimiert, während *proenkephalin*-positive Zellen im ventralen Kern hauptsächlich caudal nachgewiesen wurden (Abb. 4-35A,B). In den weiter dorsal gelegenen Schnitten wird *proenkephalin* im dorsalen Kern des ventralen Telencephalons und entlang des medialen olfaktorischen Traktes im Kern in der zentralen Zone des dorsalen Telencephalons exprimiert (Abb. 4-35D,F,H). Unter Ausparung des Kerns des zentralen Telencephalons wird *NEP II* in der zentralen Zone des dorsalen Telencephalons und medial im Kern des ventralen Telencephalon oberhalb der Kommissur detektiert (Abb. 4-35E,G).

Da die Expressionsdomänen in einigen Regionen überlappen und in anderen Regionen komplementär zueinander sind, fällt eine funktionelle Einordnung schwer. Die Mengenverhältnisse im olfaktorischen Bulbus deuten jedoch an, dass für *NEP II* die Enkephaline aus dem hier isolierten Proenkephalin nur ein Substrat unter vielen anderen sein können.

4.8.8 Das differentielle cDNA-Fragment M1 entspricht dem Vorläuferprotein des Neuropeptids Gonadotropin Releasing Hormone

Sequenz- und phylogenetische Analyse

Die von H. Korte (2001) isolierte cDNA-Sequenz wurde am 5'-Ende von den letzten neun Nukleotiden des SMART II Oligonukleotids und am 3'-Ende vom CDS Primer begrenzt (Abb. 4-36A). Das 427 bp lange cDNA-Fragment war damit kein *RsaI*-Spaltprodukt, sondern vermutlich in dieser Form während der Erst-Strangsynthese entstanden (vgl. 3.10.1).

Im Nukleotidsequenzvergleich konnte das cDNA-Fragment M1 der mRNA für *salmon-type gonadotropin releasing hormone* (sGnRH) und *GnRH associated peptide* (GAP) aus *Danio rerio* zugeordnet (AJ304429.1) werden. Beide werden in einem gemeinsamen Propeptid translatiert und proteolytisch zu sGnRH und GAP prozessiert (Abb. 4-36A,B).

Das von M1 abgelesene Peptid terminiert im Gegensatz zu Peptiden aus anderen Spezies nach 72 Aminosäuren, denn an Position 140 erfährt das Leseraster durch das Fehlen eines Restes eine Verschiebung (Abb. 4-36A). Die proteolytische Signalsequenz für die C-terminale Prozessierung von sGnRH und die Kodierung für GAP gehen so verloren.

Salmon-type GnRH ist ein Neuropeptid, das in der Hypophyse eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Hormonen, die die Fortpflanzung regulieren, spielt (Kandel *et al.*, 2000). Es reguliert insbesondere die Synthese von Gonadotropin und dessen Sekretion aus der Hypophyse, beeinflusst die Sekretion von Prolactin, Wachstumshormon und Thyroidea stimulierendem Hormon. Daneben nimmt es an autokrinen und parakrinen Funktionen im zentralen Nervensystem, den Gonaden und an der synaptischen Transmission teil (Baby *et al.*, 2000, und Referenzen darin). Für GAP werden sGnRH-unterstützende Funktionen angenommen (Uzbekova *et al.*, 2001).

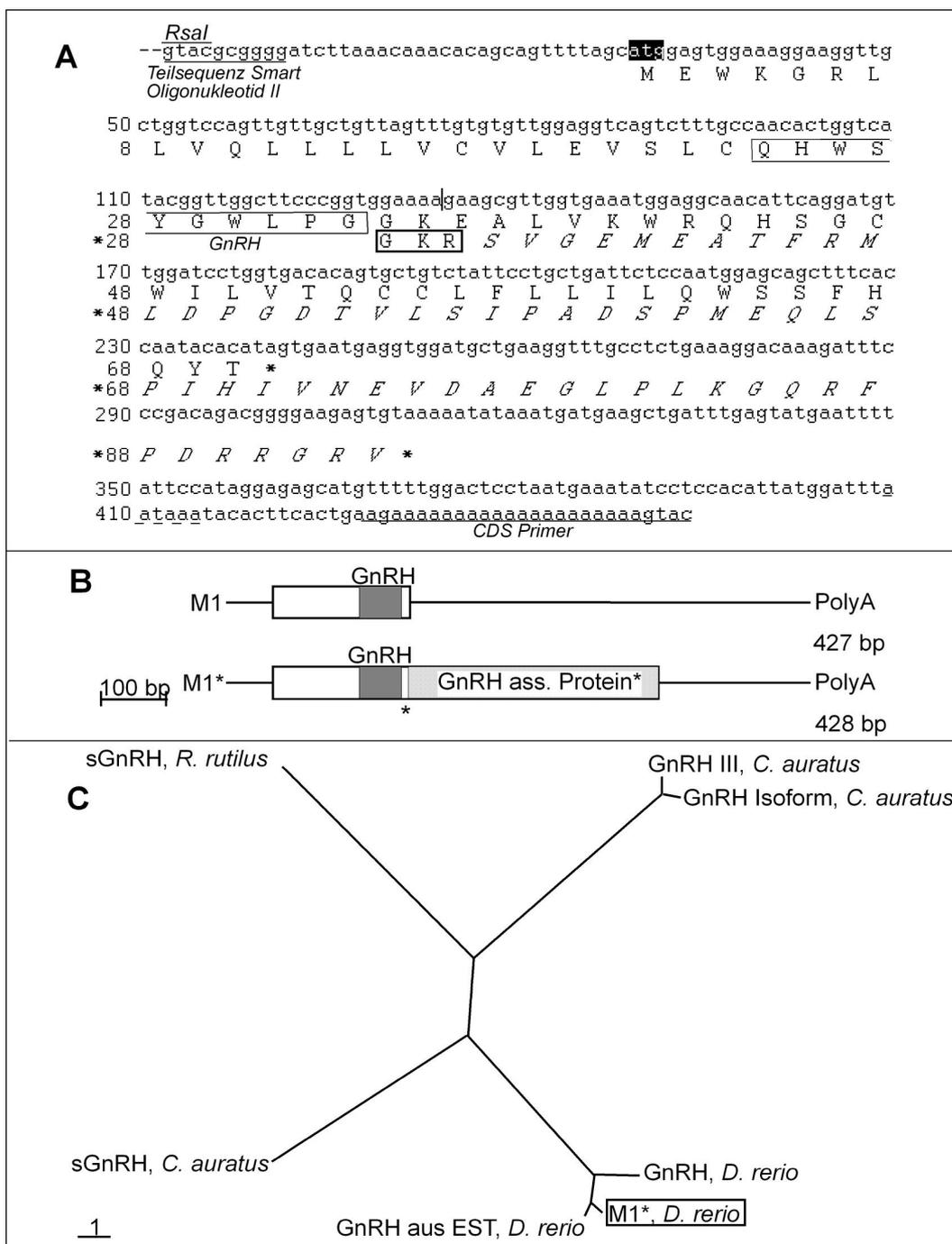


Abbildung 4-36: Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von M1 (sGnRH Vorläuferprotein). A) Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz der cDNA-Fragmente M1 und M1*. Das Einfügen eines Adenosin-Restes verlängerte das Peptid auf 94 Aminosäuren und ermöglichte die Translation des GnRH-assoziierten Peptids (GAP; kursiv). GKR: proteolytische Signalsequenz. B) Schematische Darstellung der Original M1-Sequenz (oben) und der „korrigierten“ M1*-Sequenz, in der die Kodierung von GAP wiederhergestellt ist (GnRH assoziiertes Peptid*). C) Phylogenetischer Stammbaum des „korrigierten“ sGnRH-Vorläufer Peptids M1*. In die M1 cDNA-Sequenz wurde vor der Translation an Position 143 ein Adenosinrest eingefügt. Beide phylogenetischen Stammbäume beruhen auf Sequenzvergleichen in ClustalW; alle Proteinsequenzen wurden dem entsprechenden M1 Peptid angepasst. Die Accession Nummern der GnRH-Vorläufer sind: GnRH aus *Est Danio rerio* (Zebrafisch; BI428567), sGnRH *Rutilus rutilus* (Pflötte; Q92106), GnRH *Danio rerio* (Zebrafisch; CAC18539.1), sGnRH *Carassius auratus* (Goldfisch; BAB18904.1), GnRH *Carassius auratus* (Goldfisch; AAC59888.1), sGnRH Isoform *Carassius auratus* (Goldfisch; BAB18905.1). Der Stammbaum wurde mit dem UPGMA Algorithmus erzeugt. Der Maßstrich beträgt einen Austausch pro 100 Aminosäurereste.

Da ein eingefügtes Adenosin die Spaltsequenz Gly-Lys-Arg und das Leseraster wieder herstellte (Abb. 4-36A), wurden die Verwandtschaftsbeziehungen der korrigierte M1 Sequenz (M1*) und der M1 Originalsequenz zu GnRHs aus anderen Spezies analysiert (Abb. 4-36C). Während die Originalsequenz phylogenetisch weit von den anderen GnRH-Vorläuferproteinen entfernt lag (nicht gezeigt), ordnete sich das mit der cDNA M1* korrespondierende Peptid bei den Isoformen der *Salmon-type* GnRH Peptide Vorläuferproteinen aus *Danio rerio* ein.

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierungen

In der „cDNA-Southern“ Hybridisierung band die M1-Sonde etwa siebenmal stärker an die mediale_{Hälfte} cDNA als an die laterale_{Hälfte} cDNA (Abb. 4-22). M1 korrespondierte also zu einer differentiell exprimierten mRNA. Die Bandenhöhe stimmte gut mit der erwarteten Höhe (*Danio rerio* sGnRH, 430 bp) überein. Sie lag bei 600 bp und war durch die Adaptoren der cDNA Amplifikation im Vergleich zur nativen mRNA um 80 bp verlängert.

Die Resultate der *in situ* Hybridisierungen sind unter 4.8.9 dargestellt.

4.8.9 Das differentielle cDNA-Fragment M10 entspricht einem RFamid Vorläuferprotein

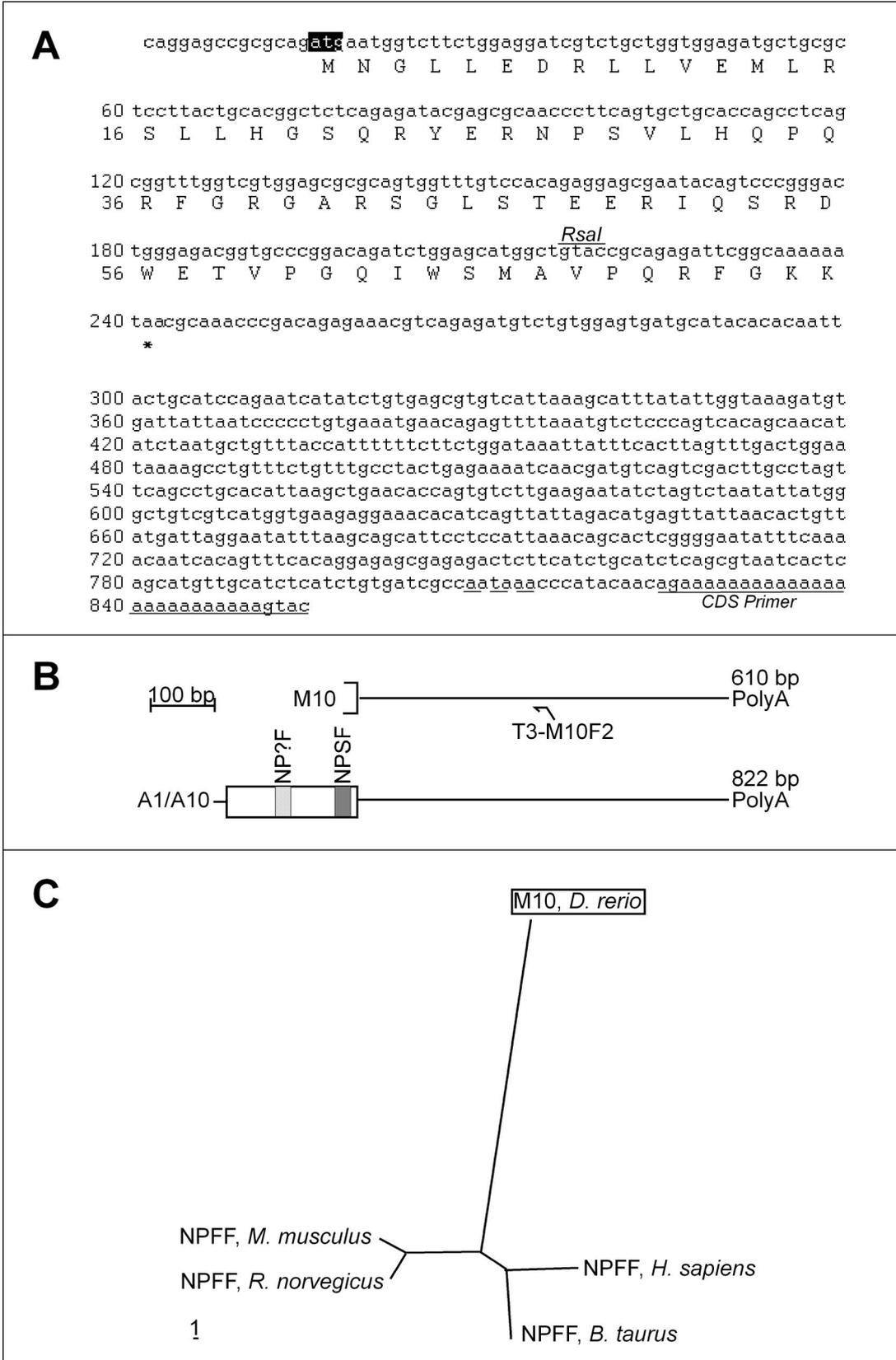
Sequenzanalyse

Der cDNA-Klon M10 wurde von H. Korte isoliert und sequenziert (2001). Das vollständig sequenzierte 610 Basenpaaren lange cDNA-Fragment war am 5'-Ende von einer *RsaI*-Schnittstelle und am 3'-Ende von einem PolyA-Schwanz begrenzt.

Unter den bekannten Genen war eine genomische Sequenz aus *Danio rerio* mit 84 % über 107 Reste am homologsten (AL590146.2). Daneben wiesen weitere Klone genomischer DNA aus *Danio rerio*, *bone morphogenetic protein 4* mRNA, *placitin* mRNA und *hematopoietic transcription factor GATA-1* mRNA (alle aus *Danio rerio*) in dem gleichen Bereich Übereinstimmungen zwischen 83 und 82 % auf. Vermutlich handelt es sich bei diesem Bereich um eine Sequenz, die für *D. rerio* spezifisch ist. Möglicherweise ist es ein sich wiederholendes und springendes Element, von denen angenommen wird, dass sie etwa 10% des Genoms von *Danio rerio* ausmachen (Izsvak *et al.*, 1996).

Identifizierung des kompletten Transkriptes, Sequenz- und phylogenetische Analyse

Um Aufschlüsse über die Identität von M10 zu erhalten, wurde die „Zebrafish Brain“ cDNA-Bibliothek durchsucht. Nachdem in einem ersten *Screening* mit dem gesamten cDNA-Fragment nur Klone (etwa 240/ Replikafilter) gefunden werden konnten, die Übereinstimmungen mit dem oben beschriebenen Sequenzmotiv zeigten, führte ein zweites *Screening* mit einer verkürzten Sonde (Primerpaar T3-M3F2/ T3-M10F) zu fünf Signalen pro Replikafilter, von denen M10A zu M10 homolog war.



D

	Signalpeptid			
<i>H. sapiens</i>	MDSRQAAALL	VLLLLI.DGG	CAEGPGGQQE	.DQLSAEEDS EPLPPQDA..
<i>B. taurus</i>	MDARQAAALL	LVLLLVTDWS	HAEGPGGRDG	GDQIFMEEDS GAHPAQDA..
<i>R. norvegicus</i>	MDSKWAAVLL	LLLLLR.NWG	HAEEAGSWGGE	.DQVFAEEDK GPHPSQYAHT
<i>M. musculus</i>	MDSKWAAALL	LLLLLL.NWG	HTEEAGSWGGE	.DQVFAGEDK GPHPPQYAH
<i>D. rerio M10</i>	MNGLLEDRL	V.....

	A			
<i>H. sapiens</i>QTSGSL	LHYLLQAMER	PGRSQAFLLFQ	PQRFGRNTQG SWR.NEWLSP
<i>B. taurus</i>QTPRSL	LRSLLOAMQR	PGRSPAFLLFQ	PQRFGRNTRG SWS.NKRLSP
<i>R. norvegicus</i>	PDRIQTPGSL	MRVLLQAMER	PRRNPAPLLFQ	PQRFGRNAWG PWS.KEQLSP
<i>M. musculus</i>	PDRIQTPGSL	FRVLLQAMDT	PRRSPAPLLFQ	PQRFGRSAWG SWS.KEQLNP
<i>D. rerio M10</i>EM	LRSL LHGSQR	YERNPSVLHQ	PQRFGRGARS GLSTEERIQS

	B			
<i>H. sapiens</i>	RAGEGLNSQF	WSLAAPQRFG	KK	
<i>B. taurus</i>	RAGEGLSSPF	WSLAAPQRFG	KK	
<i>R. norvegicus</i>	QARE.....F	WSLAAPQRFG	KK	
<i>M. musculus</i>	QARQ.....F	WSLAAPQRFG	KK	
<i>D. rerio M10</i>	RDWETVPGQI	WSMAVPQRFG	KK	

Abbildung 4-37: Schemata zur Sequenz- und phylogenetischen Analyse von M10 (RFamid Vorläuferprotein). A) Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz von M10A. B) Schematische Darstellung des NPVF Neuropeptid Vorläuferproteins M10A und des M10-Fragmentes. Vorhergesagte Neuropeptide sind markiert (vgl. Text). NPVF: VLHQPQRFamid; NPNF: NPSVLHQPQRFamid; NPRF: TVPGQIWSMAVPQRFamid. C) Phylogenetischer Stammbaum der Neuropeptid FF und VF Vorläuferproteine. Der phylogenetische Stammbaum beruht auf einem Sequenzvergleich in ClustalW. Die Accession Nummern sind: FMRF-related peptides precursor *Bos taurus* (NPFF, Rind; Q9TUX7), Neuropeptide FF-amide peptide precursor *Rattus norvegicus* (NPFF, Ratte; NP_072108), Neuropeptide FF-amide peptide precursor *Mus musculus* (NPFF, Maus; NP_061257), FMRFamide-related protein precursor *Homo sapiens* (NPFF; NP_003708). Der Stammbaum wurde mit dem UPGMA Algorithmus erzeugt. D) Ausrichtung der M10A Aminosäuresequenz und der homologen Vorläuferproteine. Amino-terminal fungiert ein Arginin-Rest (schwarz hinterlegt) als Spaltensignal und Carboxy-terminal ein Glyzin-Rest (grau hinterlegt) gefolgt von einem basischen Rest (Arginin oder Lysin). A: erstes Neuropeptid; B: zweites Neuropeptid; beide hypothetisch, siehe Text.

Die vollständige cDNA-Sequenz war 826 bp lang und kodierte für ein 75 Aminosäurereste langes Peptid (Abb. 4-37A,B,D). Mit 32 identischen und 40 konservativ ersetzten Aminosäuren war FMRFamide-Related Peptide Precursor/ Neuropeptide FF (NPFF) Precursor aus Rind (AF148699.1) das ähnlichste bekannte Peptid (Tabelle 4-7).

Die FMRFamid-ähnlichen Peptide sind mit den Opioiden verwandt und werden wie sie als Prohormone translatiert. Während in Mollusken Peptide mit einer C-terminalen FMRFamid-Sequenz nachgewiesen werden konnten, bildet in den Vertebraten „RFamid“ den Konsensus der Peptide. Die Lokalisation der Peptide im Gehirn und ihre vielfältigen Effekte nach entsprechender Applikation (Inhibierung der Morphin-induzierten Analgesie, Modifizierung der elektrischen Aktivität von Neuronen des Rückenmarks, Auswirkungen auf den Blutdruck) lassen vermuten, dass sie als Neuromodulatoren und Neurotransmitter fungieren (zusammengefasst in Vallarino *et al.*, 1998).

An der Erkennung der proteolytischen Spaltstelle sind am Carboxy-Terminus ein Glyzin-Rest, der posttranskriptionell zur Bildung der Amidgruppe benötigt wird, und eine darauf folgende basische Aminosäure (Lys oder Arg) beteiligt. Am Amino-Terminus sind eine oder zwei basische Aminosäuren (Arg, Lys-Lys, Lys-Arg) in die Spaltung involviert (Loi und Tublitz, 1997).

Anhand dieser Kriterien und im Vergleich mit bekannten RFamiden konnte für den *Danio rerio* RFamid Vorläufer die Prozessierung von zwei Neuropeptiden vorhergesagt werden (Abb. 4-37D). Trotz der Konservierung der basischen Aminosäuren divergiert das erste resultierende Neuropeptid zwischen den Spezies in seiner Länge um drei Aminosäuren. Diese Unbestimmtheit verhindert eine genaue Vorhersage der Länge des zu erwartenden ersten Neuropeptids aus der Nukleinsäuresequenz, bei dem es sich deswegen entweder um ein Octapeptid (VLHQQRFamid) oder um ein Unodecapeptid (NPSVLHQQRFamid) handelt. Die kürzere Sequenz würde dem Neuropeptid FF aus Rind entsprechen, während die längere Variante Ähnlichkeit mit dem Neuropeptid SF aus *Homo sapiens* besäße. Für das zweite Neuropeptid kann von einem Pentadecapeptid ausgegangen werden.

In der phylogenetischen Analyse zeigte sich eine große Distanz zwischen den Neuropeptid Vorläuferpeptiden der Säugetiere und dem Prohormon aus *Danio rerio* (Abb. 4-37C).

Expressionsanalyse: „cDNA Southern“

Im „cDNA Southern“ hybridisierte das cDNA-Fragment M10 sechsmal so stark an die cDNA-Population, die aus der medialen Hälfte des olfaktorischen Bulbus gewonnen wurde, als an die aus der lateralen (Abb. 4-22). Das Signal setzte sich aus zwei Banden zusammen, die bei 1,0 und bei 1,3 kb liefen. Möglicherweise handelt es sich um zwei alternativ gespleißte Formen des RFamid Vorläufer Proteins.

In situ Hybridisierung: Vergleich der sGnRH und RFamid Vorläufer-Transkripte

Die *in situ* Hybridisierungen mit M1 und M10 zeigten identische Expressionsmuster und eine Coexpression der *sGnRH* und *RFamid Vorläuferprotein* Transkripte in ein und derselben Zellgruppe wurde mit Hilfe von alternierenden Schnitten gezeigt (Abb. 4-38). Die beobachtete Coexpression stimmt mit immunohistochemischen Lokalisationen von sGnRH und FMRFamide-Like Peptide in Teleostier überein (Stell *et al.*, 1984; Chiba *et al.*, 1997).

Die *sGnRH*- und das *RFamid Vorläuferprotein* Transkripte wurden im adulten Zebrabärbling in Zellgruppen im olfaktorischen Bulbus und im Telencephalon exprimiert. Im olfaktorischen Epithel und Nerv konnten mit beiden Sonden keine Zellen detektiert werden (nicht gezeigt). Im olfaktorischen Bulbus waren die vergleichsweise großen Zellen in der äußeren Schicht, der olfaktorischen Nervenschicht, lokalisiert (Abb. 4-38, Abb. 4-39). Im anterioren olfaktorischen Bulbus bildeten sie einen prominenten Kern und zogen dann in einer Kette caudalwärts auf der medialen Seite des olfaktorischen Bulbus entlang (Abb. 4-39A,D). Der Kern lag auf der medialen Seite vom olfaktorischen Nerv (Abb. 4-38A,B). Dadurch wurden die differentiellen Expressionen im „cDNA Southern“ bestätigt, denn der olfaktorische Nerv diente als Grenzmarkierung zwischen der medialen und lateralen Hälfte. Im anterioren Telencephalon bildeten die sGnRH- und RFamid-positiven Zellen einen weiteren Kern (Abb. 4-38A,B) und

in einigen Präparaten konnte auf der Höhe des zentralen Ventrikels des ventralen Telencephalons noch ein weiterer Kern lokalisiert werden (nicht gezeigt).

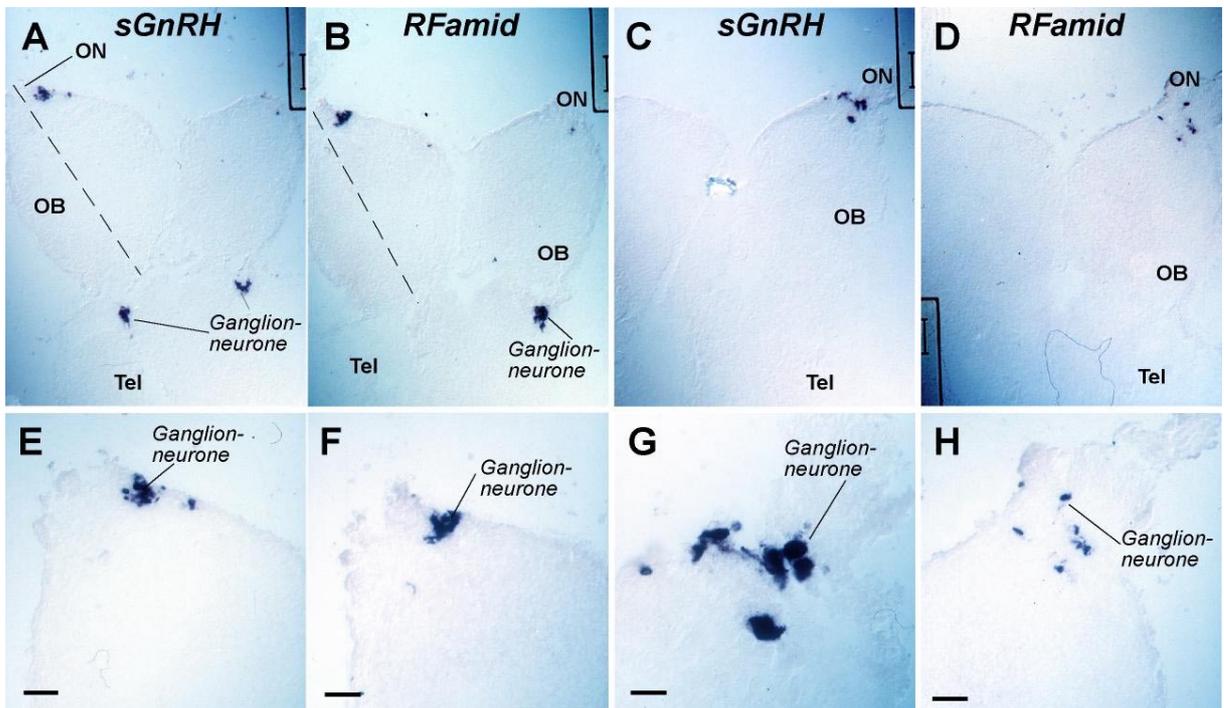


Abbildung 4-38: Lokalisation der *sGnRH* und *RFamid* Vorläuferprotein Transkripte im olfaktorischen System von adulten Zebrafählingen mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen. Horizontalschnitte durch olfaktorische Bulbi und Telencephalon. A), C), E), G) *sGnRH* Detektion; B), D), F), H) *RFamid* Detektion. A) und B) nebeneinander liegende Schnitte; C) und D) ebenso. E) bis H) sind stärkere Vergrößerungen aus A) bis D). Der Maßstab entspricht 100 μm in A) bis D), 50 μm in E) und F), 25 μm in G) und H). OB: olfaktorischer Bulbus; ON: olfaktorischer Nerv; Tel: Telencephalon.

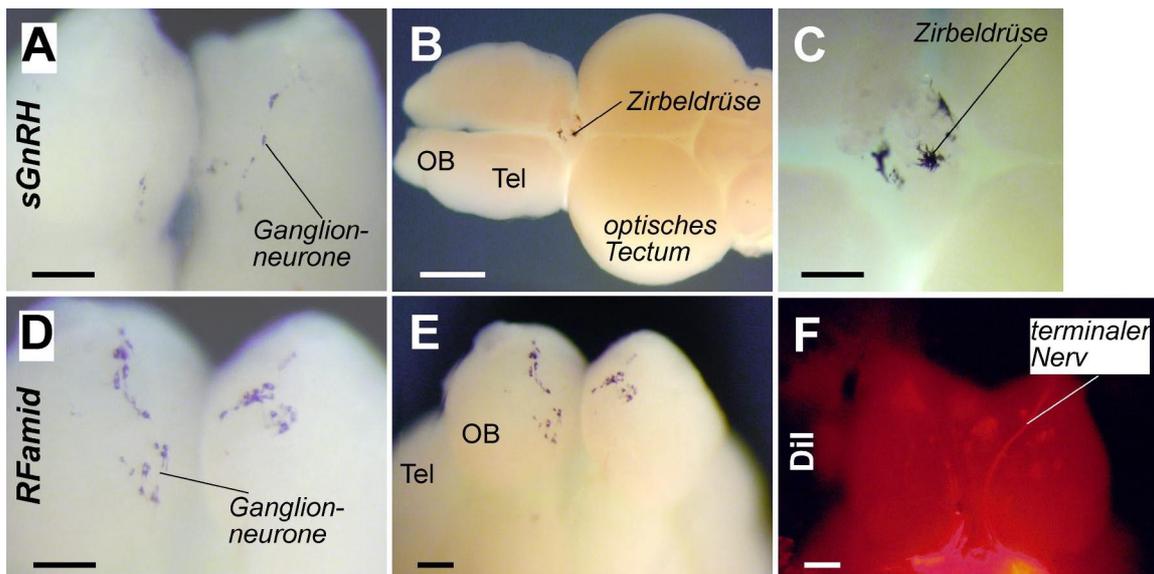


Abbildung 4-39: Lokalisation der *sGnRH* und *RFamid* Vorläuferprotein Transkripte in *whole mount* Präparaten. A) bis C) *sGnRH* Detektion; D) und E) *RFamid* Detektion; F) retrograde Markierung des terminalen Nervs durch Dil-Anfärbung des medialen Traktes (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Lieberoth (1999)). Der Maßstab beträgt 100 μm .

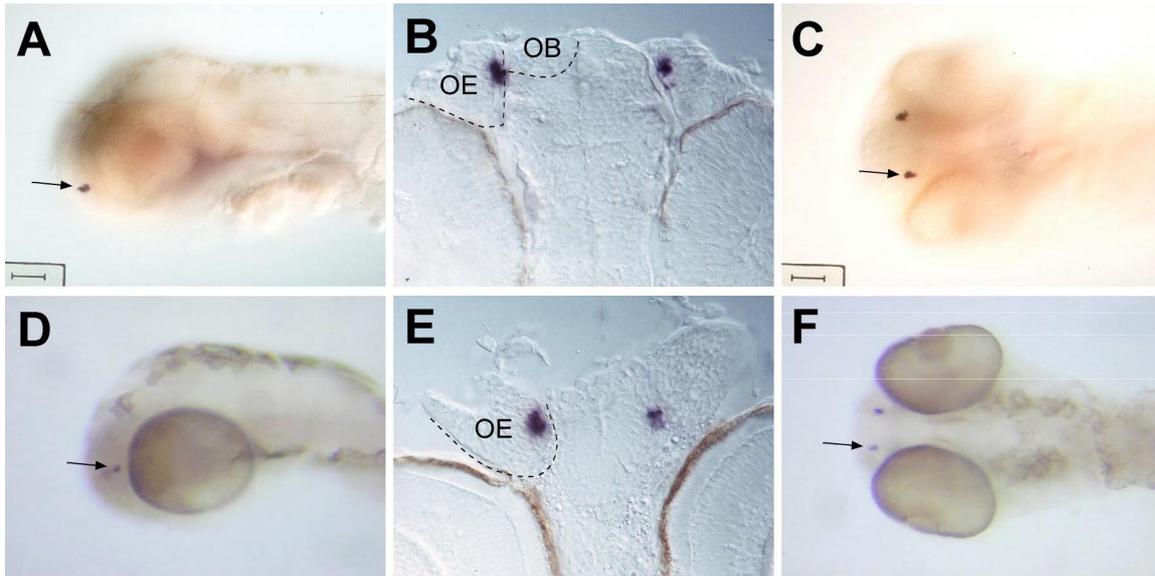


Abbildung 4-40: Lokalisation der *sGnRH* Transkripte in 48 und 72 hpf Zebrafärblingen mit Hilfe von *whole mount in situ* Hybridisierungen. A) bis C) 48 hpf Stadium. A) Laterale Ansicht, B) horizontaler Präparatschnitt, 15 µm Schnitthöhe, C) ventrale Ansicht, D) bis F) 72 hpf Stadium. D) Laterale Ansicht, E) horizontaler Präparatschnitt, 15 µm Schnitthöhe, F) ventrale Ansicht. Pfeile : markierte Zellen; OB: olfaktorischer Bulbus; OE: olfaktorisches Epithel.

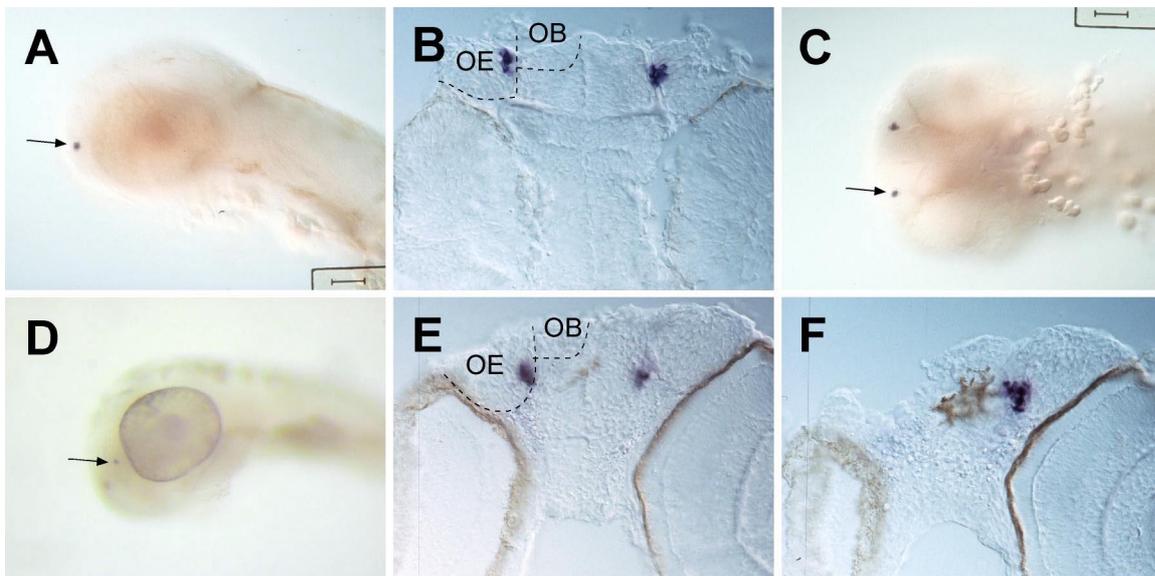


Abbildung 4-41: Lokalisation der *RFamid Vorläuferprotein* Transkripte in 48 und 72 hpf Zebrafärblingen mit Hilfe von *whole mount in situ* Hybridisierungen. A) bis C) 48 hpf Stadium. A) Laterale Ansicht, B) horizontaler Präparatschnitt, 15 µm Schnitthöhe, C) ventrale Ansicht. D) bis F) 72 hpf Stadium. D) Laterale Ansicht, E) horizontaler Präparatschnitt, 15 µm Schnitthöhe, F) ventraler Nachbar zu E), 15 µm Schnitthöhe. Pfeile: markierte Zellen; OB: olfaktorischer Bulbus; OE: olfaktorisches Epithel.

Zwischen einzelnen Präparaten schwankte die Größe der Kerne im Bulbus und Telencephalon. Eine Abhängigkeit vom Geschlecht konnte jedoch nicht festgestellt werden. Für eine genauere Analyse wäre die Untersuchung von Zebrafärblingen unterschiedlichen Alters notwendig.

In *whole mount in situ* Hybridisierungen konnten *sGnRH*- und *RFamid Vorläuferprotein* exprimierende Zellen zusätzlich in der Zirbeldrüse von adulten *Danio rerio* nachgewiesen werden (Abb. 4-38B,C). Sie sind, anhand ihrer Morphologie und Position beurteilt, neuronalen Ursprungs.

Expressionsanalyse am Embryo

In den untersuchten Embryonalstadien 48 und 72 hpf wurden *sGnRH* und *RFamid Vorläuferprotein*-positive Zellen nur medio-basal im olfaktorischen Epithel detektiert (Abb. 4-40 und Abb. 4-41). Sie bildeten dort ein Cluster, das im 48 hpf Stadium aus genau vier und im 72 hpf Stadium aus sechs bis acht markierten Zellen bestand.

Der terminale Nerv verläuft ventro-medial auf der Oberfläche des olfaktorischen Bulbus. Seine Lokalisation zum überwiegenden Teil in der medialen Hälfte des Bulbus, erklärt die Identifizierung des *sGnRH* und *RFamid Vorläuferproteins* als differentiell exprimierte Transkripte, die in den Ganglien des terminalen Nervs coexprimiert werden. Die Ergebnisse aus dem „cDNA Southern“ hatten also die Verteilung der Transkripte im Gewebe gut wiedergegeben. Die Lokalisation der Transkripte im Embryo zeigte, dass in frühen Stadien *sGnRH* und *RFamid Vorläuferprotein* exprimierende Zellen ausschließlich im olfaktorischen System vorkamen.

4.8.10 Zusammenfassende Darstellung der analysierten differentiell verteilten Transkripte

Zusammen mit zwei differentiell verteilten cDNA-Fragmenten, die aus einer subtrahierten cDNA-Bibliothek von H. Korte (2001) stammen, wurden die in dieser Studie isolierten differentiellen cDNA-Fragmente näher charakterisiert. Die Sequenzanalyse und die *in situ* Hybridisierungen im olfaktorischen Bulbus und im Embryo gaben Hinweise auf die Identität der korrespondierenden Transkripte, ihre Lokalisation im Gewebe, ihre Regulation und ihre Funktion.

Anhand der Sequenzanalysen wurde deutlich, dass keines der cDNA-Fragmente mit bekannten Wegfindungsmolekülen korrespondierte.

Die *in situ* Hybridisierungen bestätigten die differentielle Expressionen, die in den „cDNA Southern“ beobachtet wurden, und zeigten, dass die meisten Transkripte in neuronalen Geweben exprimiert wurden.

Zwei Transkripte (die *RFamid* und *sGnRH Vorläuferproteine*) wurden in den Ganglienzellen des medial verlaufenden terminalen Nervs detektiert. *Ependymin* wurde in der Meninx, die zu einem größeren Teil in den lateralen als in den medialen Gewebeabschnitten enthalten war, nachgewiesen. *Beta-5 tubulin* wird besonders anterior in der ventrikulären Proliferationszone des Telencephalons exprimiert, die einen kleinen Anteil an der medialen Gewebefraktion be-

sitzt. Eine mögliche graduelle Expression in der Körnerzellschicht bedarf jedoch weiterer Analysen. Die Expression von *proenkephalin* gibt ein Beispiel für die Expression in einer Subpopulation der Körnerzellen, die hauptsächlich medial und zentral lokalisiert ist.

Ausgehend von einer sehr kleinen Menge neuronalen Gewebes gelang es zunächst, intakte cDNA zu amplifizieren. Diese wurde anschließend für die Herstellung subtrahierter cDNA-Bibliotheken in die *Suppression* subtraktive Hybridisierung eingesetzt. Nach dem differentiellen *Screening* der cDNA-Bibliotheken wurden Kandidaten isoliert, die möglicherweise differentiell exprimiert waren. Ihre differentielle Verteilung wurde in „cDNA Southern“ und *in situ* Hybridisierungen überprüft und verifiziert. Die SSH war also insgesamt in der Lage, aus zwei cDNA-Gemischen, die aus sehr geringen Mengen neuronalem Gewebe mit Hilfe einer Amplifizierungsreaktion gewonnen wurden, differentiell verteilte cDNA-Fragmente anzureichern. Die meisten der isolierten Transkripte ging jedoch eher auf geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der zu vergleichenden Gewebeabschnitte (*ependymin*, *beta-5 tubulin*, *sGnRH Vorläuferprotein*, *RFamid Vorläuferprotein*) als auf eine räumlich regulierte Expression innerhalb einer Zellpopulation zurück (*proenkephalin*). Allerdings zeigte die Identifizierung von *proenkephalin*, dass die Körnerzellen in verschiedenen Subpopulationen organisiert sind und dass solche Expressionsunterschiede mit der SSH identifizierbar sind.

5 Diskussion

Der Wegfindungsmechanismus der Riechsinneszellfortsätze zu ihren Zielregionen im olfaktorischen Bulbus ist ein interessantes und herausforderndes Problem in der Erforschung des olfaktorischen Systems. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Expression der Geruchsrezeptoren instruktiv wirkt, aber nicht die einzige Quelle für die topographische Information sein kann. Im olfaktorischen Bulbus werden Signale erwartet, die einzeln oder in ihren Kombinationen alle Zielregionen spezifisch, d.h. für die Axone der Riechsinneszellen unverwechselbar, beschreiben. Da diese Neuronen kontinuierlich regeneriert werden, sollten die Positionsmarker auch im adulten Tier exprimiert werden. Nach der induzierten Degeneration der Neuronen bilden sich nahezu alle Projektionen innerhalb einer kurzen Zeit wieder neu, so dass hier durch die hohe Aktivität eine veränderte Markerexpression im olfaktorischen Bulbus erwartet werden kann.

Die Identifizierung dieser Positionsmarker oder Wegfindungsmoleküle im olfaktorischen Bulbus unter Nutzung ihrer postulierten Eigenschaften könnte zur Aufklärung des Wegfindungsmechanismus der olfaktorischen Rezeptorneuronen beitragen.

In dieser Studie sollten differentiell exprimierte Transkripte im olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* isoliert werden, um unter ihnen möglicherweise Wegfindungsmoleküle zu identifizieren. Die Transkripte sollten aufgrund ihrer differentiellen Expression im olfaktorischen Bulbus während der induzierten Regeneration der Riechsinneszellen oder aufgrund ihrer räumlichen Verteilung zwischen zwei Bulbusregionen mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung identifiziert werden.

5.1 Sechs im olfaktorischen Bulbus differentiell exprimierte Transkripte wurden identifiziert

Mit Hilfe der *Suppression* subtraktiven *Hybridisierung* (SSH) war es möglich, sechs Transkripte zu identifizieren, deren Expression im olfaktorischen Bulbus räumlich reguliert war. Vier der Transkripte wurden in unterschiedlichen Häufigkeiten in der lateralen und der medialen Bulbuskappe gefunden, während für zwei Transkripte eine räumlich regulierte Expression von Transkriptvarianten nachgewiesen werden konnte. Daneben wurden zwei Transkripte, die von H. Korte (2001) isoliert wurden, identifiziert und ihre differentielle Lokalisation im Gewebe bestätigt.

Die Sequenzanalysen der sechs differentiell exprimierten Transkripte zeigten jedoch, dass unter ihnen keine Wegfindungsmoleküle waren. Darüber hinaus muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass der Anteil der identifizierten differentiell verteilten cDNA-Fragmente in der „lateralen“ und in der „medialen“ cDNA-Bibliothek weniger als 1 % betrug. Eine noch

geringere Ausbeute deutete sich in der „Regenerations“ cDNA-Bibliothek an, woraufhin die Fortführung der Analyse dort abgebrochen wurde.

Unter der Voraussetzung, dass es differentiell exprimierte Wegfindung im olfaktorischen Bulbus gibt, wurde ihr Nichterkennen vermutlich unmittelbar durch die geringe Anzahl der isolierten differentiellen cDNA-Fragmente verursacht. Deswegen ist ein Schwerpunkt der folgenden Diskussion die geringe Effizienz in der Identifizierung von differentiell exprimierten Transkripten.

Trotz der geringen Effizienzen kann der Einsatz der SSH in dieser Studie insgesamt als Erfolg gewertet werden, besonders wenn man berücksichtigt, dass sich die hier beschriebenen Umstände grundlegend von der Mehrzahl der bisher veröffentlichten Anwendungen unterscheiden. Es gelang hier mit Hilfe der SSH, differentiell exprimierte Transkripte zu isolieren, obwohl die zu Grunde liegende cDNA aus einer sehr kleinen neuronalen Gewebeprobe mittels Amplifizierung gewonnen wurde. Die Gewinnung sehr kleiner Gewebemengen mit Hilfe der Gefriereinbettung und die Amplifizierung der gewonnenen cDNA sind in dieser Kombination noch nicht beschrieben worden. Von zwei Gruppen ist bisher amplifizierte cDNA für die SSH genutzt worden (den Hollander *et al.*, 1999; Hennebold *et al.*, 2000). Dort wurden anschließend mit zufriedenstellenden Effizienzen differentiell verteilte cDNA-Fragmente isoliert.

Neben der Bereitstellung des Gewebes muss für eine Beurteilung der vorliegenden Studie auch die Art des untersuchten Gewebes berücksichtigt werden. Die meisten und viel versprechendsten Erfolge der SSH wurden bisher in Vergleichen zwischen zwei Zellkulturen (unbehandelt und induziert) und zwischen Tumoren und entsprechenden gesunden Geweben beschrieben (z.B. Diatchenko *et al.*, 1996; Prokka und Visakorpi, 2001). Die homogene Zellpopulation und die hohen Expressionsunterschiede trugen hier zum Gelingen bei. Für die Isolierung von differentiellen Transkripten aus Gehirn mit Hilfe der SSH liegen bisher nur Berichte aus der Ischämie-Forschung vor (Yokota *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1998). Die dort erreichten Ausbeuten entsprechen denen der hier vorliegenden Studie. Sie deuten deswegen an, dass der Gewebetyp ein wichtiger Faktor für die erreichte Effizienz ist. Generell wird der Einsatz der SSH für Untersuchungen im Gehirn aufgrund der zu erwarteten komplexen Transkriptexpression kritisch bewertet (L. Diatchenko, persönliche Mitteilung).

An der geringen Effizienz beim Auffinden von differentiell exprimierten Transkripten (und Wegfindungsmolekülen) sind vermutlich neben dem Gewebetyp noch weitere Faktoren beteiligt. Gemeinsam sollen sie hier kurz skizziert und in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

1. Die laterale und die mediale Kappe des olfaktorischen Bulbus bzw. der Bulbus unter regenerierenden Bedingung und der native Bulbus könnten sich in der Expression der Transkripte nicht oder nur gering unterscheiden. Nicht oder nur sehr gering erhöhte Expressionsniveaus während der Regeneration sind möglich, da die Regeneration auch im nativen olfaktorischen Bulbus kontinuierlich stattfindet. Für eine besondere Stellung des lateralen Bulbusabschnitts

auf molekularer Ebene gibt es jedoch deutliche Hinweise (vgl. 2.4.2), so dass hier im Vergleich zum medialen Abschnitt von dem Vorhandensein differentiell exprimierter Transkripte ausgegangen werden kann.

2. Die Komplexität im olfaktorischen Bulbus könnte eine effiziente Anreicherung von cDNA-Fragmenten, die mit differentiell exprimierten Transkripten korrespondieren, verhindern. Die Isolierung einiger differentiell exprimierter Transkripte zeigt, dass die SSH grundsätzlich zu einer Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen führte. Möglicherweise wurde jedoch die Effizienz der Anreicherung durch die Komplexität vermindert.

3. Die Amplifikation der cDNA-Populationen vor ihrem Einsatz in die subtraktive Hybridisierung könnte für den erhöhten Hintergrund von nicht-differentiellen Sequenzen verantwortlich sein und zu einem Verlust von differentiellen Sequenzen führen. Grundsätzlich geht von dem Amplifizierungsschritt die Gefahr aus, selten exprimierte Sequenzen zu verlieren oder das Verhältnis der Transkriptniveaus zu verzerren. Die „cDNA Southern“ Analyse stimmt jedoch gut mit den Daten aus der *in situ* Hybridisierungen überein, so dass von einer weitgehend zufriedenstellenden Amplifikation ausgegangen werden kann.

4. Die Stringenz der subtraktiven Hybridisierungen könnte für die Anreicherung der differentiellen cDNA-Fragmente ungeeignet gewesen sein. Durch die Verwendung eines ausgewogenen Hybridisierungs-Protokolls sollte jedoch die Erfassung von möglichst vielen differentiell exprimierten Transkripten möglich gewesen sein.

5. Im differentiellen *Screening* könnten seltene differentielle cDNA-Fragmente unter der Nachweisgrenze liegen und so verloren gehen. Dieses Problem wird durch das *Screening* mit den subtrahierten Sonden, in denen die differentiellen cDNA-Fragmente angereichert sind, vermindert.

6. Bei der Verifizierung der differentiellen Expression der korrespondierenden Transkripte im „cDNA Southern“ und in der *in situ* Hybridisierung könnten einige der differentiellen Sequenzen unerkannt bleiben, weil ihre Transkriptmengen unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Die „cDNA Southern“ Hybridisierung wurde deswegen für die Detektion von seltenen Transkripten optimiert.

5.1.1 Für die Isolierung von Transkripten mit einer geringen Differenz zwischen den Expressionsniveaus ist die *Suppression* subtraktive Hybridisierung nicht geeignet

Die Anreicherung eines bestimmten cDNA-Fragments während der subtraktiven Hybridisierung hängt von dem Verhältnis seiner Konzentrationen in der *Tester* und der *Driver* cDNA sowie von seiner ursprünglichen Häufigkeit ab (Diatchenko *et al.*, 1999). Durch die Normierung wird die höchste Anreicherung (etwa 1000-fach) für cDNA-Fragmente von geringer Häufigkeit und/oder mit großen Differenzen in den Expressionsniveaus in *Tester* und *Driver* erreicht. Die Detektion von Transkripten mit mittleren Unterschieden (zwei- bis vierfach) gilt als möglich, aber die optimalen Anreicherungs-effizienzen werden für sie nicht erreicht (Diatchenko *et al.*, 1999).

Möglicherweise sind die Unterschiede in den mRNA-Expressionen zwischen den beiden verglichenen Bulbusabschnitten bzw. den Regenerationsstadien für eine effiziente Anreicherung zu gering. In den resultierenden subtrahierten cDNA-Bibliotheken wäre der Hintergrund hoch und die differentiell exprimierten Transkripte wären nur gering angereichert. Beides trifft auf die vorliegenden Bibliotheken zu.

Weitere Unterstützung erfährt diese Hypothese dadurch, dass nur cDNA-Fragmente isoliert wurden, deren Transkriptniveaus sich maximal um den Faktor 3,8 unterschieden. Trotz des (theoretisch) höheren Anreicherungsfaktors wurde kein Transkript identifiziert, das nur in einer cDNA-Population vorkommt oder sich durch einen hohen Unterschied in den Expressionsniveaus auszeichnet.

Innerhalb des olfaktorischen Bulbus gilt die laterale Bulbuskappe nach dem heutigen Wissensstand jedoch als der Teil, der sich am meisten von dem übrigen Teil unterscheidet (vgl. 2.4.2). Der Vergleich der lateralen Bulbuskappe mit der medialen schließt also vermutlich die größtmöglichen Expressionsunterschiede ein, so dass hier die meisten differentiellen Transkripte mit hohen Unterschieden in den Expressionsniveaus erwartet wurden.

Im Vergleich der lateralen und der medialen Bulbus*hälfte* (H. Korte, 2001) wurden zwei cDNA-Fragmente isoliert, die sechs- bis siebenmal häufiger in der einen als in der anderen cDNA-Population vorkommen. Vermutlich sind sie jedoch eine Ausnahme im olfaktorischen Bulbus, denn ihre Isolierung geht nicht auf Expressionsdomänen innerhalb bestimmter Zellschichten zurück. Ihre Transkripte werden in den Ganglienzellen des terminalen Nervs exprimiert, der ventro-medial entlang des olfaktorischen Bulbus verläuft. In Ansatz von H. Korte wurde nur noch *ependymin* als weiteres differentiell exprimiertes Transkript identifiziert (vgl. 4.8.2).

5.1.2 Die Komplexität des neuronalen Gewebes vermindert die Anreicherung von differentiell exprimierten Transkripten in der subtraktiven Hybridisierung

Eine hohe Komplexität im cDNA-Fragment-Gemisch könnte die Wahrscheinlichkeit vermindern, dass sich komplementäre cDNA-Fragmente treffen. Davon wären während der zweiten Hybridisierung besonders die differentiell exprimierten Sequenzen betroffen, die nur als Heteroduplex exponentiell amplifiziert werden können.

Das Gehirn gilt als das Gewebe mit der größten Komplexität bezüglich seiner Genexpression (dreimal so komplex wie Leber oder Niere), die durch die Diversität der unterschiedlichen Subtypen von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia verursacht wird (zusammengefasst in Colantuoni, 2000).

Die Komplexität der Transkripte im olfaktorischen Bulbus könnte daher ein Grund für den geringen Anteil identifizierter, differentiell exprimierter Transkripte sein.

Bisher sind nur zwei Studien publiziert, die die SSH zum Vergleich von Gehirnregionen eingesetzt haben (Yokota *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1998; Diatchenko *et al.*, 1996). Die darin geschilderten Ausbeuten stimmen gut mit den in dieser Studie erreichten überein und sind im Vergleich zu Experimenten mit Zell-Linien ebenfalls sehr gering. Diese Übereinstimmung deutet an, dass der Anteil identifizierter differentieller Transkripte möglicherweise von der Komplexität der Transkriptgemische abhängt.

Allerdings war die Komplexität der verglichenen Transkriptgemische in der vorliegenden Arbeit durch den Vergleich von zwei Subregionen einer Gehirnstruktur reduziert, so dass ihr Anteil an der geringen Effizienz vermutlich begrenzt ist.

5.1.3 Die Amplifikation der cDNA-Populationen vor der subtraktiven Hybridisierung reduziert die Effizienz der subtraktiven Hybridisierung

Da für die subtraktive Hybridisierung aus den Kappen der olfaktorischen Bulbi keine ausreichende Menge cDNA gewonnen werden konnte, wurde sie mit Hilfe des „SMART cDNA Synthesis Kits“ amplifiziert. Obwohl beispielhaft gezeigt werden konnte, dass das ursprüngliche Transkriptprofil während der Amplifizierung für alle Transkript-Häufigkeitsklassen erhalten bleibt (Endege *et al.*, 1999), gilt der Einsatz von voramplifizierten Transkripten als kritisch. Die Amplifizierung wird für einen erhöhten Hintergrund aus nicht-differentiellen Sequenzen verantwortlich gemacht und könnte zu dem Verlust einiger differentiell exprimierter Sequenzen führen (Diatchenko *et al.*, 1999).

Aus der Literatur sind bisher wenige Beispiele bekannt, in denen die „SMART“ und die „SELECT“ Technologie gemeinsam angewendet wurden (z.B. den Hollander *et al.*, 1999; Hennebold *et al.*, 2000). Trotz der erfolgreichen Subtraktionen mit guten Effizienzen wurden in einem Fall einige der erwarteten differentiellen Transkripte nicht identifiziert.

Der Einsatz der amplifizierten cDNA in den „cDNA Southern“ in dieser Studie ließ Rückschlüsse auf ihre Integrität zu. Es zeigte sich, dass mit der „SMART“ Technologie cDNA gewonnen werden kann, die die eingesetzte mRNA gut repräsentiert.

Ein Einfluss der cDNA-Amplifizierung auf den hohen Hintergrund der vorliegenden cDNA-Bibliotheken und dadurch auf die geringe Effizienz in der hier vorliegenden Studie scheint jedoch möglich.

5.1.4 Eine erhöhte Stringenz begünstigt die Anreicherung von einigen differentiellen cDNA-Fragmenten, aber reduziert die Komplexität der Subtraktion

Obwohl die Effizienzen der „Regenerations“, der „lateralen“ und der „medialen“ subtrahierten cDNA-Bibliotheken in einer semiquantitativen PCR überprüft und als zufriedenstellend eingestuft worden waren (vgl. 4.4.2), erwiesen sich die Anteile differentiell exprimierter cDNA-Fragmente als unerwartet gering (vgl. 4.6.3 und 4.7.3). Eine Ursache für diese Diskrepanz

könnte darin liegen, dass im Subtraktionseffizienztest der Zustand der cDNA-Bibliothek nur unzureichend beschrieben wird.

Die semiquantitative Amplifizierung des *β-aktin* cDNA-Fragments im Subtraktionseffizienztest beschreibt die Subtraktion anhand der *Normierung* eines häufig exprimierten cDNA-Fragments. Für eine Überprüfung der *Anreicherung* und für eine aussagekräftige Beschreibung der Subtraktion wären Subtraktionseffizienztests mit bekannten, differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten aus verschiedenen Transkript-Häufigkeitsklassen wünschenswert.

Demgegenüber ist die Anzahl der identifizierten, differentiell exprimierten mRNAs unmittelbar ein Maß für den Erfolg des gesamten subtraktiven Hybridisierungsverfahrens. Hier fließen die Effizienzen der Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte und die Normierung aller Transkriptniveaus im Rahmen der subtraktiven Hybridisierung sowie des differentiellen *Screenings* und der Verifizierung der Kandidaten ein.

Die Stringenz der subtraktiven Hybridisierung könnte als Regelgröße verändert werden, um den Anteil differentiell exprimierter Transkripte in den subtrahierten cDNA-Bibliotheken zu erhöhen. Sie wird durch die Länge der Hybridisierungsintervalle, das Verhältnis zwischen „Driver“ und „Tester“ cDNA und durch die Anzahl der PCR-Zyklen in der SS-PCR beeinflusst.

Die Zugabe von einer größeren Menge „Driver“ würde die Bildung von Heteroduplexes mit den „Tester“ cDNA-Fragmente begünstigen (vgl. 2.5.3). Damit würde die Normierung vorangetrieben und die differentiellen cDNA-Fragmente, die im „Driver“ nicht vorkommen, würden stärker angereichert werden. Dagegen würde die Anzahl der nicht-differentiellen oder nur gering differentiellen cDNA-Fragmente reduziert werden.

Werden die Hybridisierungsschritte verlängert, so nähern sich die Reaktionen ihrem Gleichgewichtszustand, sofern sie ihn noch nicht erreicht haben, weiter an. Auf diese Weise könnte während der zweiten Hybridisierung gering konzentrierten differentiellen cDNA-Fragmenten innerhalb eines komplexen Gemisches die Möglichkeit gegeben werden, Heteroduplexes zu bilden und so in den folgenden Schritten stärker amplifiziert zu werden.

Eine weitere Alternative besteht in der Erhöhung der Anzahl von PCR-Runden bei der SSPCR. Sie könnten zu einer stärkeren Anreicherung der als Heteroduplexe vorliegenden cDNA-Fragmente führen.

In der vorliegenden Studie wurden die vom Hersteller vorgeschlagenen und erprobten Hybridisierungsbedingungen verwendet. Werden sie verändert, könnte sich in den cDNA-Bibliotheken der Anteil an cDNA-Fragmenten, die sich mit einer großen Differenz ihrer Transkriptniveaus auszeichnen, erhöht werden. Eine erhöhte Stringenz würde aber gleichzeitig die Komplexität der subtrahierten cDNA-Bibliothek und damit die Möglichkeit, alle differentiell exprimierten Gene zu identifizieren, verringern (Porkka und Visakorpi, 2001).

Die Herstellung einer subtrahierten cDNA-Bibliothek unter stringenteren Bedingungen könnte jedoch möglicherweise zu differentiell exprimierten Transkripten führen, die exklusiv auf

einer Seite des olfaktorischen Bulbus exprimiert werden, und ist deswegen ein interessantes Experiment. Wenn seltene Transkripte mit einer hohen Differenz zwischen ihren Expressionsniveaus differentiell in den beiden Regionen exprimiert werden, so ist dieser Ansatz vermutlich geeignet, sie zu identifizieren.

5.1.5 Das differentielle *Screening* bestimmt die Anzahl der zu untersuchenden Kandidaten

Da während des differentiellen *Screenings* die cDNA-Fragmente, die potentiell differentiell exprimiert werden, für die weiteren Analysen herausgefiltert werden, ist die Effizienz, mit der diese Kandidaten erkannt werden, für die Gesamtzahl der identifizierten differentiellen Transkripte ein wichtiger Faktor.

Um im Kolonie Dot Blot ein Signal zu produzieren, muss eine spezifische Sonden-Spezies mindestens 0,1 % der gesamten Sonde ausmachen (Diatchenko et al. 1999). Macht sie einen geringeren Anteil aus, d.h. ist das zu isolierende Transkript selten, so sind die Klone, die differentielle cDNAs besitzen, nicht von dem unspezifischen Hintergrund zu unterscheiden (von Stein *et al.*, 1997). Der Hintergrund entsteht, wenn die komplexe Sonde an die bakteriellen Nukleinsäuren und Proteine bindet.

Das *Screening* mit subtrahierten Sonden löst einen Teil dieses Problems, denn stark angereicherte differentielle cDNAs können nach der SS-PCR die Nachweisgrenze überstiegen haben. Dies gilt allerdings nur für effiziente subtraktive Hybridisierungen. Werden seltene, differentielle cDNA-Fragmente nur gering angereichert, wie vermutlich in der vorliegenden Studie, werden sie im Kolonie Dot Blot selten aufgereicht und liegen an oder unter der Nachweisgrenze. Die Chance, sie zu detektieren ist deswegen äußerst gering. Vermutlich wurden sie dem Hintergrund zugerechnet.

Plasmid und PCR Produkt Dot Blots führen im Gegensatz zu Kolonie Dot Blots zu einem geringeren Hintergrund und tragen deswegen zu einer besseren Detektion der gering konzentrierten cDNA-Fragmente bei. Die Nachweisgrenze für einen cDNA *Array* wird mit 0,01 % der verwendeten Sonde veranschlagt (Porkka und Visakorpi, 2001). Das entspricht in einer nicht-subtrahierten cDNA-Population etwa 50 Transkripten pro Zelle. Gemeinsam mit einer schwachen Anreicherung in einer subtrahierten Bibliothek wäre diese Sensitivität für den Nachweis der seltenen differentiell exprimierten Transkripte ausreichend (etwa 25 Transkripte pro Zelle).

Für die PCR Dot Blots wurde außerdem die Sensitivität durch den Einsatz einer Hybridisierungslösung, die das Volumen für die Sondenmoleküle reduziert, erhöht (Ambion, 1999).

In den Kolonie Dot Blots zeigten etwa 50 % der Kolonien bei verlängerter Exposition ein schwaches unspezifisches Signal. Ein vergleichbares Verhältnis wurde von Fang *et al.* beo-

bachtet (2000). Dieser Anteil nicht geprüfter Kolonien gehört vermutlich zu den seltenen Transkripten und enthält möglicherweise differentiell exprimierte Transkripte. Wie groß ihr Anteil ist, könnte mit PCR Dot Blots überprüft werden. Denn bei den PCR Dot Blots lag der Anteil von signalfreien oder schwach hybridisierenden Klonen unter 5 % und war damit um den Faktor 10 gegenüber den Kolonie Dot Blots reduziert. In der über PCR Dot Blots *gese-reenten* subtrahierten „Regenerations“ cDNA-Bibliothek konnten jedoch keine differentiell exprimierten cDNA-Fragmente nachgewiesen werden, da die Differenzen zwischen den beiden verglichenen Stadien möglicherweise zu gering waren (vgl. 5.1.1).

5.1.6 Differentiell exprimierte Transkripte werden im „cDNA Southern“ und in *in situ* Hybridisierungen verifiziert

Die räumlich regulierten Expressionen der im differentiellen *Screening* identifizierten cDNA-Fragmente wurden im „cDNA Southern“ verifiziert. Die Beibehaltung der Repräsentierung von Transkripten verschiedener Häufigkeitsklassen und die Amplifizierung von kompletten cDNAs mit Hilfe der „SMART Technologie“ konnte gezeigt werden (Endege et al. 1999). Der „cDNA Southern“ ist in seiner Sensitivität mit einer polyA+ Northern Hybridisierung vergleichbar.

Bei einer effizienten Markierung der cDNA-Fragmente sollten daher alle cDNA-Fragmente, die im PCR-Produkt oder Kolonie Dot Blot identifiziert worden sind, zu einem Hybridisierungssignal führen.

Trotzdem konnten einige Transkripte in der „cDNA Southern“ Hybridisierung nicht nachgewiesen werden, da sie vermutlich in der cDNA-Population so gering exprimiert werden, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Es könnte sich bei ihnen um seltene differentielle Transkripte handeln, die während der subtraktiven Hybridisierung stark angereichert wurden, und deswegen im Kolonie Dot Blot detektierbar waren.

Eine geringere Nachweisgrenze für die Detektion von differentiell verteilten Sequenzen und damit die Möglichkeit die differentielle Expression von Kandidaten zu verifizieren, könnte die quantitative RT-PCR bieten (Souazé *et al.*, 1996). Dieses Verfahren ist allerdings bezüglich der erkannten Expressionsunterschiede weniger sensitiv als die „cDNA Southern“ Hybridisierung. Deswegen kann die quantitative PCR den „cDNA Southern“ nicht ersetzen. Sie könnte jedoch ergänzend zur Detektion der Expressionsniveaus von seltenen Transkripten herangezogen werden.

Die Verteilungen der differentiellen Transkripte im Gewebe wurde mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung analysiert. Eine Alternative zu den Dot Blot Verfahren könnte ein *Screening*-Verfahren über *in situ* Hybridisierungen sein. Obwohl das Verfahren pro analysiertem cDNA-Fragment aufwendiger ist als die Dot Blot Analyse, könnten die erhöhte Sensitivität und Aus-

sagekraft zu einem erhöhten Anteil identifizierter differentiell exprimierter Transkripte führen.

5.1.7 Die Voraussetzungen, differentiell exprimierte Transkripte zu isolieren, waren in beiden Ansätzen verschieden

Trotz der geringen Gesamteffizienz war es möglich, Transkripte zu identifizieren, die stärker im medialen als im lateralen Bulbusabschnitt exprimiert werden bzw. stärker im lateralen als im medialen. Demgegenüber wurden keine mRNAs isoliert, die während der Regeneration des glomerulären Musters hochreguliert wurden.

Neben technischen Voraussetzungen (vgl. 5.1.1 bis 5.1.6), die für beide Ansätze ungefähr gleich waren und an den geringen Effizienzen beteiligt sind, könnten Unterschiede in den Fragestellungen eine Ursache für die beiden unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Vergleich der lateralen und medialen Bulbusabschnitte

Identifiziert wurden im Verlauf dieser Studie vier Moleküle, die differentiell exprimiert werden. Ein Transkript (*ependymin*) wird spezifisch in der Leptomeninx exprimiert, die in der lateralen Gewebefraktion stärker vertreten war als in der medialen. Das *proenkephalin* Transkript wird dagegen in einer Subpopulation der Körnerzellen exprimiert, die einen medial gewichteten Schwerpunkt besitzt. Für das *beta-5 tubulin* Transkript konnte gezeigt werden, dass es in der medial gelegenen ventrikulären Proliferationszone exprimiert wird, von wo aus die neu gebildeten Körnerzellvorläufer in den olfaktorischen Bulbus einwandern. Währenddessen erfolgte für *TIP60* bisher keine Zuordnung auf zellulärer Ebene. In einem geringfügig veränderten Ansatz konnte H. Korte (2001) Transkripte isolieren, die als Prohormone in den Ganglien des terminalen Nervs exprimiert werden (*sGnRH* und *RFamid Vorläuferprotein*).

Die beiden verglichenen Bulbusabschnitte unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch funktional (vgl. 2.4.2). Es gibt Hinweise, dass die laterale Kette, die in die Wahrnehmung von Aminosäuren involviert ist, dem akzessorischen Bulbus der höheren Vertebraten entspricht. Darüberhinaus zeichnet sich der laterale Abschnitt durch eine Vielzahl kleiner, nicht voneinander trennbarer glomerulärer Strukturen aus (aglomerulärer Plexus), während im medialen Bereich relativ große, separierte Glomeruli zu finden sind. Deswegen ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Vielzahl von Transkripten zwischen den beiden Regionen differentiell exprimiert wird.

Unter den mRNAs sind jedoch nicht nur Wegfindungsmoleküle zu erwarten, die als Liganden der Wegfindungsrezeptoren auf den Wachstumskegeln der olfaktorischen Rezeptorneuronen diese zu ihren Zielregionen leiten. Sondern es könnten sich auch Moleküle darunter befinden, die den „akzessorischen Bulbus“ der Teleostier, die laterale Kette, bzw. den medialen Abschnitt spezifizieren. Darüberhinaus sind Moleküle zu vermuten, die in Subpopulationen der Mitralzellen oder Körnerzellen exprimiert werden und die verschiedene Bereiche der topografischen Geruchskarte molekular determinieren. Ob Moleküle zu erwarten sind, die Domänen im olfaktorischen Bulbus spezifizieren (entsprechend der Expressionsdomänen der olfaktori-

schen Rezeptoren im Epithel), ist unklar. Allerdings würde eine zonale Organisation auch hier die Komplexität des Wegfindungsproblems reduzieren.

Vergleich der nativen olfaktorischen Bulbi mit denen unter regenerierenden Bedingungen

Hier wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt, in der Transkripte angereichert sein sollten, die während die Regeneration des glomerulären Musters nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen hochreguliert sind. In diesem Ansatz wurden jedoch keine differentiell exprimierte Transkripte identifiziert. Die äußerst geringe Häufigkeit von differentiellen Signale während des *Screenings* und die nicht differentielle Expression von ausgewählten cDNA-Fragmenten veranlaßten mich, die Suche nach differentiellen cDNA-Fragmenten in dieser subtrahierten cDNA-Bibliothek abzubrechen.

Neben technischen Gründen, die für die geringe Anreicherung von differentiell exprimierten Transkripten angeführt werden können, sollte daneben in Betracht gezogen werden, dass der Ansatz für die Isolierung von differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten ungeeignet war.

Möglicherweise war die Störung des olfaktorischen Bulbus nicht ausgeprägt und vor allem nicht lange genug, um Expressionen zu verändern, die die Abhängigkeit zwischen olfaktorischen Epithel und Bulbus widerspiegeln. In dieser Studie degenerierten durch die Zerstörung der olfaktorischen Rezeptorneuronen im Epithel über 75 % der Projektionen in den Bulbus, und eine Woche nach der Zinksulfat-vermittelten Degeneration war das glomeruläre Muster etwa zu 50 % wieder regeneriert. Trotzdem sind die Veränderungen im olfaktorischen Bulbus möglicherweise gering, da die Degeneration nicht vollständig war und die Regeneration schnell wieder einsetzte. Unterstützung erfährt diese Hypothese durch Beobachtungen an den olfaktorischen Bulbi von *Danio rerio* nach der Entfernung der olfaktorischen Epithelien, die nach einer Woche leichte und erst nach sechs Wochen deutliche Veränderungen beschreiben (Byrd, 2000). Sie bestätigt damit zwar die Abhängigkeit des olfaktorischen Bulbus vom „Input“ des Epithels, aber auch, dass es sich um keinen schnellen Prozess handelt.

Der Ansatz basierte auf der Annahme, dass durch den Verlust der axonalen Verbindungen und anschließend durch die hohe Anzahl neu gebildeter axonaler Verbindungen die Moleküle, die in die Etablierung des glomerulären Musters involviert sind, hochreguliert werden. Möglicherweise trifft sie jedoch für Wegfindungsmoleküle nicht zu. Denn durch den kontinuierlichen *turn-over* der olfaktorischen Rezeptorneuronen sind ständig etwa 1-2 % von ihnen dabei, ihre Projektionen in den olfaktorischen Bulbus auszubilden (Gogos *et al.*, 2000). Dadurch befindet sich der olfaktorische Bulbus ständig in einer „regenerierenden“ Situation, so dass eine Hochregulierung von Wegfindungsmolekülen während der induzierten Regeneration nicht zwingend erscheint.

Insgesamt waren also die Möglichkeiten differentiell exprimierte Transkripte zu identifizieren in diesem Ansatz deutlich geringer als in dem Vergleich zwischen der lateralen und der medialen Bulbuskappe. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in beiden Ansätzen viele differentiell exprimierte mRNAs unerkannt blieben, da sich ihre Niveaus weniger als vierfach unterschieden und sie zu den seltenen Transkripten zählten.

5.2 Charakterisierung der Regeneration des glomerulären Musters nach der Zinksulfat-Behandlung des olfaktorischen Epithels

Für die Herstellung der subtrahierten „Regenerations“ cDNA-Bibliothek wurde die Zinksulfat-induzierte Degeneration der Rezeptorneuronen und die daraus folgende Degeneration des glomerulären Musters sowie dessen anschließende Regeneration untersucht.

Ein großer Teil der neuronalen Zellpopulation im sensorischen Bereich des olfaktorischen Epithels degenerierte innerhalb von 12 Stunden nach der Applikation von Zinksulfat. Die degenerierenden Zellen waren TUNEL-positiv, d.h. sie besaßen einen erhöhten Anteil freier DNA-Enden, wie er typisch für apoptotische Zellen ist. Die meisten TUNEL-positiven Zellen wurden acht Stunden nach der Behandlung detektiert. Zu diesem Zeitpunkt konnten im olfaktorischen Epithel die meisten „Bläschen-artige Strukturen“, die vermutlich vergrößerte Vakuolen der Rezeptorneuronen sind, beobachtet werden. Nach 24 Stunden wurden diese Strukturen nicht mehr detektiert, so dass die Degeneration zu diesem Zeitpunkt vermutlich abgeschlossen war.

Bei der Analyse des Zeitverlaufs der Regeneration auf der Bulbusebene, stellte sich heraus, dass um Tag 8 die meisten Axone von regenerierten olfaktorischen Rezeptorneuronen in den olfaktorischen Bulbus einwachsen (vgl. 4.1.4). Dieser Zeitpunkt wurde ermittelt, indem Projektionen der Rezeptorneuronen von Zinksulfat-behandelten olfaktorischen Bulbi nach bestimmten Zeitintervallen mit Hilfe von DiI visualisiert und analysiert wurden. Es stellte sich dabei heraus, dass die Zinksulfatapplikation zu einer reversiblen Degeneration des glomerulären Musters führte. Die Regeneration war nach 28 Tagen abgeschlossen und stellte das stereotype glomeruläre Muster vollständig wieder her.

5.2.1 Die Wirkung von Zinksulfat ist auf den sensorischen Abschnitt des olfaktorischen Epithels beschränkt und betrifft die neuronale Zellpopulation

Nach der Applikation von Zinksulfat auf das olfaktorische Epithel wurden nur im sensorischen Teil TUNEL-positive Zellen und eine Störung der neuronalen Zellpopulation beobachtet. Die nachfolgende Degeneration der glomerulären Projektionen zeigt, dass unter den degenerierten Zellen viele olfaktorische Rezeptorneuronen waren.

Einen weiteren Hinweis auf die Degeneration der Riechsinneszellen bringen Studien von A. Kraus (1999). Sie zeigen anhand der Expression von olfaktorischen Rezeptorproteinen und dem Rezeptorneuron-spezifischen (*cyclic nucleotide gated*) CNG-Kanal, dass die ORN nach einer vergleichbaren Zinksulfat-Behandlung zunächst degenerieren und anschließend regenerieren.

Ob andere Zelltypen ebenfalls durch die Zinksulfat-Behandlung degenerieren, hängt von der Länge des Kontaktes zwischen der Lösung und dem Epithel ab (Cancelon, 1982). Betrifft die Degeneration nur die olfaktorischen Rezeptorneuronen und nicht die *globose* Basalzellen, ist die induzierte Degeneration reversibel. Da in der vorliegenden Studie das glomeruläre Muster

qualitativ und quantitativ wieder hergestellt wurde, sind vermutlich keine (oder nur ein sehr geringer Teil) *globose* Basalzellen beschädigt worden.

Dass durch die Zinksulfat-Applikation auch andere Zelltypen betroffen wurden, die weiter apikal als die *globose* Basalzellen liegen, ist nicht auszuschließen. Da jedoch bei einer entsprechend kurzen Behandlung der degenerative Effekt nicht durch die Konzentration, den pH-Wert oder die Osmolarität bestimmt wird und die Wirkung nur über Zinkionen, aber nicht über andere Schwermetallionen vermittelt wird, wird von einer spezifischen Interaktion zwischen Rezeptorneuron und Zinkionen ausgegangen (Cancalon, 1982). Möglicherweise gelangen die Zinkionen über einen aktiven Mechanismus oder über die stark vergrößerte Oberfläche in die Rezeptorneuronen, in denen sie die Aktivität von einigen Enzymen verändern und so die Zellphysiologie nachhaltig stören.

Unterstützt wird diese Hypothese durch morphologische Befunde während des Degenerationsprozesses. Acht Stunden nach der Behandlung sind „Bläschen-artige“ Strukturen im sensorischen Epithel zu beobachten. Elektronenmikroskopisch wurden diese Strukturen als vergrößerte Vakuolen in den Dendriten der olfaktorischen Rezeptorneuronen identifiziert (7 Stunden nach der Zinksulfat-Behandlung; Cancalon, 1982). Möglicherweise gehen sie auf veränderte Enzym- bzw. Ionenpumpen Aktivitäten zurück und bewirken so eine Expansion oder die Bildung der Vakuolen.

Über den Mechanismus der degenerierenden Wirkung des Zinksulfats gibt die Detektion von TUNEL-positiven Zellen (die zeitlich mit der Vakuolen-Bildung korreliert) einen Hinweis. Bei ihnen handelt es sich vermutlich um apoptotische Zellen, aber für einen endgültigen Beweis sollten morphologische oder molekulare Charakteristika hinzugezogen werden.

Die Reproduzierbarkeit der Applikation wird durch die wiederholte Analyse der glomerulären Strukturen nach bestimmten Zeiträumen gezeigt. Die glomerulären Muster eines Zeitraums sind etwa gleich ausgeprägt und in der quantitativen Auswertung konnten sie gut in eine Regenerationskurve eingeordnet werden.

Obwohl in anderen Studien von einer schwer kontrollierbaren, unspezifisch nekrotisch wirkenden und damit irreversibel schädigenden Zinksulfat-Applikation ausgegangen wird (Margolis *et al.*, 1974; Adamek *et al.*, 1980), erwiesen sich die Auswirkungen der Zinksulfat-Applikation in dieser Studie als reversibel, spezifisch und reproduzierbar.

5.2.2 Das glomeruläre Muster erholte sich nach der Behandlung des olfaktorischen Epithels mit 3%iger Zinksulfatlösung wieder vollständig

Die glomerulären Projektionen wurden in Folge der Degeneration der Rezeptorneuronen zu über 75 % abgebaut und im Verlauf der Regeneration wieder regeneriert.

Da das unbehandelte Epithel ebenfalls durch die Zinksulfatapplikation gestört wurde, war der tatsächliche Degenerationserfolg vermutlich höher und erreichte möglicherweise über 90 %. Damit waren die Degenerationseffizienzen mit anderen Studien vergleichbar, in denen die

olfaktorischen Rezeptorneuronen ebenfalls chemisch degeneriert wurden (Schwob *et al.*, 1999; Cummings *et al.*, 2000). Selbst genetisch induzierte Degenerationsexperimente führen zu keinem vollständigen Verlust der olfaktorischen Rezeptorneuronen (Gogos *et al.*, 2000). Die Frage, ob die glomerulären Projektionen topographisch wiederhergestellt werden, ist gleich zu setzen mit der Frage, ob der hypothetische Wegfindungsmechanismus der olfaktorischen Rezeptorneuronen von Gradienten aus Wegfindungsmolekülen abhängt oder von schon existierenden Verbindungen. Wird das (nahezu) vollständig degenerierte glomeruläre Muster während der Regeneration wieder regeneriert, werden die Axone vermutlich mit Hilfe eines Zielfindungsmechanismus geleitet, der im adulten Tier besteht. Unterscheidet sich dagegen das regenerierte vom nativen glomerulären Muster, könnte seine Aufrechterhaltung im adulten Tier von schon existierenden Verbindungen abhängen. Diese Verbindungen könnten während der Ontogenese durch Pionierneuronen (Whitlock und Westerfield, 1998) entstanden und im adulten durch vorhandene gleichartige Fasern erhalten sein. Obwohl sich das glomeruläre Muster in einigen Studien nach chemischer Behandlung oder der Durchtrennung des olfaktorischen Nervs in veränderter Form regenerierte (z.B. Schwob *et al.*, 1999; Costanzo, 2000), gibt es auch Studien, die zeigen, dass das glomeruläre Muster vollständig wieder hergestellt wird und die so die „Gradiententheorie“ favorisieren (Cummings *et al.*, 2000; Gogos *et al.*, 2000). Diese Diskrepanz kann damit erklärt werden, dass die nicht-reversible Degeneration durch eine nachhaltige Zerstörung des olfaktorischen Nervs oder Morphologie des olfaktorischen Epithels verursacht wurde (z.B. Costanzo, 2000).

Die Reversibilität der Zinksulfat-induzierten Degeneration der Projektionen in den olfaktorischen Bulbus unterstreicht die Existenz von Wegfindungsmolekülen im olfaktorischen Bulbus auch im adulten Tier.

Einschränkend muss jedoch in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass nur die vollständige Degeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen zeigen könnte, ob existierende olfaktorische Rezeptorneuronen notwendig sind oder nicht. Eine vollständige Degeneration wurde hier jedoch nicht erreicht und erwies sich selbst in einem genetischen Ansatz als schwierig (Gogos *et al.*, 2000). Außerdem bleibt die Möglichkeit offen, dass Projektionen von nicht-olfaktorischen Pionierneuronen für die neu gebildeten Zellfortsätze als Vorlage dienen (Whitlock und Westerfield, 1998). Bisher konnte ihre Existenz jedoch nicht in adulten Tieren nachgewiesen werden (Whitlock und Westerfield, 1998).

5.2.3 Der Zeitverlauf der Regeneration könnte spezifisch für Teleostier sein

Mit Hilfe des lipophilen Membranfarbstoffs DiI wurden die Projektionen der olfaktorischen Rezeptorneuronen visualisiert und der Fortschritt der Regeneration quantifiziert (vgl. 4.1.4). Als Maß für die Regeneration wurde der Quotient aus der Summe der Pixelintensität der behandelten und der unbehandelten Seite gebildet. Seine systematisch zu hohe Einstufung des Regenerationsfortschritts muß jedoch bei der quantitativen Beurteilung des Regenerationsver-

laufs einbezogen werden. Qualitativ (Zeitpunkt der maximalen Degeneration und der vollständigen Regeneration) beeinflusst der systematische Fehler die Einschätzung jedoch kaum. Deswegen kann der beobachtete Zeitverlauf des Regenerationsquotienten mit den Beobachtungen in anderen Studien verglichen werden.

Im Schleimaal wird zwei Tage nach der Zinksulfat-Behandlung das Minimum und nach 14 Tagen eine vollständige Regeneration der axonalen Verbindung zwischen olfaktorischem Epithel und Bulbus erreicht (Cancalon, 1982). Erstaunlicherweise wird im Neunauge nach der Durchtrennung des olfaktorischen Nervs ein vergleichbarer Zeitverlauf berichtet (Zaidi *et al.*, 1998). Beide Regenerationsverläufe stimmen gut mit dem hier im Zebraabälbling observierten überein: das Minimum der axonalen Projektion wurde an Tag 3 oder davor erreicht und eine etwa 80 %ige Erholung des glomerulären Musters wurde nach Tag 14 beobachtet. Da die Teleostier unterschiedliche Größen und Anatomien besitzen, scheint die Länge der axonalen Projektion einen geringen Einfluß zu besitzen. Als geschwindigkeitbestimmender Schritt kommt die Regeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen in Frage, die unter den Fischen relativ konserviert sein könnte.

Demgegenüber zeigten Untersuchungen im Goldfisch, dass zwar innerhalb der ersten 14 Tage das Antwortverhalten auf Futter wiederkehrte, aber die funktionale Regeneration erst nach 28 Tagen vollständig für Futter- und nach einigen Monaten für Pheromonstimuli wiederhergestellt war (Zippel *et al.*, 1997). Funktionale Tests, z.B. durch optische Aktivitätsmessungen im olfaktorischen Bulbus des Zebraabälblings, könnten klären, wie weit hier die funktionale mit der morphologischen Wiederherstellung des glomerulären Musters korreliert.

Eine interessante Frage ist, ob die ciliierten und die mikrovillierten olfaktorischen Rezeptorneuronen im gleichen Umfang durch die Zinksulfat-Behandlung degeneriert werden und anschließend wieder regenerieren. In Goldfisch wurde gezeigt, dass die Häufigkeit der regenerierten mikrovillären Rezeptorzellen mit der Detektion von Pheromonen korreliert (Zippel *et al.*, 1997). Dieser Befund wirft Fragen auf, denn in anderen Studien wurden die mikrovillierten Rezeptorneuronen mit der Aminosäuredetektion in Verbindung gebracht (Gao *et al.*, 1998; Speca *et al.*, 1999; Sato und Suzuki, 2001). Mit dem hier etablierten Degenerationsverfahren könnte die Regeneration der Rezeptorneuronen, die die V2R- bzw. die „klassischen“ olfaktorischen Rezeptorproteine exprimieren, molekular während der Regeneration beobachtet werden. Die Analyse der Detektion von Geruchsstoffen mit optischen Aktivitätsmessungen könnte in Kombination mit den molekularen Daten möglicherweise zu einer Liganden Zuordnung für die mikrovillierten und ciliierten Riechsinneszellen im Zebrafisch führen.

Die Behandlung der olfaktorischen Epithelien mit Zinksulfat schädigte die olfaktorischen Rezeptorneuronen vermutlich spezifisch und initiierte ihren programmierten Zelltod. Dieser Prozeß war innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen. Auf der Ebene des olfaktorischen Bulbus waren die glomerulären Strukturen entsprechend bis zum dritten Tag nach der Behandlung minimal ausgeprägt. Das glomeruläre Muster erholte sich anschließend innerhalb von zwei

Wochen zu etwa 80 % und war nach vier Wochen wieder vollständig hergestellt. Die Übereinstimmung des beobachteten Zeitverlaufs mit dem aus anderen Spezies unabhängig von der Länge des olfaktorischen Nervs könnte hier bedeuten, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Regeneration der olfaktorischen Rezeptorneuronen durch die *globose* Basalzellen ist.

5.3 Bedeutung der differentiell exprimierten Gene im olfaktorischen System und Einordnung der neuartigen *Danio rerio* Sequenzen

Die analysierten differentiell exprimierten Transkripte korrespondierten mit der Histoneacetyltransferase TIP60, mit dem Glykoprotein Ependymin, mit Beta-5 Tubulin, mit einem Enkephalin Vorläuferprotein und einem Enkephalin abbauenden Protein sowie mit den Vorläuferproteinen der Neuropeptide GnRH und RFamid. Ein cDNA-Fragment konnte keinem bekannten Gen zugeordnet werden.

In den folgenden Abschnitten soll die Bedeutung der hier erstmals in *Danio rerio* beschriebenen mRNAs bzw. der entsprechenden Proteine im olfaktorischen System diskutiert werden.

5.3.1 TIP60 und das unbekannte Transkript

Während die anderen identifizierten Transkripte selektiv in bestimmten Zelltypen exprimiert wurden, wurde weder für TIP60 noch für das cDNA-Fragment 281, dem bisher kein Transkript zugeordnet werden konnte, eine selektive Anfärbung von bestimmten Zellen im olfaktorischen Bulbus beobachtet.

Das Transkript, das mit dem cDNA-Fragment 281 korrespondiert, wird während der Entwicklung auf einem sehr hohen Niveau im gesamten Nervensystem exprimiert. Im adulten Zebraquärling werden dementsprechend (vermutlich) alle Zellen im olfaktorischen Bulbus und im Telencephalon markiert. Möglicherweise handelt es sich deswegen bei dem Transkript um ein Molekül, das ubiquitär in neuronalen Zellen exprimiert wird. Eine spezifische Funktion im olfaktorischen Bulbus oder eine Involvierung dieses Moleküls in die Wegfindung olfaktorischer Rezeptorneuronen ist deswegen unwahrscheinlich.

Das TIP60 Transkript konnte bisher nicht im Gewebe lokalisiert werden. Bisher ist über die Gewebe- oder die Zelltyp-spezifische Expression von TIP60 nur bekannt, dass die Alpha- und Beta-Spleißvariante innerhalb einer Zelle in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind (Ran und Pereira-Smith, 2000). Über eine Gehirn-spezifische Lokalisation in Säugetieren gibt es keine Informationen.

TIP60 ist der katalytische Bestandteil des TIP60 Komplexes. Vermutlich werden die HAT-Komplexe über DNA-bindende Elemente an spezifische Promotoren gebunden und lockern dort die Chromatinstruktur auf, so dass mit der Transkription begonnen werden kann (zusammengefasst in Marzio und Giacca, 1999). Über die Acetylierung von Histonen ist TIP60 als transkriptioneller Cofaktor in viele Prozesse wie die Reparatur von DNA und Apoptose (Ikura *et al.*, 2000) und die Signalweiterleitung von Hormonrezeptoren involviert (Brady *et al.*, 1999).

Die Detektion des *TIP60* Transkripts im olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* gibt einen Hinweis auf eine allgemeine oder spezielle Funktion im olfaktorischen System. Für weitere Analysen ist die Lokalisation auf zellulärer Ebene eine Voraussetzung.

5.3.2 Ependymin im olfaktorischen System von *Danio rerio*

5.3.2.1 Die Funktion von Ependymin

Als Hauptbestandteil der Cerebrospinalflüssigkeit von vielen Teleostier wird das Glykoprotein Ependymin in Fibroblasten der Leptomeninx exprimiert (zusammengefasst in Schmidt, 1996). Es ist in Goldfisch in die Festigung von Erinnerung involviert, wirkt als Zelladhäsionsmolekül, bindet als Dimer Zink, als Monomer Calcium und liegt ohne Metallionen polymerisiert vor. Für die Involvierung von Ependymin (und anderen Zelladhäsionsmolekülen) in das Lernen ist ein Mechanismus vorgeschlagen worden, der die verschiedenen Zustandsformen von Ependymin berücksichtigt (zusammengefasst in Schmidt, 1996). Stresshormone regulieren die Synthese und die Ausschüttung von Ependymin, das sich durch lokal veränderte Konzentrationen von Metallionen in der Nähe von Synapsen sammelt und dort polymerisiert. Dadurch wäre Ependymin an den Synapsen lokalisiert, die im Rahmen der Konsolidierung morphologisch umgebaut werden und könnte als Zelladhäsionsmolekül unterstützend wirken.

5.3.2.2 Ependymin wird in der Leptomeninx um die olfaktorischen Bulbi exprimiert

Die differentielle Expression des Ependymin-Transkripts zwischen der lateralen und der medialen cDNA-Population geht vermutlich auf die ungleiche Verteilung der Leptomeninx um den olfaktorischen Bulbus zurück und besitzt vermutlich keine funktionellen Implikationen. Stattdessen könnte Ependymin wie im übrigen Gehirn am Lernen, und zwar hier an der Erfahrungsverarbeitung von olfaktorischen Reizen, beteiligt sein. Interessant wäre es zu untersuchen, ob die Ependymin-Synthese in mit olfaktorischen Reizen trainierten Fischen spezifisch um die olfaktorischen Bulbi erhöht ist.

5.3.2.3 Die Redundanz von *ependymin* in der subtrahierten cDNA-Bibliothek war sehr hoch

Mit Ependymin korrespondierende cDNA-Fragmente machten etwa 40 % der isolierten Kandidaten_{plasmid} aus (vgl. 4.6.1). Da im „cDNA Southern“ gezeigt wurde, dass das Transkriptniveau von *ependymin* in dem „lateralen“ cDNA-Gemisch nur 1,7-fach höher als in dem „medialen“ cDNA-Gemisch war, ist die Bevorzugung des cDNA-Fragments aufgrund seines hohen Expressionsgefälles unwahrscheinlich. Vielmehr scheint für die hohe Redundanz des Transkriptes unter den identifizierten Kandidaten_{plasmid} das hohe Expressionsniveau in der Leptomeninx verantwortlich zu sein. Denn obwohl die Leptomeninx nur einen geringes Gewebesvolumen in der lateralen und medialen Kappe einnimmt, könnte sich das hohe Expressionsniveau von Ependymin in dieser zellreichen Schicht auf die gesamte cDNA-Population der Kappe übertragen.

5.3.3 Beta-5 Tubulin im olfaktorischen System von *Danio rerio*

5.3.3.1 Die Funktion der Beta-Tubulin Genfamilie

Die Beta-Tubuline assoziieren mit Alpha-Tubulinen zu Tubulinen und sind so als Bausteine der Mikrotubuli in den Aufbau des Cytoskeletts involviert. In einigen Studien wurde gezeigt, dass trotz der Gewebe- bzw. Zell-spezifischen Expression von einigen Tubulinen, verschiedene Beta-Tubuline (Zell-spezifische und ubiquitäre) nebeneinander als isotype Bausteine die Mikrotubuli aufbauen (zusammengefasst in Burkhart *et al.*, 2001). In differenzierenden Neuronen scheint die Präferenz allerdings für bestimmte Beta-Tubuline besonders ausgeprägt zu sein. Mechanistisch wird angenommen, dass an dieser Selektion die variablen Regionen beteiligt sind. Sie dienen als Bindungsstellen für Mikrotubuli-assoziierte Proteine, die sortierend wirken könnten.

Während die Expression von Klasse I und IVb Beta-Tubulinen als konstitutiv gilt, wurde in den anderen Klassen (II, III, IVa, VI) eine spezifische Expression im Gehirn, in Neuronen oder in den blutbildenden Zellen nachgewiesen (zusammengefasst in Burkhart *et al.*, 2001).

5.3.3.2 Beta-5 Tubulin wird während des Wachstums und der Differenzierung von neuronalem Gewebe exprimiert

Das Beta-5 Tubulin Transkript (Klasse I) wurde im 48 hpf Embryo in vielen Gehirnbereichen auf hohem Niveau exprimiert, wohingegen im 72 hpf Embryo die Expression runterreguliert war.

Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen in Maus und in Ratte bestätigt (Lewis *et al.*,

1985; Usui *et al.*, 1996). Hier wurde das Klasse I Transkript in unreifem Gehirn hochreguliert und mit dem Wachstum und der Differenzierung der neuronalen Gewebes korreliert. Die Reduktion mit fortschreitender Entwicklung des Embryos wurde auf eine reduzierte mitotische Aktivität und ein vermindertes Wachstum von Axonen zurückgeführt. Insgesamt ist die Expression von Beta-5 Tubulin in neuronalen Zellen adulter Tiere sehr selten, denn die Klasse I Tubuline machen nur 3 % der Beta Tubuline im Gehirn von adultem Rind aus (zusammengefasst in Burkhart, 2001).

Im adulten *Danio rerio* wurde das Beta-5 Tubulin Transkript in der Körnerzellschicht und in der ventrikulären Proliferationszone exprimiert.

Eine Expression in diesem mitotisch aktiven Bereich unterstützt die Annahme, dass das Tubulin während der Bildung von Neuronen hochreguliert wird (Lewis *et al.*, 1985). Die Expression in den Körnerzellen könnte also darauf hindeuten, dass diese Zellen erst kürzlich gebildet worden sind. Alternativ wird Beta-5 Tubulin spezifisch in diesem Zellen exprimiert. Letzteres scheint plausibler, da Beta-5 Tubulin während der Entwicklung sehr schnell runterreguliert wird.

5.3.4 Das Neprilysin/ Enkephalinsystem im olfaktorischen System von *Danio rerio*

5.3.4.1 Die Funktionen von Neprilysinen und Enkephalinen

Opioide beeinflussen viele Funktionen des zentralen Nervensystems wie Schmerzempfindung, das kardiovaskuläre System, neuroendokrine Aktivität, Wärmeregulation sowie Fress-, Aggressions-, Sexual- und Fluchtverhalten (zusammengefasst in Olson *et al.*, 1989). Sie treten als Neurotransmitter und Neuromodulatoren auf (zusammengefasst in Brownstein, 1977), regulieren die Proliferation der neuronalen Zellpopulation während der Entwicklung (Zagon und McLaughlin, 1991) und wirken inhibitorisch auf die Ausbildung von neuronalen Fortsätzen (Hauser *et al.*, 1989). Man nimmt an, dass Met-Enkephalin in der Hypophyse parakrin auf die Sekretion von Hormonen wirkt oder selbst als Neurohormon der Hypophyse freigesetzt wird (Vallarino *et al.*, 1994).

Neprilysine/ Endothelin Converting Enzyme gehören zu den Zink Metalloproteasen und sind extrazellulär lokalisiert. Sie spalten viele Neuropeptide wie beispielsweise Enkephaline (Malfroy *et al.*, 1978), *Substance P* (Matsas *et al.*, 1983) und *Atrial Natriuretic Factor* (Roques *et al.*, 1993), die sie inaktivieren, und prozessieren die Endotheline proteolytisch (Murphy *et al.*, 1994), die dadurch aktiviert werden. Besonders Neprilysin (NEP) ist weit verbreitet und wird im Gehirn und der Niere konstitutiv exprimiert, während es zum Beispiel in den Lymphozyten während der Entwicklung reguliert wird (zusammengefasst in Turner und Tanzawa, 1997). Im Gehirn ist NEP auf prä- und postsynaptischen Neuronen lokalisiert und beschränkt

die Wirkung von Enkephalinen und Tachykinen auf den synaptischen Spalt (Abb. 5-1; Barnes *et al.*, 1993). Da NEP II bisher im Gehirn und im Hoden nachgewiesen wurde, wird angenommen, dass es an der Inaktivierung von Fortpflanzungs- und Neuropeptiden beteiligt ist (Ouimet *et al.*, 2000).

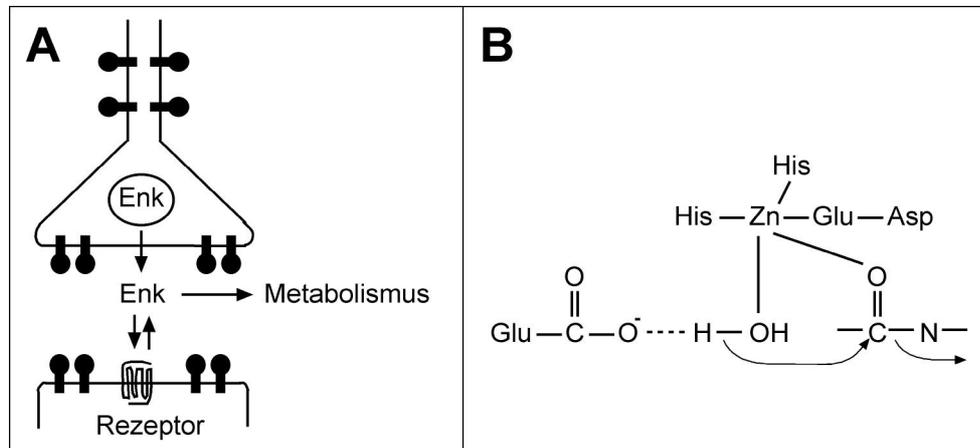


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung zur Wirkung der Enkephaline. A) Begrenzung der Enkephaline am synaptischen Spalt durch die Präsenz von neutraler Endopeptidase (NEP; nach Turner *et al.*, 2001). B) Katalytischer Mechanismus der zu den Zink-Metalloendopeptidasen gehörenden neutralen Endopeptidasen. Das Zink-Kation wird von zwei Histidin-Resten und einem Glutamat-Rest komplexiert. Es polarisiert ein Wassermolekül und die zu spaltende Amidbindung, so dass ein Glutamatrest als Protonenakzeptor die Hydrolyse der Amidbindung katalysiert (Roques, 2000).

5.3.4.2 Im olfaktorischen Bulbus wird NEP II in der gesamten Körnerzell-schicht exprimiert, während Proenkephalin nur in einer Subpopulation nachgewiesen wurde

Im olfaktorischen Bulbus wird NEP II in der Körnerzellschicht exprimiert. Da NEP prä- und postsynaptisch Opioide inaktiviert, könnte sowohl die zentrale Innervierung der Körnerzellen als auch ihre synaptischen Verbindungen mit den Dendriten und den Zellkörpern der Mitralzellen über Opioide reguliert werden.

Die Expression von Enkephalin ist im olfaktorischen Bulbus relativ gering und auf einige Gebiete beschränkt, überlappt jedoch mit der NEP II Expression. Eine vergleichbare Situation findet man in den NEP-positiven periglomerulären Zellen von Ratte und Hamster, von denen ein Teil Enkephaline exprimiert (Wilcox *et al.*, 1989; Merchenthaler *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1982).

Rückschlüsse auf die Verschaltung der Körnerzellen im olfaktorischen Bulbus des Zebrafährblings sind anhand der Expressionsdaten nicht möglich. Allerdings lassen sie erwarten, dass die Proenkephalin-negativen Körnerzellen statt Proenkephalin andere Neuropeptide exprimieren. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Proenkephalin-exprimierenden Körnerzellen ein gemeinsames Funktionsmerkmal aufweisen.

Die breite Expression von NEP II in der inneren Zellschicht legt nahe, dass bei der Modulation der Körnerzellen oder bei ihren synaptischen Übertragungen NEP II spaltbare Neuropeptide eine große Rolle spielen.

Mit spezifischen Inhibitoren (Phosphoramidon-Derivaten für NEP und NEP II; Opioidrezeptorantagonisten) in Kombination mit Aktivitätsmessungen im olfaktorischen Bulbus könnten eine eventuelle Beteiligung von Opioiden an der Prozessierung der olfaktorischen Information untersucht werden.

5.3.4.3 In Teleostier ist NEP II das zweite identifizierte Mitglied der Neprilysin-Like Endopeptidasen Genfamilie

In den Mammaliern sind bis heute sieben zu den M13 Zink-Metallendopeptidasen zählende Familienmitglieder identifiziert worden (zusammengefasst in Turner *et al.*, 2001). Wie viele Familienmitglieder es in Teleostier gibt, ist nicht bekannt. Im Dezember 2000 wurde von 8 bis 10 Neprilysin-Like Genprodukten im Genom von *Homo sapiens* ausgegangen (zusammengefasst in Turner *et al.*, 2001), während für *D. melanogaster* 24 und für *C. elegans* 22 zur NEP-Gruppe zählende Gene identifiziert wurden (C. elegans Sequencing Consortium, 1998; Myers *et al.*, 2000). Neben NEP II aus *Danio rerio* ist NEP aus Flussbarsch beschrieben worden. Die vollständige Peptidsequenz NEP II aus *Danio rerio* könnte abschließend zeigen, ob beide Teleostier Proteine zu verschiedenen Familienmitgliedern ortholog sind. Charakteristisch für NEP II aus Ratte und SEP aus Maus ist, dass ihre Transkripte für Membran-ständige und lösliche Varianten kodieren (Ouimet *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 1999). Die löslichen Varianten werden hauptsächlich in den Hoden exprimiert, wurden jedoch auch im Gehirn und anderen Geweben nachgewiesen. Die Isolierung eines *full-length* Transkripts und der Nachweis einer entsprechenden proteolytischen Schnittstelle würde die Einordnung von *Danio rerio* NEP II (im Vergleich zu NEP I) endgültig klären.

5.3.4.4 NEP II wird im olfaktorischen Bulbus in verschiedenen Isoformen exprimiert

Für NEP II aus *Danio rerio* wurden verschiedene Spleißvarianten nachgewiesen, die differenziell verteilt sind (vgl. 4.8.6).

Das unterschiedliche Laufverhalten von Transkripten aus der Neprilysin-Familie deutet auf Spleißvarianten (Ouimet *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 1999), multiple Polyadenylierungsstellen (Malfroy *et al.*, 1987) und/oder multiple 5'-nicht-kodierende Promotorregionen (Valdenaire *et al.*, 1999) hin. Während die multiplen Polyadenylierungsstellen für große Längendifferenzen (zum Beispiel 2,7 kb, 3,5 kb, 6,5 kb für NEP; Li *et al.*, 1995) verantwortlich sind, führen Spleißvarianten und unterschiedliche Promotorregionen bei den NEPs zu Transkripten, die sich um 40 bis 70 bp unterscheiden (Li *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1999). Auf die zuletzt genannte Art entstehen die proteolytisch prozessierbaren, löslichen und die Membran-ständigen

Isoformen, die Gewebe- und im Gehirn zusätzlich Zelltyp-spezifisch exprimiert werden (Li *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1999). Welche Art von Varianten für die beiden Hybridisierungssignale verantwortlich sind, kann nur die Isolierung und die Analyse der entsprechenden Transkripte klären.

5.3.4.5 Die Expression im olfaktorischen Bulbus und in anderen Gehirnregionen unterscheidet sich von den bekannten Expressionsmustern aus Säugetieren

In der *in situ* Hybridisierung wird in Übereinstimmung mit dem „cDNA Southern“ keine quantitative Differenz zwischen den Expression in der lateralen und der medialen Seite detektiert. Die medialen Mitralzellen könnten das NEP II-Transkript der medialen cDNA und die markierten Zellen der olfaktorischen Nervschicht könnten das NEP II-Transkript der lateralen cDNA beigesteuert haben. Die Nervschicht besitzt vermutlich auch einen Anteil an der medialen cDNA-Population. Alternativ könnten die Körnerzellen eine Positions-spezifische Expression der Varianten zeigen. Aufschluss über die Verteilung könnten nach der Identifizierung der Varianten spezifische *in situ* Hybridisierungen geben.

Obwohl das cDNA-Fragment für ein Protein kodiert, dessen Sequenz zu NEP II die höchste Homologie aufweist, wurde das NEP II/ SEP-Transkript aus Ratte bisher nicht im olfaktorischen Bulbus detektiert (Ouimet *et al.*, 2000). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Funktion von NEP II im olfaktorischen System nicht konserviert ist. In Mammalier wird jedoch NEP I in der glomerulären Schicht und in den periglomerulären Zellen des olfaktorischen Bulbus exprimiert (Gaudoux *et al.*, 1993; Wilcox *et al.*, 1993). Diese Expression differiert sehr von der *Danio rerio* NEP II Expression, die in den Gliazellen der Nervschicht und in der Körnerzellschicht anzutreffen, jedoch bei den Mammaliern negativ ist.

Außerhalb vom olfaktorischen System wird das Transkript von NEP II in der Ratte in vielen Hirnstammkernen, im Hypothalamus und in der Hypophyse intensiv exprimiert (Ouimet *et al.*, 2000). Im 48 und 72 hpf Zebrafisch sind die Hypophyse und der Hypothalamus frei von NEP II-Transkript, während die Expression in den beiden ventral gelegenen Kernen des Mesencephalons als Expression im Hirnstamm gewertet werden kann. Darüber hinaus sind das *Tuberculum olfactorium* und das *Corpus striatum* (Putamen und *Globus pallidus*) Strukturen, die NEP auf hohem Niveau exprimieren (Ouimet *et al.*, 2000). Die Expression im *Tuberculum olfactorium* könnte in *Danio rerio* durch die Detektion von NEP II-positiven Zellen im ventralen Kern des ventralen Telencephalon repräsentiert sein. Die genauen und vollständigen Entsprechungen von Säugetier Gehirnstrukturen in Teleostier sind jedoch nur selten zu finden (Rinck und Wullmann, 2001).

Die Expressionsdomänen von NEP II im Zebrafisch und von NEP II in der Ratte differieren, so dass eine vergleichbare Funktion unwahrscheinlich ist. Möglicherweise sind zwischen den Spezies die Aufgaben der Multigenfamilie unterschiedlich auf die Mitglieder verteilt.

5.3.4.6 Das Leu-Enkephalin im Proenkephalin unterstreicht die „frühe“ Entwicklung des Met- und Leu-Enkephalin enthaltenden Vorläuferpeptids

Die isolierte Proenkephalin mRNA-Sequenz ist die erste aus einem Teleostier identifizierte und wird im folgenden als *Danio rerio* Proenkephalin bezeichnet. Proenkephalin gehört zu der Opioid/ Orphanin Genfamilie, aus deren Vorläuferpeptiden die Opioid Neuropeptide proteolytisch prozessiert werden. Die vier Opioidvorläufermoleküle Proopimelanocortin, Proenkephalin, Prodynorphin und Proorphanin enthalten jeweils mindestens eine Opioidkernsequenz (YGGF) und konservierte Cysteinreste am N-Terminus. Die Vorläufer sind vermutlich ausgehend von Proenkephalin durch Duplikation entstanden (zusammengefasst in Danielson und Dores, 1999).

Innerhalb des Proenkephalins wird die evolutionäre Einordnung von Leu-Enkephalin diskutiert (Sollars *et al.*, 2000). In den Säugetieren kodiert das Proenkephalin für vier Met-Enkephaline, ein Leu-Enkephalin sowie ein Hepta- und ein Octapeptid, die die Met-Enkephalin Sequenz enthalten (zusammengefasst in Akil *et al.*, 1984). Obwohl im ZNS von *Xenopus laevis* und vom australischen Lungenfisch Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin in solchen molaren Verhältnissen (3:1 bzw. 4:1) detektiert werden (Sei *et al.*, 1989; McDonald *et al.*, 1991), die auf ein zu den Mammaliern vergleichbares Vorläuferpeptid schließen lassen, kodieren die identifizierten Proenkephalin-Sequenzen nicht für Leu-Enkephalin (Sollars *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1991).

Da die Säugetiere gemeinsam mit den Amphibien und den Quastenflossern einem monophylogenetischen Ast zugerechnet werden, wurde bisher angenommen, dass sich Leu-Enkephalin als Bestandteil der Proenkephalin-Sequenz innerhalb der tetrapoden Amnioten etabliert habe (Dores *et al.*, 2000; Sollars *et al.*, 2000). Diese Hypothese wurde durch Befunde auf Proteinebene unterstützt, die zeigen, dass Reptilien Met- und Leu-Enkephalin exprimieren (Lindberg und White, 1986) und dass in zwei Teleostier, Aal und Lachs, Met- aber kein Leu-Enkephalin nachgewiesen werden kann (McDonald *et al.*, 1991).

Demgegenüber zeigt die Identifizierung von Leu-Enkephalin in *D. rerio*, einem Teleostier, dass Leu-Enkephalin entwicklungsgeschichtlich ein „altes“ Fragment der Proenkephalin Sequenz sein könnte. Dafür spricht auch die Detektion von Met- und Leu-Enkephalin Peptid im Verhältnis 2:1 bzw. 3:1 im Schleimaal und in der Neunauge (Dores und Gorbman, 1990). Man müsste überprüfen, ob es hier Unterschiede innerhalb der Teleostier gibt oder ob posttranskriptionale Regulation eine Rolle spielt.

5.3.4.7 Die Expression von Proenkephalin stimmt in Teilaspekten mit den beschriebenen Expressionen in Säugetieren und Fischen überein

Die räumlich-differentielle Expression im olfaktorischen Bulbus wird in *in situ* Hybridisierungen bestätigt. In adulten Zebrafischarten werden in den medialen Abschnitten eine größere Anzahl intensiv markierter Zellen als in den lateralen Regionen detektiert. Ausgehend von der Form und der Lokalisation handelt es sich bei ihnen um Körnerzellen. Während der Embryo-

nalstadien 48 und 72 hpf wird das *proenkephalin* Transkript in den *Bulbi olfactorii* in Bereichen nachgewiesen, in denen die Körnerzellen in diesem Entwicklungsstadium lokalisiert sind.

Die Expression von *proenkephalin* im olfaktorischen Bulbus ist aus anderen Spezies bekannt, allerdings scheint die Verteilung über die Zellschichten Spezies-abhängig zu sein. Im Hai (Northcutt *et al.*, 1988) wurden Enkephalin-positive Körnerzellen nachgewiesen, während in der Ratte und anderen Nagetieren Met-Enkephalin in Mitral- und Körnerzellen exprimiert wird (Matstani *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1982; Merchenthaler *et al.*, 1986). Für die Ratte werden die enkephalinerge Körnerzellen auf 15 % der gesamten Population geschätzt (Gouda *et al.*, 1990). Obwohl der Anteil der Enkephalin-positiven Körnerzellen im Zebrabärbling vermutlich geringer ist, könnte die Expression in einer kleinen Subpopulation auf vergleichbare Funktionen hindeuten.

Die Proenkephalin-Expressionen im Telencephalon entsprechen vermutlich dem Septum, den Basalganglien und dem *Nucleus accumbens*. Diese Regionen werden phylogenetisch als „alt“ eingestuft und die Expressionen sind u. a. mit denen in Lungenfisch (Rainer und Northcutt, 1987), in Ratte (Harlan *et al.*, 1987) und in Hühnchen (Molnar *et al.*, 1994) auf Protein- bzw. Transkriptebeine vergleichbar.

5.3.5 sGnRH und RFamid Neuropeptid im olfaktorischen System von *Danio rerio*

5.3.5.1 Die Funktionen von GAP, sGnRH und RFamid-ähnlichen Peptiden

Das Decapeptid *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Gonadotropine, die von der Hypophyse in den Blutkreislauf freigesetzt werden (Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden Achse). In allen Vertebraten führen bestimmte Verhaltens- und Sozialstimuli indirekt zu einer Anregung der neurokrinen GnRH-produzierenden Zellen im Hypothalamus. Diese setzen daraufhin pulsartig GnRH frei, das eine Ausschüttung von Gonadotropinen an der anterioren Hypophyse bewirkt (zusammengefasst in Dellovade *et al.*, 1998). Die Gonadotropine vermitteln die Reifung der Gameten und die Produktion von Steroidhormonen (Zigmond *et al.*, 1999).

In den meisten Vertebraten wird die Mehrheit der GnRH-exprimierenden Zellen neben dem präoptischen Gebiet/ ventraler Hypothalamus im Bereich des terminalen Nervs, im ventralen Vorderhirn und im caudalen Diencephalon/ rostralen Mesencephalon gefunden (Demski und Wright, 1987, und Referenzen darin). Daneben enthalten beinahe alle Gehirnregionen GnRH-positive Nervenfasern. Während vom Hypothalamus freigesetztes GnRH als Neurohormon wirkt, wird für GnRH-exprimierende Zellen im olfaktorischen Bulbus eine neuromodulatorische Funktion vermutet (Wirsig-Wiechmann *et al.*, 2001). Indem Eigenschaften von Ionenka-

nähen und von Synapsen verändert werden, kann die Erregbarkeit von Zielneuronen in vielen Gehirnregionen reguliert werden (Oka und Matsushima, 1993; Eisthen *et al.*, 2000).

Das GnRH-assoziierte Protein (GAP) wird gemeinsam mit GnRH auf einem Propeptid kodiert. Während sich alle bisher bekannten GnRH-Decapeptid Varianten nur geringfügig unterscheiden (maximal 4 Aminosäuren Unterschied zur humanen Sequenz), beträgt die Identität der zugehörigen GAPs auf Nukleinsäureebene 30 bis 40 % (González-Martínez *et al.*, 2001). Für ein GAP aus Ratte konnte gezeigt werden, dass es ein Helix-Loop-Helix Motiv trägt und in die Regulation der Prolactin Sekretion involviert ist (Chavali *et al.*, 1997). Obwohl viele andere GAPs dieses Strukturmotiv nicht besitzen, gibt es Hinweise, dass sie ähnliche Funktionen wie die GnRHs haben. Vielleicht sind sie jedoch auch für die korrekte Faltung des Vorläufers wichtig (Uzbekova *et al.*, 2001).

Nach der Entdeckung des FMRFamid Neuropeptids in *Aplysia* wurden viele Neuropeptide in anderen Spezies entdeckt, die das Carboxy-terminale RFamid-Motiv tragen. Da im Met-Enkephalin Heptapeptid die FMRF-Sequenz enthalten ist und die RFamide wie die Enkephaline proteolytisch aus Vorläuferpeptiden prozessiert werden, wird vermutet, dass die Enkephaline und die RFamide-Like Neuropeptide von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen könnten (Greenberg *et al.*, 1983). RFamide-Like Neuropeptide werden in den Nervensystem von fast allen Tieren gefunden. Für Vertebraten wurde gezeigt, dass sie an der Verarbeitung sensorischer und autonomer Information sowie an der Wahrnehmung von Schmerz und an der Opioid-vermittelten Analgesie beteiligt sind (Panula *et al.*, 1996, 1999). Im terminalen Nerv von Teleostier, Urodele und Fledermaus wurde gezeigt, dass FMRFamide-Like Neuropeptid exprimierende Zellen auch GnRH exprimieren (Stell *et al.*, 1984; Northcutt und Muske, 1994; Oelschläger *et al.*, 1998). Neben einer möglichen Involvierung von FMRFamide-Like Neuropeptiden in die Reproduktion, wird in Säugetieren eine vermittelnde Rolle zwischen rostralen (olfaktorischen, vomeronasalen, terminaler Nerv) und inneren (Darm und andere innere Organe) afferenten Wahrnehmungen auf der Höhe des Hirnstamms und des Rückenmarks vermutet (Oelschläger *et al.*, 1998).

5.3.5.2 In den Ganglien des terminalen Nervs werden das sGnRH und RFamid Vorläuferprotein coexprimiert

In der vorliegenden Studie wurden in der Nervschicht des ventralen olfaktorischen Bulbus und im ventralen, anterioren Telencephalon GnRH- und RFamide Vorläuferprotein mRNAs in großen, ovalen Neuronen detektiert. Diese Neuronen sind die Ganglien des *Nervus terminalis*, dessen Verlauf sie beschreiben. Der terminale Nerv ist von den kranialen Nerven der am weitesten anterior gelegene und ist eng an den olfaktorischen Nerv und den olfaktorischen Bulbus assoziiert (zusammengefasst in Demski, 1993). Die Fortsätze der Ganglienzellen projizieren nach rostral in das olfaktorische Epithel und nach caudal in die Retina (olfaktoretinale Zentrifugalprojektion), das Telencephalon sowie das Mittelhirn (Abb. 5-2; Stell *et al.*, 1984; Oka

und Matsushima, 1993). Diese Projektionen konnten in der *in situ* Hybridisierung, die vorwiegend Zellkörper markiert, nicht visualisiert werden.

In Färbungen von aufeinanderfolgenden Schnitten wurde gezeigt, dass die GnRH-positiven Neurone vermutlich auch RFamid Vorläuferprotein exprimieren. Dieses Phänomen ist aus Teleostier bekannt; hier wurden in der Retina, im olfaktorischen Nerv, im olfaktorischen Bulbus sowie im Telencephalon GnRH, FMRFamid-ähnliches Peptid und Neuropeptid Y in den Ganglien und Fasern immunohistochemisch kolokalisiert (Stell *et al.*, 1984; Chiba *et al.*, 1997).

Über die genaue Funktion von FMRFamid-ähnlichem Neuropeptid und GnRH im terminalen Nerv liegen bisher nur wenige Daten vor. In *Danio rerio* konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Zentrifugalinnervierung der Retina über die GnRH-Ausschüttung eine wichtige Rolle in der Regulierung der Lichtempfindlichkeit spielt (Li und Dowling, 2000).

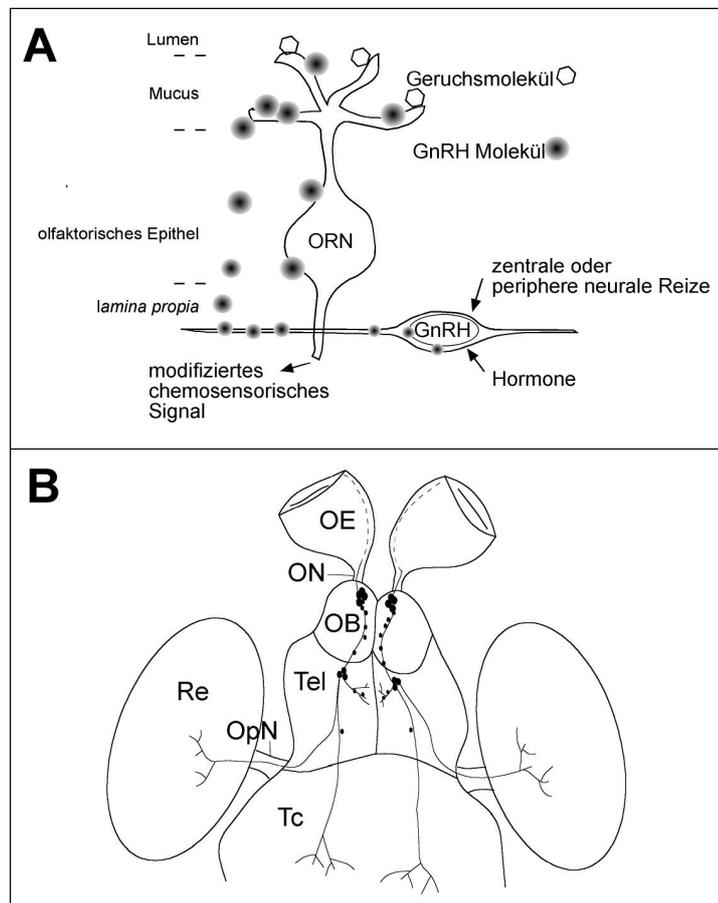


Abbildung 5-2: A) Schematische Darstellung des Verlaufs des terminalen Nerven im Vorder- und Mittelhirn von *Danio rerio* in der ventralen Ansicht. Kreise symbolisieren die Ganglionzellen des terminalen Nerven (modifiziert nach Li und Dowling, 2000). B) Hypothetisches Modell der GnRH-sekretierenden Ganglionzellen des terminalen Nerven im olfaktorischen System und ihre neuromodulatorische Funktion. Die GnRH-Sekretion könnte durch neuronale und hormonale Einflüsse kontrolliert werden. Freigesetzte GnRH-Moleküle müssten von der basalen *Lamina propria*, in der die GnRH-haltigen Fasern lokalisiert sind, in das Epithel diffundieren, um über die GnRH-Rezeptoren auf den Dendriten der olfaktorischen Rezeptoren zu wirken. Eine Stimulierung der GnRH-Rezeptoren könnte auf diese Weise, die Geruchsstoff-induzierten Membranpotentiale verändern und so zu der Entsendung eines modifizierten Signals an höhere Gehirnregionen führen (modifiziert nach Wirsig-Wiechmann, 2001).

Analog dazu könnten die Neuropeptide im olfaktorischen System neuromodulatorisch auf olfaktorische Rezeptorzellen wirken, deren Wahrnehmung von Pheromonen dadurch zu Reproduktions-relevanten Zeiten erhöht sein könnte (Abb. 5-2; zusammengefasst in Wirsig-Wiechmann, 2001). Die Funktion von RFamiden im olfaktorischen System ist weitgehend unerforscht und wird in der Vermittlung von verschiedenen sensorischen Wahrnehmungen vermutet (Oelschläger *et al.*, 1998).

Aufgrund der Schmittdicke konnten die Cluster-bildenden Ganglienzellen nicht quantifiziert werden. In immunohistochemischen Studien wurden 30 bis 40 FMRFamid-positive Neuronen im anterioren olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* gezählt (Li und Dowling, 2000). Allgemein gilt die Anzahl und die Größe der Neuronen im terminalen Nerv von Teleostier als konstant und alters- sowie geschlechtsunabhängig (zusammengefasst in Foran und Bass, 1999). Obwohl in Fischen die Größe GnRH-positiver Neuronen durch Interaktionen mit möglichen Paarungspartnern und Pheromonexposition erhöht wird, bleibt die Anzahl der Zellen, die das Prohormon exprimieren konstant (zusammengefasst in Rissman *et al.*, 1997). Die Regulation erfolgt über die proteolytische Spaltung der Propeptide in aktives GnRH, während ein relativ konstanter Pool von ProGnRH und entsprechendem Transkript aufrecht gehalten wird. Vermutlich hingen die beobachteten Unterschiede deswegen nicht mit akutem Paarungsverhalten zusammen. Eine strengere Standardisierung in der Haltung der Zebraabrärlinge, eine größere Anzahl der untersuchten Tiere sowie verbesserte Quantifizierungsmethoden könnten Aufschluss über die Differenzen geben.

5.3.5.3 Die Expression von sGnRH und RFamid Vorläuferprotein weisen darauf hin, dass die GnRH-exprimierenden Neuronen im Hypothalamus nicht aus der olfaktorischen Plakode stammen

Im 48 und 72 hpf embryonalen Entwicklungsstadium wurden das RF-amid Vorläuferprotein und das sGnRH-Vorläuferprotein Transkript ausschließlich in der medialen olfaktorischen Plakode nachgewiesen, von wo aus während der Entwicklung in Vertebraten GnRH-Neuronen in das basale Vorderhirn wandern (zusammengefasst in Dellovade *et al.*, 1998). Damit in Übereinstimmung wurde immunohistochemisch gezeigt, dass in *Danio rerio* die Expression von FMRF-ähnlichem Peptid in der medialen olfaktorischen Plakode zwischen 24 und 30 hpf beginnt und in späteren Stadien erhalten bleibt (Pinelli *et al.*, 2000).

Parallel zu dieser Expression wurde FMRF-Immunoreaktivität in einer Zellgruppe im ventralen Diencephalon nachgewiesen, für die eine von der olfaktorischen Plakode unabhängige Entwicklung angenommen wird (Pinelli *et al.*, 2000). Diese Zellen entwickeln sich im adulten Tier zum periventriculären Kern des Hypothalamus und könnten mit GnRH-positiven Zellen im Hypothalamus übereinstimmen (Münz, 1999). Die signalfreie Region mit der RFamid Vorläuferprotein Sonde deutet daraufhin, dass hier eine andere RF-Propeptid Variante exprimiert wird.

Bisher wurden im Gehirn von Teleostier und Tetrapoden jeweils zwei bis drei GnRH-Varianten nachgewiesen [Salmon-type GnRH (sGnRH), Chicken-II-type GnRH (cIIGnRH), Mammalier-type GnRH (mGnRH)], die jedoch teilweise oder, wie im Teleostier Medaka, in vollständig getrennten Domänen (cIIGnRH: Mittelhirn/Tegmentum; sGnRH: olfaktoretinärer Kern; mGnRH: präoptische Region) exprimiert werden (Okubo *et al.*, 2000). Mit der sGnRH-Sonde konnte in der vorliegenden Studie in den Embryos (wie mit der RFamid Sonde) kein Transkript außerhalb der olfaktorischen Plakode detektiert werden. Die olfaktorische Plakode ist der Ursprung der nach caudal wandernden sGnRH exprimierenden Zellen (zusammengefaßt in Demski, 1993). Zu dem frühen hier untersuchten Stadium war also bei entsprechender Spezifität der Sonde für die *Salmon-Type* Isoform nur hier ein Signal zu erwarten.

Im 72 hpf Stadium werden Zellen in FMRF-ähnliches Peptid Antikörperfärbungen von der olfaktorischen Plakode ausgehend bis in die rostralen Regionen des Telencephalons markiert (Pinelli *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Studie zu diesem Zeitpunkt nur Zellen beobachtet werden, die ein bis zwei Zelldurchmesser von dem Cluster in der olfaktorischen Plakode separiert lagen. Möglicherweise waren die Entwicklungsstadien in den beiden Studien unterschiedlich weit fortgeschritten. Da im Telencephalon und im olfaktorischen Bulbus von adulten Zebrafischarten die Neuropeptid Verteilung auf Proteinebene der auf Transkriptebene entspricht, ist die Markierung von unterschiedlichen Zellpopulationen in dieser Region unwahrscheinlich. Eine *in situ* Hybridisierung in weiter fortgeschrittenen Stadien könnte zu einer Klärung führen.

5.3.5.4 Das Einfügen eines Nukleinsäurerestes in M1 ermöglicht das Ablesen von funktionellem GnRH und GAP

Die Translation der Nukleinsäuresequenz von M1 führte zu einem 76 Aminosäuren langen sGnRH-Vorläuferpeptid, in dem die Carboxy-terminale Spaltsequenz von sGnRH fehlte und kein funktionelles GAP gebildet werden konnte. Ein Vergleich mit der sGnRH-Sequenz aus *Danio rerio* zeigte, dass an Position 140 ein Nukleinsäurerest fehlte, der zu einer Verschiebung des Leserasters führte. Das Einfügen eines Adenosins stellte die Spaltsequenz das Leseraster wieder vollständig her.

Ein Gen, das für ein neuartiges GnRH kodiert, ein Polymorphismus oder ein Fehler während der Amplifikation könnten Erklärungen für die Deletion sein. Gegen die Identifizierung eines neuen Gens oder eines Polymorphismus spricht, dass in allen GnRH-Vorläufer Varianten, die bisher identifiziert wurden, die GnRH-Sequenz und die folgende Gly-Lys-Arg Sequenz auf Proteinebene vollständig konserviert waren (Penlington *et al.*, 1997). Deswegen wäre das resultierende, am Carboxy-Terminus verlängerte GnRH, vermutlich nicht funktionsfähig. Obwohl eine Vielzahl von alternativ gespleißten Sequenzen bekannt ist, die sich zum Teil nur um einen Aminosäurerest in der Proteinsequenz unterscheiden (Suzuki *et al.*, 2000), ist der Verlust einer Nukleinsäurerestes unter Beibehaltung der übrigen Sequenz nicht erklärbar. Ein Fehler während einer PCR-Reaktion ist damit möglicherweise die Ursache für das „fehlende“

Nukleotid, denn die Fehlerrate der verwendeten Advantage DNA-Polymerasen Mischung (*Taq* und *Pfu*; Clontech, Heidelberg) liegt bei 10^{-5} pro Basenpaar und PCR-Zyklus (Barnes, 1994).

Nach der Einfügung eines Nukleotids resultiert ein Protein, dass zu sGnRH aus *Danio rerio* zu 96 % identisch ist. Es stellt damit die dritte Isoform von sGnRH im Zebraabärbling dar. In anderen Fischen sind ähnliche Polymorphismen bekannt, zum Beispiel gibt es in Goldfisch (vgl. 4.8.8) und in der Pflötze (Penlington *et al.*, 1997) mehrere Isoformen.

5.3.5.5 Das *Danio rerio* RFamide-Like Neuropeptid kodiert für ein Teleostier Homolog zum Neuropeptid FF Vorläufer

Das *Danio rerio* RFamid Porhormon kodiert für ein Octadecapeptid und ein Neuropeptid, dessen Größe anhand der Spaltsequenzen und durch den Vergleich mit anderen Spezies auf drei Aminosäuren genau abgeschätzt werden konnte (8 oder 11 Aminosäuren).

In Goldfisch konnte gezeigt werden, dass im terminalen Nerv zwei RFamid-Peptide vorliegen, die in ihrer Größe den Neuropeptiden aus Rind (18 und 8 Aminosäuren) entsprechen (Fischer *et al.*, 1996). Eine vergleichbare biochemische Studie in *Danio rerio* oder spezifische Antikörper gegen die Amino-terminalen Aminosäuren könnten Aufschluss über die Länge der prozessierten Neuropeptide geben.

Die hier vorliegende erste RFamid-Vorläufer mRNA-Sequenz ist die erste in Teleostier identifizierte, die zu den Neuropeptid FF Prohormonen aus Säugetieren gehört. Aus Goldfisch wurde zwar schon ein RFamid-Neuropeptid isoliert, aber es zeigte nur eine sehr geringe Homologie zu den RFamiden aus Säugetieren (Fujimoto *et al.*, 1998). Möglicherweise entstammt das Goldfisch Neuropeptid aus einem anderen RFamid-Like Vorläuferpeptid und wird nicht im Vorderhirn, sondern weiter zentral exprimiert. Denn biochemische Untersuchungen und Vergleiche von *in situ* Hybridisierungen mit immunohistochemischen Nachweisen zeigten in Säugetieren, dass das NPFF-Gen nicht für alle RF-Like Neuropeptide im Gehirn kodiert (Pannula *et al.*, 1999).

5.4 Ausblick

Da die meisten der bisher gefundenen differentiell exprimierten Kandidaten noch nicht im Zebraabärbling oder in Teleostier beschrieben worden sind, ergeben sich aus ihren Identifizierungen einige interessante Fragestellungen. So stimmt die Lokalisation von Beta-5 Tubulin mit den mitotisch aktiven Zellen der ventrikulären Proliferationszone mit den bisher bekannten Eigenschaften dieser Tubulin-Isoform überein, aber die Expression in den Körnerzellen des olfaktorischen Bulbus ist bisher noch nicht beschrieben bzw. untersucht worden. Ebenso ist zwar die Expression von Proenkephalin in einer Zellsubpopulation im olfaktorischen Bulbus nicht überraschend, aber die Lokalisation in der Körnerzellschicht unterstreicht, dass hier

vermutlich die Funktion des Proenkephalin zwischen den Teleostier und Säugetieren nicht konserviert ist. Die evolutionäre Einordnung der Teleostier Proenkephalin-Sequenz kann vermutlich zur Aufklärung der Entwicklung der Proenkephalin Vorläuferproteine beitragen. Die hohe Expression von NEP II im olfaktorischen Bulbus ist ohne Pendant in den Mammaliern und bedarf weiterer Analysen. Darüber hinaus wurden mit sGnRH und RFamid Vorläuferprotein zwei Transkriptsequenzen näher charakterisiert, die in den Ganglienzellen des olfaktorischen Nervs exprimiert werden.

Insgesamt haben sich also aus den bisher identifizierten differentiellen Transkripten einige interessante Befunde und neue Fragestellungen ergeben, die in der Zukunft bearbeitet werden können.

Für die zukünftigen Arbeiten an der hier vorgestellten Thematik gibt es vielfältige Möglichkeiten.

Die Verbesserung der Effizienzen bei der Isolierung differentiell exprimierter Transkripte aus dem olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio* ist das wichtigste Nahziel für die Fortsetzung des Projektes.

Die Möglichkeiten, die Ausbeuten in dem hier gewählten Ansatz zu verbessern sind jedoch begrenzt, denn die vermutlich limitierenden Faktoren, die Komplexität des neuronalen Gewebes und die geringe Gewebemenge, können nicht verändert werden. Eine Erfolg versprechende Variante könnte das generelle *Screening* über PCR Dot Blots und die Quantifizierung der dort nicht detektierbaren cDNA-Fragmente mit Hilfe von quantitativer PCR sein. Eine höhere Anzahl von differentiell exprimierten Transkripten könnte möglicherweise zu Wegfindungsmolekülen führen, die im olfaktorischen Bulbus differentiell exprimiert werden und an der Etablierung des glomerulären Musters beteiligt sind.

Möglicherweise sind andere Verfahren, differentiell exprimierte Transkripte zu isolieren, wie *Differentiell Display* RT-PCR in Betracht zu ziehen, die jedoch auch einige Nachteile aufweisen.

6 Literatur

- Adamek, G. P., R. G. Mair, R. C. Gesteland (1980). Transduction processes in regenerating olfactory epithelium. *Neurosci Abstr* 6:243
- Ambion (1999). New hybridization technology makes nonisotopic probes more sensitive - nonisotopic probes go further with ULTRAhyb™. *TechNotes* 6(2) April. www.ambion.com
- Akil, H., S. J. Watson, E. Young, M. E. Lewis, H. Khachaturian, J. M. Walker (1984). Endogenous opioids: Biology and function. *Ann Rev Neurosci* 7:223-255
- Araneda, R. C., A. D. Kini, S. Firestein (2000). The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* 3(12):1248-55.
- Axel, R., P. Feigelson, G. Schutz (1976). Analysis of the complexity and diversity of mRNA from chicken liver and oviduct. *Cell* 7:247-254
- Baby, S. M., M. Ueck, P. D. P. Rao (2001). Gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons and associated nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase-positive neurons in the brain of a teleost, *Rhodeus amarus*. *Gen Comp Endocrinol* 120:44-54
- Baier, H., S. Korsching (1994). Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. *J Neurosci* 14:219-249
- Barnes, K., A. J. Turner, A. J. Kenny (1993). An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows colocalization of endopeptidase-24.11 with substance P. *Neuroscience* 53:1073-1082
- Barnes, W. M. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2216-2220
- Barth, A. L., N. J. Justice, J. Ngai (1996). Asynchronous onset of odorant receptor expression in the developing zebrafish olfactory system. *Neuron* 16:23-34
- Belluscio, L., G. H. Gold, A. Nemes, R. Axel (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20:69-71
- Belluscio, L. G., G. Koentges, R. Axel, C. Dulac (1999). A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97:209-220
- Berger, S. (1998). Neuronale und nichtneuronale Proliferationszonen im Riechepithel des Zebrafischs (*Danio rerio*). Diplomarbeit im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Brownstein, M. J. (1977). Biologically active peptides in the mammalian central nervous system. In H. Gainer (ed): *Peptides in Neurobiology*. New York, Plenum Press, pp. 145-170
- Brunet, L. J., G. H. Gold, J. Ngai (1996). General anosmia caused by targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 77:681-693
- Buck, L., R. Axel (1994). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 78:823-834
- Buck, L. B. (2000). The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100:611-618
- Bulfone, A., F. Wang, R. Hevner, S. Anderson, T. Cutforth, S. Chen, J. Meneses, R. Pedersen, R. Axel, J. L. R. Rubenstein (1998). An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* 21:1273-1282

- Burkhart, C. A., M. Kavallaris, S. B. Horwitz (2001). The role of β -tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochim Biophys Acta* 1471:O1-O9
- Byrd, C. A., P. C. Brunjes (1995). Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *J Comp Neurol* 358(2):247-59
- Byrd, C. A. (2000). Deafferentation-induced changes in the olfactory bulb of adult zebrafish. *Brain Res* 866:92-100
- Caggiano, M., J. S. Kauer, D. D. Hunter (1994). Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13:339-352
- Calof, A., N. Hagiwata, J. D. Holcomb, J. S. Mumm, J. Shou (1996). Neurogenesis and cell death in the olfactory epithelium. *J Neurobiol* 30:67-81
- Cao, Y., B. C. Oh, L. Stryer (1998). Cloning and localization of two multigene families in goldfish olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 95:11987-11992
- Cancelon, P., J. S. Elam (1980). Study of regeneration in the garfish olfactory nerve. *J Cell Biol* 84:779-794
- Cancelon, P. (1982). Degeneration and regeneration of olfactory cells induced by $ZnSO_4$ and other chemicals. *Tissue Cell* 14(4):7171-732
- Cancelon, P. (1983). Influence of a detergent on the catfish olfactory mucosa. *Tissue Cell* 15(2):245-258
- Carr, M. V., E. Walters, F. L. Margolis, A. I. Farbman (1998). An enhanced olfactory marker protein immunoreactivity in individual olfactory receptor neurons following olfactory bulbectomy may be related to increased neurogenesis. *J Neurobiol* 34(4):377-90
- C. elegans Sequencing Consortium. Genome Sequencing of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018
- Celik, A. (2001). Restricted and complementary expression patterns of eph receptors and ephrin ligands define potential interaction sites in the embryonic and adult olfactory system of zebrafish, *Danio rerio*. Dissertation im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Chavali, G. B., S. Nagpal, S. S. Majumdar, O. Singh, D. Salunke (1997). Helix-loop-helix motif in GnRH associated peptide is critical for negative regulation of prolactin secretion. *J Mol Biol* 272:731-740
- Chess, A., I. Simon, H. Cedar, R. Axel (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78:823-834
- Cheng, S., C. Fockler, W. M. Barnes, R. Higuchi (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5695-5699
- Chiba, A. (1997). Colocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-, neuropeptide Y (NPY)-, and molluscan cardioexcitatory tetrapeptide (FMRFamide)-like immunoreactivities in the ganglion cells of the terminal nerve of the masu salmon. *Fish Sci* 63:153-154
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15:532-537
- Chomczynski P., K. Mackey (1995). Modification of the TRI Reagent™ procedure for isolation of RNA from polysaccharide - and proteoglycan - rich sources. *Biotechniques* 19:942-945
- Church, G. M., Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(7):1991-1995

- CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual, PT1117-1 (1997). Clontech Laboratories. www.clontech.com
- Colantuoni, C., A. E. Purcell, C. M. L. Bouton, J. Pevsner (2000). High throughput analysis of gene expression in the human brain. *J Neurosci Res* 59:1-10
- Costanzo, R. M. (2000). Rewiring the olfactory bulb: changes in odor maps following recovery from nerve transection. *Chem Senses* 25:199-205
- Cox, K. H., D. V. DeLeon, L. M. Angerer, R. C. Angerer (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Develop Biol* 101: 485-503
- Cummings, D. M., D. K. Emge, S. L. Small, F. L. Margolis (2000). Pattern of olfactory bulb innervation returns after recovery from reversible peripheral deafferentation. *J Comp Neurol* 42:362-373
- Danielson, P. B., R. M. Dores (1999). Molecular evolution of the opioid/orphanin gene family. *Gen Comp Endocrinol* 133:169-86
- Darrow, K. O., W. A. Harris (2001). Olfactory cues affect GnRH immunoreactivity in adult and young zebrafish, *Danio rerio*. Neuroscience Meeting 2001. Poster abstract. sfn.scholarone.com
- Davis, B. J., G. D. Burd, F. Macrides (1982). Localization of methionine-enkephalin, substance P, and somatostatin immunoreactivities in the main olfactory bulb of the hamster. *J Comp Neurol* 204:377-383
- Debouck, C. (1995). Differential display or differential dismay? *Curr Opin Biotechnol* 6:597-599
- Dellovade, T., M. Schwanzel-Funkel, J. Gordan, D. Pfaff (1998). Aspects of neurobiology conserved across vertebrate forms. *Gen Comp Endocrinol* 112:276-282
- Demski, L. S. (1987). Phylogeny of LHRH systems in the CNS of chordates. *Ann N Y Acad Sci* 519:1-14
- Demski, L. S. (1993). The terminal nerve complex. *Acta Anat* 148:81-95
- Diatchenko, L., Y.-F. C. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, P. D. Siebert (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6025-6030
- Diatchenko, L., S. Lukyanov, Y.-F. Chris Lau, P. D. Siebert (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 303:349-370
- Dores, R. M., Gorbman A. (1990). Detektion of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in the brain of the hagfish, *Eptatretus stouti*, and the lamprey, *Petromyzon marinus*. *Gen Comp Endocrinol* 77:489-499
- Dores, R. M., J. Lee, C. Sollars, P. Danielson, I. Lihmann, M. Vallarino, H. Vaudry (2000). In the African lungfish Met-enkephalin and Leu-enkephalin are derived from separate genes: cloning of a proenkephalin cDNA. *Neuroendocrinol* 72(4):224-30
- Dulac, C., R. Axel (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83:195-206
- Dower, W. J., J. F. Miller, C. W. Ragdale (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16(13):6127-45
- Dynes, J. L., J. Ngai (1998). Pathfinding of olfactory neuron axons to stereotyped glomerular targets revealed by dynamic imaging in living zebrafish. *Neuron* 20:1081-1091
- Eisthen, H. L., R. J. Delay, C. R. Wirsig-Wiechmann, V. E. Dionne (2000). Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 20:3947-3955

- Eisthen, H. L., J. A. Fawley, S. R. Zawacki (2001). Olfactory receptor cell physiology is modulated by peptides structurally similar to those found in the terminal nerve. Neuroscience Meeting 2001. Poster abstract. sfn.scholarone.com
- Ekeström, P., C.-M. Johnsson, L.-M. Ohlin (2001). Ventricular proliferation in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J Comp Neurol* 436:92-110
- Endege, W. O., K. E. Steinmann, L. A. Boardman, S. N. Thibodeau, R. Schlegel (1999). Representativ cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques* 26:542-550
- Engelke, D. R., A. Krikos, M. E. Bruck, D. Ginsburg (1990). Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 191: 396-400
- Fan, J., J. Ngai (2001). Onset of odorant receptor gene expression during olfactory sensory neuron regeneration. *Dev Biol* 229:119-127
- Farbman, A. I., F. L. Margolis (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 74:205-215
- Farbman, A. I., P. C. Brunjes, L. Rentro, L. J. Michas, S. Ritz (1988). The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 8:3290-3295
- Farbman, A. I. (1990). Olfactory neurogenesis: Genetic or environmental control? *Trends Neurosci* 13:362-365
- Firestein, S. (1992). Electrical signals in olfactory transduction. *Curr Opin Neurobiol* 2:444-448
- Fischer, A. J., H. M. Reisch, A. L. Kyle, W. K. Stell (1996). Characterization of RFamide-like neuropeptides in the nervus terminalis of the goldfish (*Carassius auratus*). *Reg Pep* 62:73-87
- Foran, C. M., A. H. Bass (1999). Preoptic GnRH und AVT: Axes of sexual plasticity in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 116:141-152
- Friedrich R. W., Korsching S. I. (1997). Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* 18:737-752
- Friedrich, R. W., Korsching S. I. (1998). Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer. *J Neurosci* 15(23):9977-9988
- Fujimoto, M., K.-I. Takeshita, X. Wang, I. Takabatake, Y. Fujisawa, H. Teranishi, M. Ohtani, Y. Muneoka, S. Ohta (1998). Isolation and characterization of a novel bioactive peptide, carassius RFamide (C-RFamide), from the brain of the Japanese crucian carp. *Biochem Biophys Res Commun* 242:436-440
- Fuss, F. (2001). Die Ebenen der neuronalen Informationsverarbeitung im Bulbus olfactorius des Zebraäbblings (*Danio rerio*): Aktivitätskartierung strukturabhängiger Repräsentation von Geruchsstoffen und Identifizierung molekulargenetischer Marker der einzelnen Verarbeitungsebenen. Dissertation im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Fuss, S. H., S. I. Korsching (2001). Odorant feature detection: activity mapping of structure response relationship in the zebrafish olfactory bulb. *J Neurosci* 21(21):8396-8407
- Gaudoux, F., G. Boileau, P. Crine (1993). Localization of neprilysin (EC 3.4.24.11) mRNA in rat brain by in situ hybridization. *J Neurosci Res* 34:426-433
- Ghaddar G., A. F. Ruchon, M. Carpentier, M. Marcinkiewitz, N. G. Seidah, P. Crine, L. Desgroseillers, G. Boileau (2000). Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metalloproteinase of neprilysin family. *Biochem J* 347:419-429

- Gierer, A. (1998). Possible involvement of gradients in guidance of receptor cell axons towards target position on the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 10:388-391
- Glusman, G., A. Sosinsky, E. Ben-Asher, N. Avidan, D. Sonkin, A. Bahar, A. Rosenthal, S. Clifton, B. Roe, C. Ferraz, J. Demaille, D. Lancet (2000). Sequence, structure, and evolution of a complete human olfactory receptor gene cluster. *Genomics* 63(2):227-45
- Gogos, J. A., J. Osborne, A. Nemes, M. Mendelsohn, R. Axel (2000). Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map. *Cell* 103:609-620
- González-Martínez, D., T. Madigou, N. Zmora, I. Anglade, S. Zanuy, Y. Zohar, A. Elizur, J. A. Munoz-Cueto, O. Kah (2001). Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol* 429:144-155
- Gouda, M., S. Matsutani, E. Senba, M. Tohyama (1990). Peptidergic granule cell population in the rat main accessory olfactory bulb. *Brain Res* 512(2):339-42
- Graziadei, P. P., J. F. Metcalf (1971). Autoradiographic and ultrastructural observations on the frog's olfactory mucosa. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 116(3):305-18
- Graziadei, P. P. C., G. A. Monti Graziadei (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals: I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8:1-18
- Graziadei, G. A., P. P. Graziadei (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8:197-213
- Greenberg, M. J., S. D. Painter, K. E. Doble, G. T. Nagle, D. A. Price, H. K. Lehman (1983). The molluscan neurosecretory peptide FMRFamide: comparative pharmacology and relationship to the enkephalins. *Fed Proc* 42:83-86
- Gurskaya, N. G., L. Diatchenko, A. Chenchik, P. D. Siebert, G. L. Khaspekov, K. A. Lukyanov, L. L. Vagner, O. D. Ermolaeva, S. A. Lukyanov, E. D. Sverdlov (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts regulated by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240:90-97
- Halpern, M., L. S. Shapiro, C. Jia (1995). Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res* 677:157-161
- Hamdani, E. H., G. Alexander, K. B. Doving (2001). Projection of sensory neurons with microvilli to the lateral olfactory tract indicates their participation in feeding behavior in crucian group. *Chem Senses* 26:1139-1144
- Hansen, A., E. Zeiske (1993). Development of the olfactory organ in zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol* 333:289-300
- Hansen, A., E. Zeiske (1998). The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study. *Chem Senses* 23:39-48
- Harlan, R. E., B. D. Shivers, G. J. Romano, R. D. Howells, D. W. Pfaff (1987). Localization of proenkephalin in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 258:159-184
- Hastie, N. D., J. O. Bishop (1976). The expression of three abundance classes of messenger RNA in mouse tissue. *Cell* 9:761-774
- Hedrick, S. M., D. I. Cohen, E. A. Neilson, M. M. Davis (1984). Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308:149-153

- Hennebold, J. D., N. Tanaka, J. Saito, B. R. Hanson, E. Y. Adashi (2000). Ovary-selective genes I: the generation and characterization of an ovary-selective complementary deoxyribonucleic acid library. *Endocrinology* 141(8): 2725-2734
- Hinds, J. W., P. L. Hinds, N. A. McNelly (1984). An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: evidence for long-lived receptors. *Anat Res* 210:375-383
- Hlubek, F., C. Lohberg, J. Meiler, A. Jung, T. Kirchner, T. Brabletz (2001). Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator. *J Biochem* 129(4):635-641
- Hollander, den A. I., M. A. van Driel, Y. J. M. de Kok, D. J. R. van de Pol, C. B. Hoyng, H. G. Brunner, A. F. Deutman, F. P. M. Cremers (1999). Isolation and mapping of novel candidate genes for retinal disorders using suppression subtractive hybridization. *Genomics* 58:240-249
- Holcomb, J. D., J. S. Mumm, A. L. Calof (1995). Apoptosis in the neuronal lineage of the mouse olfactory epithelium: regulation *in vivo* and *in vitro*. *Dev Biol* 172:375-383
- Huard, J. M. T., J. E. Schwob (1995). Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. *Dev Dyn* 203:17-25
- Ikeda, K. N. Emoto, S. B. Raharjo, Y. Nurhantari, K. Saiki, M. Yokoyama, M. Matsuo (1999). Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of neprilysin which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem* 274:32469-32477
- Izsvak, Z., Z. Ivics, D. Garcia-Estefania, S. C. Fahrenkrug, P. B. Hackett (1996). DANA elements: A family of composite, tRNA-derived short interspersed DNA elements associated with mutational activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1077-1081
- Johnson, G. D., T. Stevenson, K. Ahn (1999). Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem* 274:4053-4058
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessel (2000). Principles of neural science. ISBN 0-8385-7701-6 MacGraw Hill Companies, Inc., New York
- Kaplan, M. S., N. A. McNelly, J. W. Hinds (1985). Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 239:117-125
- Kellogg, D. E., I. Rygalkin, S. Chen, N. Mukhamedova, T. Vlasik, P. Siebert, A. Chenchik (1994). TaqStart Antibody: Hotstart PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against *Taq* DNA polymerase. *Biotechniques* 16:1134-1137
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203(3):253-310
- Korsching, S. (1995). Molekulare Grundlagen der Kodierung im Geruchssinn des Zebraäbrblings. Habilitationsschrift der Fakultät Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Korsching, S. I., S. Argo, H. Campenhausen, R. W. Friedrich, A. Rummrich, F. Weth (1997). Olfaction in zebrafish: what does a tiny teleost tell us? *Semin Cell Dev Biol* 8:181-187
- Korsching, S. I. (2001). Odor maps in the brain: spatial aspects of odor representation in sensory surface and olfactory bulb. *Cell Mol Life Sci* 58:520-530
- Korte, H. (2001). Identifizierung differentiell exprimierter Gene im *Bulbus olfactorius* von *Danio rerio*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
- Knöll, B., K. Zarbalis, W. Wurst, U. Drescher (2001). A role for EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development* 128:895-906

Kraus, A. (1999). Molekulare und morphologische Regeneration olfaktorischer Rezeptorneurone nach chemischer Läsion im olfaktorischen System des Zebraäbblings, *Danio rerio*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Laberge, F., T. J. Hara (2001). Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Res Rev* 36:46-59

Levine, R. L., S. Dethier (1985). The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* 237(4):427-44

Lewin, B. (1994). On neuronal specificity and the molecular basis of perception. *Cell* 79(6):935-43

Lewis, S. A., M. G. Lee, N. J. Cowan (1985). Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol* 101:852-861

Li, C., R. M. Booze, L. B. Hersh (1995). Tissue-specific expression of rat neutral endopeptidase (Neprilysin) mRNAs. *J Biol Chem* 270(11):5723-5728

Li, L., J. D. Dowling (2000). Disruption of the olfactoretinal centrifugal pathway may relate to the visual system defect in *night blindness b* mutant in zebrafish. *J Neurosci* 20(5):1883-1892

Liang, P., A. Pardee (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971

Lieberoth, B. (1999). Die Konnektivität der olfaktorischen Rezeptorneurone des Zebraäbblings, *Danio rerio*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Lichtenstein, A. V., V. L. Moiseer, M. M. Zaboikin (1990). A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced gel flattening. *Anal Biochem* 191(1):187-191

Lindberg I., L. White (1986). Reptilian enkephalins: implication for the evolution of proenkephalin. *Arch Biochem Biophys* 245:1-7

Lisitsyn, N., N. Lisitsyn, M. Wigler (1993). Cloning the difference between complex genomes. *Science* 259:948-951

Loi, D. K., N. Tublitz (1997). Molecular analysis of FMRFamide- and FMRFamide-related peptides (FaRPs) in the cuttlefish *sepia officinalis*. *J Exp Biol* 200: 1483-1489

Lois, C. und A. Alvarez-Buylla (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148

Lukyanov, K. A., G. A. Launer, V. S. Tarabykin, A. G. Zaraisky, S. A. Lukyanov (1995). Inverted terminal repeats permit the average length of amplified DNA fragments to be regulated during preparation of cDNA libraries by polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 229:198-202

Lukyanov, K. A., M. V. Matz, E. A. Bogdanova, N. G. Gurskaya, S. A. Lukyanov (1996). Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: An approach to in vitro cloning. *Nucleic Acids Res* 24:2194-2195

Malfroy, B., J. P. Swerts, A. Guyon, B. P. Roques, J. C. Schwartz (1978). High affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276:523-526

Malfroy, B., Schofield P. R., W. J. Kuang, Seeburg P. H., A. J. Manson, W. J. Henzel (1987). Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 144:59-66

Malnic B., J. Hirono, T. Sato, L. B. Buck (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96:713-723

Margolis, F. L., N. Roberts, D. Ferriero, J. Feldman (1974). Denervation in the primary olfactory pathways of mice: biochemical and morphological effects. *Brain Res* 81:469-483

- Marmorstein, R. (2001). Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 58:693-703
- Matsas R., I. S. Flucher, A. J. Kenny, A. J. Turner (1983). Substance P and (Leu)enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3011-3115
- Matsuntani, S., E. Senba, M. Tohyama (1986). Neuropeptide- and neurotransmitter-related immunoreactivities in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 272:331-342
- Matsuntani, S., E. Senba, M. Tohyama (1989). Distribution of neuropeptide-like immunoreactivities in the guinea pig olfactory bulb. *J Comp Neurol* 280:577-586
- Matsunami, H., L. B. Buck (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90:775-784
- McDonald, L. K., R. M. Dores (1991). Detection of Met-Enkephalin in the CNS of the Teleosts, *Anguilla rostrata* and *Oncorhynchus kisutch*. *Peptides*, 12:541-547
- McDonald, L. K., J. M. J. Joss, R. M. Dores. (1991) The phylogeny of Met-enkephalin and Leu-enkephalin: Studies on the holostean fish *Lepisosteus platyrhincus* and the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen Comp Endocrinol* 84:228-236
- Mellitzer, G., Q. Xu, D. G. Wilkinson (2000). Control of cell behaviour by signalling through EPH receptors and ephrins. *Curr Opin Neurol* 10:400-408
- Merchenthaler, I., J. L. Maderdrut, R. A. Altschuler, P. Petrusz (1986). Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of the rat. *Neurosci* 17:325-348
- Molecular Research Center (1997). Product description: Tri Reagent - RNA/DNA/protein isolation reagent. www.mcrgene.com
- Molnar, M., G. Casini, B. M. Davis, P. Bagnoli, N. C. Brecha (1994). Distribution of proenkephalin mRNA in the chicken and pigeon telencephalon. *J Comp Neurol* 348:419-432
- Mombaerts, P., F. Wang, C. Dulac, S. K. Chao, A. Nemes, M. Mendelsohn, J. Edmondson, R. Axel (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686
- Mombaerts, P. (1999). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286:707-711
- Mori, K., H. Nagao, Y. Yoshihara (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286:711-715
- Münz, H. (1999). GnRH-systems in the forebrain of cichlid fish. *Eur J Morphol* 37(2/3):100-102
- Murphy, L. J., R. Corder, A. I. Mallet, A. J. Turner (1994). Generation by the phosphoramidon-sensitive peptidases, endopeptidase-24.11 and thermolysin, of endothelin-1 and C-terminal fragment from big endothelin-1. *Br J Pharmacol* 112:137-142
- Murray, R. C., A. L. Calof (1999). Neuronal regeneration: lessons from the olfactory system. *Semin Cell Dev Biol* 10:421-431
- Myrs, E.W., G. G. Sutton, A. L. Deichler, I. M. Dew, D. P. Fasulo, M. J. Flanigan, S. A. Kravitz, C. M. Mobarry, K. H. J. Reinert, K. A. Remington and others. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* 287: 2196-2204
- Nagao, H., Y. Yoshihiro, S. Mtsui, H., Fujisawa, K. Mori (2000). Two domain-image sensory map with domain organization in the mouse main olfactory bulb. *Chem Senses* 11(13):3023-3027

- Negusco, A., P. Lorimier, F. Labat-Moleur, L. Azoti, C. Robert, C. Guillermet, C. Brambilla, E. Brambilla (1997). TUNEL: Improvement and evaluation of the method for *in situ* apoptotic cell identification. *Biochimica* 2:12-17
- Northcutt, R. G., A. Reiner, H. J. Karten (1988). Immunohistochemical study of the telencephalon of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *J Comp Neurol* 277:250-287
- Northcutt, R. G., L. E. Muske (1994). Multiple embryonic origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive neurons. *Develop Brain Res* 78:279-290
- Oelschläger, H. A., Helpert C., R. G. Northcutt (1998). Coexistence of FMRF_{AMIDE}-like and LHRH-like immunoreactivity in the terminal nerve and forebrain of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *Brain Behav Evol* 52:139-147
- Oka, Y., T. Matsushima (1993). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive terminal nerve cells have intrinsic rhythmicity and project widely in the brain. *J Neurosci* 13:2161-2176
- Okubo, K., M. Amano, Y. Yoshiura, H. Suetake, K. Aida (2000). A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 276:298-303
- Olson, G. A., R. D. Olson, A. J. Kastin (1989). Endogeneous Opiates: 1987. *Peptides* 10:250-267
- Ouimet T., P. Facchinetti, C. Rose, M.-C. Bonhomme, C. Gros, J.-C. Schwartz (2000). Neprilysin II: A putative novel metalloprotease and its isoforms in CNS and testis. *Biochem Biophys Res Commun* 271:565-570
- Otaki, J. M., S. Firestein (1999). Neurestin: putative transmembrane molecule implicated in neuronal development. *Dev Biol* 212(1):165-181
- Parhar, I., D. Pfaff, M. Schwanzel-Fukuda (1995). Genes and behavior as studied through gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: comparative and functional aspects. *Cell Mol Neurobiol* 15(1):107-116
- Panula, P., A. A. Aarnisalo, K. Wasowicz (1996). Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Prog Neurobiology* 48(4-5):461-487
- Panula, P., E. Kalso, M.-L. Nieminen, V. K. Kontinen, A. Brandt, A. Pertovaara (1999). Neuropeptide FF and modulation of pain. *Brain Res* 848:191-196
- PCR-Select Differential Screening Kit User Manual, PT-3138-1 (1997). Clontech Laboratories. www.clontech.com
- Penlington, M. C., M. A. Williams, J. P. Sumpter, M. Rand-Weaver, D. Hoole, C. Arme (1997). Isolation and characterization of mRNA encoding the salmon- and chicken-II type gonadotropin-releasing hormones in the teleost fish *Rutilus rutilus* (Cyprinidae). *J Mol Endocrinol* 19:337-346
- Perroteau, I., M. Oberto, I. Soncin, S. Voyron, M. De Bortoli, P. Bovolin, A. Fasolo (1999). Transregulation of erbB expression in the mouse olfactory bulb. *Cell Mol Biol* 45(3):293-301
- Pinelli, C., B. D'Aniello, P. Sordino, D. L. Meyer, M. Fiorentino, R. K. Rastogi (2000). Comparative immunocytochemical study of FMRFamide neuronal system in the brain of *Danio rerio* and *Acipenser ruthenus* during development. *Dev Brain Res* 119:195-208
- Porkka, K. P., T. Visakorpi (2001). Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array. *J Pathol* 193:73-79
- Propper, C. R., F. L. Moore (1991). Effects of courtship on brain gonadotropin hormone-releasing hormone and plasma steroid concentration in a female amphibian (*Taricha granulosa*). *Gen Comp Endocrinol* 81:304-312
- Ran, Q., O. M. Pereira-Smith (2000). Identification of an alternatively spliced form of the Tat interactive protein (Tip60), Tip60(β). *Gene* 258:141-146

- Reiner, A., R. G. Northcutt (1987). An immunohistochemical study of the telencephalon of the african lungfish, *Protopterus annectens*. *J Comp Neurol* 256:463-481
- Ressler, K. J., S. L. Sullivan, L. B. Buck (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73:597-609
- Ressler, K. J., S. L. Sullivan, L. B. Buck (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-1255
- Rinder, H., T. A. Bayer, E.-M. Gertzen, W. Hoffmann (1992). Molecular analysis of the ependymin gene and functional test of its promotor region by transient expression in *Brachydanio rerio*. *DNA Cell Biol* 11(6):425-432
- Rissman, E. F., X. Li, J. A. King, R. P. Millar (1997). Behavioral regulation of gonadotropin-releasing hormone production. *Brain Res Bull* 44(4):459-464
- Rodriguez, I., P. Feinstein, P. Mombaerts (1999). Variable patterns of axonal projections of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97:199-207
- Roques, B. P., M. C. Fournie-Zaluski, E. Soroca, J. M. Lecomte, B. Malfroy, C. Llorens, J. C. Schwartz (1980). The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature* 288:286-288
- Roques, B. P., F. Noble, V. Dauge, M.-C. Fournie-Zaluski, A. Beaumont (1993). Neutral Endopeptidase 24.11. Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45:87-146
- Roques, B. P. (2000). Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends Pharmacol Sci* 21(12):475-483
- Royet, J. P., C. Souchier, F. Jourdan, H. J. Ploye (1988). Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol* 270:559-568
- Sakaguchi, N., C. N. Berger, F. Melchers (1986). Isolation of cDNA copy of an RNA species expressed in murine pre-B cells. *EMBO J* 5:2139-2147
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schäfer, M. L., T. E. Finger, D. Restrepo (2001). Variability of position of the P2 glomerulus within a map of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 436:351-362
- Schmidt, R. (1995). Cell-adhesion molecules in memory formation. *Behav Brain Res* 66:65-72
- Schulte-Merker, S., R. K. Ho, B. G. Herrmann, C. Nüsslein-Vollhard (1992). The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* 116:1021-1032
- Schwanzel-Fukuda, M., D. W. Pfaff (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-164
- Schwartz, G. A., J. E. Crandall (1991). Subsets of olfactory and vomeronasal sensory epithelia cells and axons revealed by monoclonal antibodies to carbohydrate antigens. *Brain Res* 547:239-248
- Schwarz Levey, M., D. M. Chikaraishi, J. S. Kauer (1991). Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J Neurosci* 11:3556-3564
- Schwob, J. F., S. L. Youngentob, R. G. Mezza (1995). Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J Comp Neurol* 359:15-37

- Schwob, J. E., S. L. Youngentob, G. Ring, C. L. Iwema, R. C. Mezza (1999). Reinnervation of the rat olfactory bulb after methyl bromide-induced lesion. *J Comp Neurol* 359:15-37
- Sei C. A., R. Richard, R. M. Dores (1989). Steady-state levels of prodynorphin-related end-products from the brain of the amphibian, *Xenopus laevis*. *Brain Res* 479:162-166
- Seidah, N. G., Chretien M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotech* 8:602-607
- Sheperd, G. M. (1994). Discrimination of molecular signals by olfactory receptor neuron. *Neuron* 13:771-790
- Shi, S. R., M. E. Key, K. L. Kalra (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating tissue section. *J Histochem Cytochem* 39:741-748
- Siebert, P. D., A. Chenchik, D. E. Kellog, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov (1995). An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 25:2598-2602
- Singer, M. S., G. M. Shephard (1994). Molecular modeling of ligand-receptor interactions in the OR5 olfactory receptor. *Neuroreport* 5(10):1297-300
- Singer, M. S., G. M. Shephard, C. A. Greer (1995). Olfactory receptors guide axons. *Nature* 377:19-20
- Sive, H. L., T. StJohn (1988). A simple subtractive hybridization technique employing photoactivatable biotin and phenol extraction. *Nuc Acids Res* 16:10937
- SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual, PT3041-1(1997). Clontech Laboratories. www.clontech.com
- Sneath und Sokal (1973). Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco. zitiert von: gendb.rrz.uni-koeln.de/gcg10help/growthree.html
- Sollars, C., P. Danielson, J. M. P. Joss, R. M. Dores (2000). Deciphering the origin on Met-enkephalin and Leu-enkephalin in lobe-finned fish: cloning of Australien lungfish proenkephalin. *Brain Res* 874:131-136
- Souazé, F., A. Ntodou-Thomé, C. Y. Tran, W. Rostène, P. Forgez (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 21:280-285
- Specca, D. J., D. M. Lin, P. W. Sorensen, E. Y. Isacoff, J. Ngai, A. H. Dittman (1999). Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron* 23(3):487-98
- Stacey, N. E., Kyle A. L. (1983). Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol Behav* 30:621-628
- Stell, W. K., S. E. Walker, K. S. Chahan, A. K. Ball (1984). The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:940-944
- Sterrer, S., A. Königstorfer, W. Hoffmann (1990). Biosynthesis and expression of ependymin homologous sequences in zebrafish brain. *Neurosci* 37(1):277-284
- Strotmann, J. (2001). Targeting of olfactory neurons. *Cell Mol Life Sci* 58(4):531-7
- Struble, R. G., D. N. Dhanraj, Y. Mei, M. Wilson, R. Wang, V. Ramkumar (1998). β -Amyloid precursor protein-like immunoreactivity is upregulated during olfactory nerve regeneration in adult rats. *Brain Res* 780:129-137
- Sullivan, K. F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Ann Rev Cell Biol* 4:687-716

- Sullivan, S. L., S. Bohm, K. J. Horowitz, L. B. Buck (1995). Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium. *Neuron* 15:779-789
- Stein, von O. D., W.-G. Thies, M. Hofmann (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 25(13):2598-2602
- Tessier-Lavigne, M., C. S. Goodman (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133
- Turner, A. J., R. E. Isaac, D. Coates (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metallopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23:261-269
- Usui, H., T. Ichikawa, Y. Miyazaki, S. Nagai, T. Kumanishi (1996). Isolation of cDNA clones of the rat mRNAs expressed preferentially in the prenatal stages of the brain development. *Dev Brain Res* 97:185-193
- Uzbekova, S., F. Ferrière, Y. Guiguen, T. Bailhache, B. Breton, J.-J. Lareyre (2001). Stage-dependent and alternative splicing of GnRH messengers in rainbow trout testis during spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 59:1-10
- van Vactor, D. V., J. G. Flanagan (1999). The middle and the end: slit brings guidance and branching together in axon pathway selection. *Neuron* 22:649-652
- Valdenaire, O., D. Lepailleur-Enouf, J. M. Lecomte, G. Egidy, A. Thourad, A. Barret, R. Vranckz, C. Tougard, J. B. Michel (1999). A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter. *Eur J Biochem* 264:1-10
- Vallarino, M., C. Bucharles, F. Facchinetti, H. Vaudry (1994). Immunocytochemical evidence for the presence of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in distinct neurons in the brain of the elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula*. *J Comp Neurol* 347:585-597
- Vallarino, M., J.-L. Thoumas, M. A. Masini, M. Trabucchi, N. Chartrel, H. Vaudry (1998). Immunocytochemical localization of enkephalins in the brain of the african lungfish, *protopterus annectens*, provides evidence for differential distribution of Met-enkephalin and Leu-enkephalin. *J Comp Neurol* 396:275-287
- Vallarino, M., M. Trabucchi, H. Vaudry (1998). Neuropeptides in the lungfish brain: phylogenetic implication. *Ann N Y Acad Sci* 839:53-59
- Vassar, R., J. Ngai, R. Axel (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74:309-318
- Vassar, R., S. K. Chao, R. Sitcheran, J. M. Nunez, L. B. Vosshall, R. Axel (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991
- Velculescu, V. E., L. Zhang, B. Vogelstein, K. W. Kinzler (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-487
- Verhaagen, J., A. B. Oestreicher, M. Grillo, Y. S. Gipsen, F. L. Margolis (1990). Neuroplasticity in the olfactory system: differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein. *J Neurosci Res* 26:31-44
- Vernier, P., R. Matrippolito, C. Helin, M. Bendali, J. Mallet, H. Tricoire (1996). Radioimager quantification of oligonucleotide hybridization with DNA immobilized on transfer membrane: application to the identification of related sequences. *Anal Biochem* 235:11-19
- Vietor, I., Huber, L. A. (1997). In search of differentially expressed genes and proteins. *Biochim Biophys Acta* 1359:187-199
- Wan, J. S., S. J. Sharp, G. M.-C. Poirer, M. G. Erlanger und andere (1996). Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnology* 14:1685-1691

- Wang, F., A. Nemes, M. Mendelsohn, R. Axel (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93:47-60
- Wang, X., S. Yaish-Ohad, X. Li, F. C. Barone, G. Z. Feuerstein (1998). Use of suppression subtractive hybridization strategy for discovery of increased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression in brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metabol* 18:1173-1177
- Wang, Z., D. D. Brown (1991). A gene expression screen. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11505-11509
- Whitlock, K. E., M. Westerfield (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci* 18(21):8919-8927
- Whitlock, K. E., M. Westerfield (2000). The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* 127:3645-3653
- Whitlock, K. E., E. Stephens, L. Sanders (2000). Olfactory placode development in the zebrafish. *Neuroscience Meeting 2000. Poster abstract. sfn.scholarone.com*
- Weth, F., W. Nadler, S. Korsching (1996). Nested expression domains for odorant receptors in zebrafish olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 93:1321-13326
- Westerfield, M. (1994). *The Zebrafish Book. A guide for laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene, OR
- Wilcox J. N., H. Pollard, J. Moreau, J. C. Schwartz, B. Malfroy (1989). Localization of enkephalinase mRNA in Rat Brain by in situ hybridization: comparison with immunohistochemical localization of the protein. *Neuropeptides* 14:77-83
- Wilson, S. W., L. S. Ross, L. S. Parett, S. S. J. Easter (1990). The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Development* 108:121-145
- Wirsig-Wiechmann, C. R. (2001). Function of GnRH in olfaction. *Keio J Med* 50(2):81-85
- Wixon, J. (2000). Featured organism: *Danio rerio*. *Yeast* 17:225-231
- Wong, M., R. A. Rius, Y. P. Loh (1991). Characterization of *Xenopus laevis* proenkephalin gene. *Mol Brain Res* 11:197-205
- Wullmann, M. F., B. Rupp, H. Reichert (1996) *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain - A Topological Atlas*. Birkhäuser Verlag Basel-Boston-Berlin. ISBN 3-7643-5120-9
- Yokota, N., M. Uchijima, S. Nishizawa, H. Namba, Y. Koide (2001). Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction. *Stroke* 32:168-174
- Yoshihara, Y., M. Kawasaki, A. Tamada, H. Fujita, H. Hayashi, H. Kagamiyama, K. Mori (1997). OCAM: a new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J Neurosci* 17:5830-5842
- Yoshihara, Y., K. Mori (1997). Basic principles and molecular mechanisms of olfactory axon pathfinding. *Cell Tissue Res* 290:457-463
- Zaidi, A. U., K. W. Kafitz, C. A. Greer, B. S. Zielinski (1998). The expression of tenascin-C along the lamprey olfactory pathway during embryonic development and following axotomy-induced replacement of the olfactory receptor neurons. *Develop Brain Res* 109:157-168
- Zhao, H., R. R. Reed (2001). X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell* 104(5):651-660
- Zigmond, M. J., F. E. Bloom, S. C. Landis, J. L. Roberts, L. R. Squire (1999). *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, San Diego, London. ISBN 012780870-1

Zippel, H. P., P. W. Sorensen, A. Hansen (1997). High correlation between microvillous olfactory receptor cell abundance and sensitivity to pheromones in olfactory nerve-sectioned goldfish. *J Comp Physiol A* 180:39-52

7 Anhang

Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AC	<i>Accession Nummer</i> (Nummer der Sequenz in der Datenbank)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 Milliarden Becquerel)
cpm	<i>Counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
dbest	<i>Database of expressed sequence tags</i> (Datenbank der exprimierten endständigen Sequenzen)
dCTP	2'-Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
G	Guanosin
G3PDH	siehe GAPDH
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-1-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase Gen
M	Molar (mol/l)
MeOH	Methanol
min	Minuten
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Transkript)
μg	Mikrogramm
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nr	<i>all non-redundant GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences</i>
O. D.	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Natriumchloridlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Poly(A ⁺)RNA	<i>Messenger RNA</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rpm	<i>Rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
SSC	<i>Sodium saline citrat</i> (citratgepufferte Natriumchloridlösung)
SSH	<i>Suppression subtractive hybridization</i> (subtraktive Unterdrückungs-Hybridisierung)
SS-PCR	<i>Suppression subtractive PCR</i> (subtraktive Unterdrückungs-PCR)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit zur Kennzeichnung der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/ v	Volumen zu Volumen
v/ w	Volumen zu Gewicht
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid

Sequenzen

Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz	Länge [bp]	T _m [°C]	Hersteller
b-act1	TAGCTGGTCGTGACCTGACA	20	60	MWG
b-act2	TGGCATAACAGGTCCTTACGG	20	60	MWG
cDNA Synthesis Primer	TTTTGTACAAGCTT ₃₀	54		Clontech
PCR Primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22	59	Clontech, MWG
PCR Primer Smart	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	23	61	Clontech, MWG
Nested Primer 1	TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT	22	73	Clontech, MWG, Interactiva
Nested Primer 2R	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT	22	68	Clontech, MWG, Interactiva
G3PDH 3' Primer	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	20		Clontech
G3PDH 5' Primer	ACCACAGTCCATGCCATCAC	20		Clontech
GAPDH 1	GCATTACAGTAGCCTTTATACC	22	57	MWG
GAPDH 2	GCACTCCAAAGAGTAACTCC	20	57	MWG
sp6 T-Vector 1	TGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAC ACTATAG	33	56	Gibco
T7 pSPORT1	TACGACTCACTATAGGGAAAGCTGG	25	53	Gibco
T7 pSPORT1 RACE	ATAGGGAAAGCTGGTACGCCTGC	23	54	Gibco
T7 T-Vector 1	CGACTCACTATAGGGCGAATTGGG	24	54	Gibco
267seq1	GGTGAGCATATTCCCTGG	17	52	Sigma-Ark
267seq2	CGTGTCCATTTTCAGTGC	17	52	Sigma-Ark
271seq1	GCTTTAAGAAGCCTCCG	17	52	Sigma-Ark
271seq2	TCTATGGGCTTGGAGTC	17	52	Sigma-Ark
273 nested	GGTGCGGTTTCAGAACAGG	18	47	Gibco
273 RACE	GTGCCATTATTTCCAGAGCTGCCCTG	26	56	Gibco
281-1	CCTGGATGGGAGACCACATG	20	60	Sigma-Ark
281-2	CAGAGGGTCAGGATGTCAATTTATCG	26	60	Sigma-Ark
281 nested	GCGCTCAACCTGTGGTCT	18	47	Gibco
281 ohne sticky reg	GAGGCCATGATCGTAAGGGC	20	60	Sigma-Ark
281 RACE	ATCGTCTCATCCGAAAGATGGCGCC	25	56	Gibco
T3-27F	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGG ATAGAGGACTTTCAGG	43	68	Sigma-Ark
T3-250	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGC CTTCCACTTTAGAGAG	43	68	Sigma-Ark
T3-267R	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGA CCATGCATTTAGACTGATC	45	63	Gibco
T3-271R	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGT CTTACTCACACAATAACATCAC	48	63	Gibco
T3-273R	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGG GCTCAGTTTCCTTCCAC	43	65	Gibco
T3-281R	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGA AAGACTGGTTTGCTTCC	43	63	Gibco
T3-M1R	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGC CATAATGTGGAGGATATTTT	46	63	Gibco
T3-M10F	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGC TGAAGTAGGCAAGTCGAC	44	65	Gibco
T3-M10F2	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGT GTTTCAGCTTAATGTGCAG	44	65	Gibco
T3-M3F	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGA CCGCAGAGATTCGG	40	65	Gibco
T3-M41R	GGATCCATTAACCCCTCACTAAAGGGT GGATTCTCGTTTGGTAAG	44	63	Gibco

Sequenzen der lateralen Kandidaten_{Plasmid}

Klon 3, 1B9, M13

TTTTTTNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCGNAATGGNCACATTTAATGAACAACCTTCTCATTTTATATACATCTATAAAAAG
AACCAGATACAGGTTACAAGAATCTAAAGCTAATACATACATTATTAATAATAAACTTTTTCTCATGTTAAAGATACATAT
CATAGTTTACAAAATATGATCAAGGAGAATTAAGCAATTATGAAGGTTTGAAGAAGAAGAAGAAATAAAAAAAAAAATCTAAG
TTTCTAAAATTATAGTTTATTCAATGATAACAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGAAAGNGAAACAATTTCTCAAGAAGGTAGTATTTAA
CTGTGATATTGACTAGAAAAAGGCTGCAGAAAACAGATGGTGAAAGGCAATAGTGAACAGACTGAAAATACGATTCCGAACGG
TGCTTAATCTTCAGACGGTCCGACGTGACACGTTTTTTCTTCTGTTACAAAAGGCAGTCCAGGACAGTCCAAACCAATTTGT
TATTTACAG

Klon 3, 1B9, M13R

ACTAGTGGGNAGCNTGGTCGCGGCCGGNGGCCNAAATCTTCATGAGCTTCAAAGACCGAGGAGGAAAACGTTGATTTCGAAGG
CCGTCAATTTGATAACTGTTGTATTCCTTTTGTTTACCTCTTTTTCTTTTCATCCATTTTTTGGGCCCTGAAACACAAGAGAAG
TTGAAACTGTAATAACAAATTGGTTTGGACTGTCTGGACTGCCTTTTTGTAAACAGGAAGAAAAACGTGTACGTCCGACCG
TCTGAAGATTAAGCACCGTTCCGGAATCGTATTTTTAGTCTGTTTCACTATTTGCCTTTCCACATCTGTTTCTGCAGCCTTTTT
TAGTCAATATCACAGTTAATACTACCTTCTTGGAGAAATTGTTTCACTTTCTTTTTTTTTTTTTTTGTTATCATTGAATAAA
CTATAATTTTAGAACTTAGATTTTTTTTTTTTATTTCTTCTTCTTCCAAACCTTCATAATTGCTTAATTTCTCCTTGATCAT
ATTTTGNAACTATGATATGTATCTTTAACATGAGAAAAAGTTTATTATTTAATAATGNATGNATTAGCTTTAGATTCTTG

Klon 6, 1D5, M13R

TGGTCGCGGCCCGCTCCAGAGAGATAGAGACTTTCAGGGCCCCATGTTCTGCCCTCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAG
AACTTCTTCAATCTCAATCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTTCTGAAAGTT
CAAGAGCACAGCTGAAGTCAAGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCCAAAGGCATTGTGCACTGTCTCCTTG
ACCTTGCTTCCAGACTGCTTGGAGGTAACCTTCTTCCATGTAGTAATCACCGCCCTCCGCACCACGCCCTACCTGCC
GGCGGCCGAATCCCGCGCCATGGCGGCC

Klon 6, 1D5, M13R

ACTTAGAGAGATAGAGACTTTCAGGGCCCCATGTTCTGCCCTCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAGAACTTNTTCAATCTCA
ATTTCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTTCTGAAAGTTCAAGAGCACAGNTGAA
GTCAGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCCAAAGGCATTGTGCACTGTCTCCTTGACCTTGCCCTCCAGAC
TGCTTGGAGGTAACCTTCTTCCATGTAGTAATCACCGCCCTCCGCACCACGCCCTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAAA
TCCCGCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTNGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGATTACAATTTCACTGGCCGTC
GTTTTACAACGTCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAACGCCCTTGACGACAT

Klon 8, 1D11, M13

GTACGNGGNTGAAACAGCAAGCTTGACNANCTTCNAGNATTTGCACGCTCNGGCCTATNCGNCGAGNCTGNCGNATNATG
AGGANGGCTCCATGACGATCACNAGCTNCTTCGACCTCGTTCCACTGACTGAAGAAAACACNCAAGGATGACCTGCAATACCTG
CCAACAATTGGCTACATACAGTA

Klon 11, 1H7, M13

GGAGGGCGGTGATTACTACATGGAAGAGAAGGTTTTACCTCCAAGCAGTCTGGAAGGCAAGGTCAAGGAGACAGTGACAAATG
CCTTTTGGGACCATCTTAAAGAGCAACTATCAGCAACTCCCCCTGACTTCAGCTGNGCTCTTGAACCTTCTGAAAGAAATTTAA
GAGATCTTGCTATCACTGCTATTACCACGCCAGAACCGTCTGAGAATTGAGATTG

Klon 16, 2G9, M13

ACTCTATGAGATAGACAGTNAAAATGAGAGTTGCNAGAAGGAGACTCTGCAGCTCCGCAAGCACCTGATGGAGATTCCCCTTG
ATGCCACTCACGCTCTGAGAGTTACATGGGTAGCCCCCTCTCTCACCGAGCAGGGACTCANAGTTCGTGNGTGGAACGGAAAG
TTTCTGAACTTCACGCTCACTACCTCTGTCTACCACCTCCTGTGGCTGTTA

Klon 16, 2G9, M13R

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGCGAAAGCTCATCTTTATTGACTTCAATTANAGNCGANAAACAAATTGCAAAAAG
CAAAAAAGAAGGTAAGATAGAAAGNGCAAGCATTTTCTGAANAAAGAGAGATGGATNCAGGAAATATTTGTAATTAANGCT
CTTTTTATTATTGTATGTAGCCATTGTTGGCAGTTTGCAGGTCACTCTG

Klon 17, 2G10, M13

GAAAGTTTCTGAACTTCACGCTCACTACTCTCTGTCTACCACCTCCTGTGGCTGNTTGACGGTCTCTGGCTCCTACTATGGC
GAGAAGAAAGATCTTTTCTTCCAGCTTCTCGGTGTTGAAAACAGAAGTTGACGACCTTCAAGTATTTTCCCTCCGGCCTATTG
TGAGGGTGTGTCATTTGAGGAGGCTCCAGACGATCACAGCTTCTTCGACCTGTTCCAGACTGAAGAAAACACACAAGATGAC
CTGCAAACTGCCAACATGGCTACCGTACAATAATAAAAAGAGCATTTAATTACAAATATTTCTGATCCATCTCTTTCT
TCAGAAAATGCTTGCACTTTCTATCTTACCTTTTTTTTTTGCCCTTTTGCAATTTGTTTCTGCACTCTAATGAAGTCA

Klon 17, 2G10, M13R

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGAAGGCTCATCTTTATTGACTTCAATTAGAGNGCAGAAAACAAATTGCAAAAAG
ACAAAAAAAAGGTAAGATAGAAAGNGCAAGCATTTTCTGAAGAAAGAGAGATGGATACAGGAAATATTTGTAATTAATGCT
CTTTTTATTATTGTACGTAGCCATTGTTGGCAGTTTGCAGGTCACTCTG

Klon 19, 3D5, M13

GTAGGGCGTGGTGCAGGGGGCGGTGATTACTACATGGAAGAGAAGGTTTTACCTCCAAGCAGTCTGGAAGGCAAGGTCAAGGA
GACAGTGCACAATGCCTTTTGGGACCATCTTAAAGAGCAACTATCAGCAACTCCCCCTGACTTCAGCTGTGCTCTTGAACCTC
TGAAAAGAAATTAAGAGATCTTGCTATCACTGCTATTACCACGCCAGAACCGCCTGAGAATTGAGATTGAAGAAGTTCTGGAC
ATGGACTTGCTCAAGCAGGAGGCAGAACATGGGGCCCTGAAAGTCTCTATCTCTCTAAGTACCTCGGCGCGACCACGCTAAT
CACTAGTGCAGGCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACCGCTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTAC
CTAAAATAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT

Klon 19, 3D5, M13R

GGTACTTAGAGAGATAGAGGACTTTCAGGGCCCCATGTTCTGCCTCCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAGAACTTCTTCAATC
TCAATTCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTTCAGAAGTTCAAGAGCACAGCT
GAAGTCAGGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCCAAAAGGCATTGTGCACTGTCTCCTTGACCTTGCCCTTCCA
GACTGCTTGGAGGTAAAACCTTCTCTCCATGTAGTAATCACCGCCCTCCGCACCACGCCCTACCTGCCCCGGGCGGCCGCTCG
AAATCCCCGGCGATGGCGNCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTGCGCTATAGTGAGTGTATTACAATTCACTGGCCGT
CGCTTTACAACGCG

Klon 23, 4A10, M13

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCGAAAGCTCATCTTTATTGACTTCATTAGAGTGCAGAAA
GACAAAAAAGGTTNAGATAGAAAGTGCAAGCATTTTCTGAAGAAAGAGAGATGGATACAGGAAATATTTGTAATTAATG
CTCTTTTTATTATTGNATGTAGCCATTGNTGGTAGTTTGCAGGTCATCTGTGTGTTTTCTTCAGTCGNGGAACAGGTCNA
AANCTGTGATCGTCTGGAGCCT

Klon 24, 4B7, M13

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCGAAAGCTCATCTTTATTGACTTCATTAGAGTGCAGAAA
AAAAAAGAAGGTAAGATAGAAAGTGCAAGCATTTTCTGAAGAAAGAGAGATGGATACAGGAAATATTTGTAATTAATGCTC
TTTTTATTATTGTATGTAGCCATTGTTGGCAGTTTGCAGGTCATCTGTGTGTTTTCTTCAGTCGTGGAACAGGTCGAAGA
CTTGTGATCGTCTGGAGCCTCCTCAAATGACACACCCTCACAATAGGCGGAGGTGCAAAATACTTGAAGGGTTCGTAAC
TTTCAACACCGAA

Klon 24, 4B7, M13R

ACTCTATGAGATAGACAGTAAAAATGAGAGTTGCAAGAAGGAGACTCTGCAGTCCGCAAGCACCTGATGGAGATCCCCTTG
ATGCCACTCAGGAGTCTGAGAGTTACATGGGTAGCCCTCTCTCACCAGCAGGGACTCAGAGTTCGTGTGTGGAACGGAAAG
TTTCTTGAACCTTACGCTTACTACTCTCTGTCTACCACCTCCTGTGGCTGTTTGACGGTCTCTGGCTCCTACTATGGCGAGAA
GAAAGATCTTTTCTTCAGCTTCTTCGGTGTGAAACAAGAAGTTGACGACCTTCAAGTATTTGCACCTCCGGCCTATTGTGAG
GGTGTGTCAATTTGAGGAGGCTCCAGACGATCACAGTCTTTCGACCTGTTCCACGACTGAAGAAAACACACAAGATGACCTGC
AAACTGCCAACAAATGGCTACATACAATAATAAAAGAGCATTTAATTACAAATATTTCTCTG

Klon 26, 4C5, M13

ACTCTATGAGATAGACAGTAAAAATGAGAGTTGCAAGAAGGAGACTCTGCAGTCCGCAAGCACCTGATGGAGATCCCCTTG
ATGCCACTCAGGAGTCTGAGAGTTACATGGGTAGCCCTCTCTCACCAGCAGGGACTCAGAGTTCGTGTGTGGAACGGAAAG
TTTCTTGAACCTTACGCTTACTACTCTCTGTCTACCACCTCCTGTGGCTGTTTGACGGTCTCTGGCTCCTACTATGGCGAGAA
GAAAGATCTTTTCTTCAGCTTCTTCGGTGTGAAACAAGAAGTTGACGACCTTCAAGTATTTTACCCTCCGGCCTATGNNAGG
GGTGTGTCAATTTGAGGAGGCTCCAGACGATCACAGTCTTTCGACCTGTTCCACGACTGAAGAAAACACACAAGATGACCTGC
CAAACCTGCCAACAAATGGCTACATACAATAATAAAAGGAGCATTTAATTACAAATATTTCTCTG

Klon 27, 4G9, M13

GTACTTAGAGAGATAGAGGACTTTCAGGGCCCCATGTTCTGCCTCCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAGAACTTCTTCAATCT
CAATTCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTTCAGAAGTTCAAGAGCACAGCTG
AAGTCAGGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCCAAAAGGCATTGTGCACTGTCTCCTTGACCTTGCCCTCCAG
ACTGCTTGGGAGGTAAAACCTTCTCTTCCATGTAGTAATCACCGCCCTCCGCACCACGCTGGCCCCGGGGGGG

Klon 27, 4G9, M13R

GTAGGGCGTGGTGCAGGGGGCGGTGATTACTACATGGAAGAGAAGGTTTTACCTCCAAGCAGTCTGGAAGGCAAGGTCAAGGA
GACAGTGCACAATGCCTTTTGGGACCATCTTAAAGAGCAACTATCAGCAACTCCCCCTGACTTCAGCTGTGCTCTTGAACCTC
TGAAAAGAAATTAAGAGATCTTGCTATCACTGCTATTACCACGCCAGAACCGCCTGAGAATTGAGATTGAAGAAGTTCTGGAC
ATGGACTTGCTCAAGCAGGAGGCAGAACATGGGGCCCTGAAAGTCTCTATCTCTCTAAGTACCTCGGCGCGACCACGCTAA
TCCCGCGCCATGGCGGTGCGGAGCATGCCGACCGTCCGGGCCCAATTGCGCCTATAGTG

Klon 35, 6B7, M13

ACAGTAGGGGGGAGCTNGGATGTCTGGCTCCTCCAGGCTTTGCAGAGAGCAACAGCAGAGAAACGCACCTCCCCTTTCTCTC
GCTCCATAAACTCACGGCACACCCTTGCCGCATCCATGACAAAGCTGTCTGGTTTTGTAGGCCATGACTCACAGGTCATCA
ATCTACCATCCAGTCTATAAAGGCGACCGTTTACATTTGACAAATGTAATAAAATGAAATTGACTTTGCTGCCTCTGGCCG
ACACTGACCTCATCAGCAACAGCATCATGAGTTTCTGGATAGCCTTATTTTGGTCAAGTTCTTTGGCTGTTCTGCAGGAG
ACATCCCTGAGGTGGCTTCTAGAACTTCTTTAGTGCAGAATTATTATCAAATCAATACTG

Klon 36, 6B9, M13

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCGAAAGCTCATCTTTATTGACTTCATTANAGNCCANAA
GACAAAAAAGGTTAAGATAGAAAGNGCAAGCATTTTCTGAAGAAAGAGAGATGGATACAGGAAATATTTGTAATTAATG
CTCTTTTTATTATTGTATGTAGCCATTGTTGGTAGTTTGCAGGTCATCTTG

Klon 47, 10D3, M13

GTACTTTGTAATGTGAATTCGCGTTGTGGATGTATGAATATATATATTGTAAATTTATTTTTTTTTTTTACACTTATCTAGCTC
CATAACAACACTATTTGTTTTGATTGTCTGTCTGAGCCCTAAAATTGCTCTCGTCTTGCCTGTGAAAAGTGTGTGTA
GTTATAGATCATGGCAGTATTTTGTGTAGTAAAAATAGAGCTGTAAAATAATAATAATATAGTAATGAGAATTACTCAACG
CATAACAACAAATATATAGTGAATAAATTACACAATGACCAAATAAATGACATAATAGTCTAAAATGGCATTTTTGATGCA
AAATATAATTAATATAAGTATATATTTTAGCTTTGATTTTAAACAAGATCGTGACCTCAATAGGCCTGGTATATATGTTACA
ACAACGAAAAAGGGATAGTCCACCC

Klon 47, 10D3, M13R

GTACATGGATTTGATTGGAGATTGAAATTCCTTCTATGTTAGTAATGAATTTGGACTGTGATGTCAGGAGAAATTCACCCAAA
AATTACAATAATGGTATTTACTTTCCCTATAAGCTATTGAGAAAAAAGAAAAACAAAATACACTTGCCTTTGTTCTATGGAA
GTCATACAGGCTTGTGTAATTGCACAAGGATGAGAAAAATAATGACATCATTTTTATTTTTGGGTGGACTATCCCTTTTTCTTG
TTGTAACATATATACCAGGCCTATTGAGGTACAGATCTTGTAAAATCAAAGCTAAAAATATATACTTATATTTAATTATAT
TTGCATCAAAAATGCCATTTTAGACTATTATGTCATTTATTTGGCATTGTGTAATTTTCACTATATATTTGTTG

Klon 49, 10G4, M13R

ACGCGGGCACTCAGAGTCTGAGAGTTACATGGGTAGCCCTCTCTCACCGAGCAGGGACTCAGAGTTCGTGTGTGGAACGGA
AAGTTTCTGAACTTCACGCTCACTACTCTGTCTACCACTCCTGTGGCTGTTTGACGGTCTCTGGCTCCTACTATGGCGA
GAAGAAAGATCTTTTCTCAGCTTCTTCGNGTTGAAACAGAAGTTGACGACCTTCAAGTATTTTACCTCCGGCCTATTGTG
AGGGTGTGTCATTTGAGGAGGCTCCAGACGATCACAGCTTCTTCGACCTGTTCCACGACTGAAGAAAACACACAAGATGACCT
GCAACTGCCAACAAATGGCTACATACAATAAAAAAGAGCATTTAATTACAATAATTTCTCTG

Klon 53, 11A12, M13R

ACTTAGAGAGATAGAGGACTTTACAGGGCCCATGTTCTGCCTCCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAGAATCTTCAATCTCA
ATTTCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTCAGAAGTTCAAGAGCACAGCTGAA
GTCAGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCAAAAGGCATTGTGCACCTGTCTCCTTGACCTTGCCTTCCAGAC
TGCTTGAGGTAACCTTCTCTTCCATGTAGTAATCACCGCCCTCCGCACCACGCCCTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAAT
CCCGCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTACAATTCAGTGGCCGCT
CGTTTTACAACGTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGC
GTAAGGCGAAAAAGCCGACCGATCGCCCTTCCAACAAGTTGCGCACCTGAATGGCGAATGGACGCGCCTGTA

Klon 57, 11E7, M13R

ACTTAGAGAGATAGAGGACTTTACAGGGCCCATGTTCTGCCTCCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAGAATCTTCAATCTCA
ATTTCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTCAGAAGTTCAAGAGCACAGCTGAA
GTCAGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCAAAAGGCATTGTGCACCTGTCTCCTTGACCTTGCCTTCCAGAC
TGCTTGAGGTAACCTTCTCTTCCATGTAGTAATCACCGCCCTCCGCACCACGCCCTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAAT
CCCGCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTACAATTCAGTGGCCGCTG
TTTACAACGTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTT

Klon 61, 12A8, M13R

ACTCTATGAGATAGACAGTAAAAATGAGAGTTGCAAGAAGGAGGCTCTGCAGTTCGCGAAGCACCTGATGGAGATTCCCGTTG
ATGCCACTCACGAGTCTGAGAGTTACATGGGTAGCCCTCTCTCACCGAGCAGGGACTCAGAGTTCGTGTGTGGAACGGAAG
TTTTCTGAACCTTACGCTCACTACTCTGTCTACCACCTCCTGTGGCTGTTTGACGGTCTCTGGCTCCTACTATGGCGAGAA
GAAAGATCTTTTCTCAGCTTCTTCGGTGTGAAACAAGAAGTTGACGACCTTCAAGTATTTGCACCTCCGGCCTATTGTGAG
GGTGTGTCATTTGAGGAGGCTCCAGACGATCACAGCTTCTTCGACCTGTTCCACGACTGAAGAAAACACACAAGATGACCAGC
AACTGCCAACAAATGGCTACATACAATAAAAAAGAGCATTTAATTACAATAATTTCTGNATCCATCTCTTTTCTTTCAGA
AAATGCTTGCACTTTCTATCTTACCTTCTTTTTGGCTTTTGAATTTGGTTCTGCACCTAATGAAGTCAATAAAGATGAGC
TTTTCG

Klon 63, 12B12, M13

GTAGGGCGTGGTGCAGGAGGGCGGTACTACTACATGGAAGAGAAGGTTTACCTCCAAGCAGTCTGGAAGGCAAGGTCAAGGA
GACAGTGCACAATGCCCTTTTGGGACCATCTTAAAGAGCAACTATCAGCAACTCCCCCTGACTTCAGCTGTGCTCTTGAACCTC
TGAAGAAAATTAAGAGATCTTGTCTATCACTGCTATTACCACGCCAGAACCCGCTGAGAATTGAGATTGAAGAAATTTGAC
ATGGACTTGTCAAGCAGGAGGAGCAGAACATGGGGCCCTGAAAGTCTCTATCTCTAAGTACCTCGGCGCAGCCACGCTAAT
CACTAGTGCAGCCGCTGAGGTCAGCATATGGGAGAGTCCCAACGCGTTGGATGCATAAGCTTGAGTATCTATAGTGTCA
CCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCAATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTG

Klon 63, 12B12, M13R

GGTACTTAGAGAGATAGAGGACTTTACAGGGCCCATGTTCTGCCTCCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAGAATCTTCAATC
TCAATCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTCAGAAGTTCAAGAGCACAGCT
GAAGTCAAGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCAAAAGGCATTGTGCACCTGTCTCCTTGACCTTGCCTTCCA
GACTGCTTGGAGGTAACCTTCTCTTCCATGTAGTAATCACCCCTCCGCACCACGCCCTACCTGCCGGGCGGCCGCTAAT
CCCGCGCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTACAATTCAGTGGCCGCT
TTTACAACGTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTA
ATAAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAAGTTTGGCGCAGCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTTG

Klon 65, 12F12, M13

GTACTTAGAGAGATAGAGGACTTTACAGGGCCCATGTTCTGCCTCCTGCTTGAGCAAGTCCATGTCCAGAATCTTCAATCT
CAATTTCTCAGGCGGTTCTGGCGTGGTAATAGCAGTGATAGCAAGATCTCTTTAATTTCTTTCAGAAGTTCAAGAGCACAGCTG
AAGTCAAGGGGAGTTGCTGATAGTTGCTCTTTAAGATGGTCCAAAAGGCATTGTGCACCTGTCTCCTTGACCTTGCCTTCCAG
ACTGCTTGAGGTAACCTTCTCTTCCATGTAGTAATCACCGCCCTCCGCACCACGCCCTACCTGCCGGGCGGCCGCTCGAAATC
CCGCGCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTACAATTCAGTGGCCGCTG

Klon 65, 12F12, M13R

GTAGGGCGTGGTGCAGGGCGGTGATTACTACATGGAAGAGAAGGTTTTACCTCCAAGCAGTCTGGAAGGCAAGGTCAAGGA
GACAGTGCACAATGCTTTGGGACCATCTTAAAGAGCAACTATCAGCAACTCCCCCTGACTTCAGCTGTGCTCTTGAACCTC
TGAAAAGAAATTAAGAGATCTTGCTATCACTGCTATTACCACGCCAGAACCGCCTGAGAATTGAGATTGAAGAAGTTCTGGAC
ATGGAATTGCTCAAGCAGGAGGCAGAACATGGGGCCCTGAAAGTCTCTATCTCTAAGTACCTCGGCCGCGACCACGCTAA
TCACTAGTGCAGGCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAAGCTTGAGTATTCTATAGTGC
ACCTAAATAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTG

Klon 75, 13G5, M13R

GTACTGCCATCAGAATGCGCTAGAGGGCGCTGCTTCACTGATAATCTTCGTGGCTGCTCTTGCTCACCATNTTGCNTGCAAAA
CTGGAATTGAATCTTCAAGTTTCTGAAATTATTCTTAAAGAGCCTTTTGGTACAGTGACCTCTCCACAGGAAAAAAGGCTTG
CCANAAGCANCGAAAGAATGTGTNGNCGGTTTTTTTTCAACAGAAACATAAAGAGAAAGACTACAAATCACAAATANTTACATT
CTNCCACATATAGAGAAGTTGACATACANCTACTGCCNGATACATTCTTTAAAAAAGCTGNTNAAAACACTTTGGATCAAACA
TACTCAATTCTTCTATATCAAAACCGCTTNCAATCCCTTTTTT

Klon 78, 14A8, M13

GTACGCGGGGACAGAAGGGCTGATCCTGAAACAGCACCATGAGCTCCTGGATGATCCTCAGCTTCACGCTCGCCGGCTTCAGC
CTCCTGAGTTCAGCAGTCCCTCTGCCCTCCGGAGACGCACTGATGGACAACGGCACAGAGAGCCTGAACGCCTCCACATTCCT
TTATTTTCGCTACGGGAGTAACCTGCTGAAGGAGAGACTGCAGATGAGGAATCCTTCTGCTGCTGTGCACTGCGTGGCCAGAC
TCAAGGACTATAAGCTGGTGTGGCAATCATAAAGGGCTGGCGAGTCAGCGTTGGCATGGAGGAGTGGCCACCATCGAGCCC
AGTGCAA

Klon 88, 14G6, M13F

GTACGCGGGGACAGAAGGGCTGATCCTGAAACAGCACCATGAGCTCCTGGATGATCCTCAGCTTCACGCTCGCCGGCTTCAGC
CTCCTGAGTTCAGCAGTCCCTCTGCCCTCCGGAGACGCACTGATGGACAACGGCACAGAGAGCCTGAACGCCTCCACATTCCT
TTATTTTCGCTACGGGAGTAACCTGCTGAAGGAGAGACTGCAGATGAGGAATCCTTCTGCTGCTGTGCACTGCGTGGCCAGAC
TCAAGGACTATAAGCTGGTGTGGCAATCATAAAGGGCTGGCGAGTCAGCGTTGGCATGGAGGAGTGGCCACCATCGAGCCC
AGTGCAAGTATGANTGTGGGCGTGGGTGTGGAGGATGAACATGTCGGACCTTGAGTTCCTTGACAGGCAGGAGAATGT
GAAGATGGGCATCTTACAGCCCCATGGAGGGTGTNCGTCTTCCNCCAAGCGGGNCCAG

Klon 88, 14G6, M13R

GTACTGCTTAGACTAGAGATGCGGGTGAACACTGCTGAGGGTGGATCTGATCATCTCTAATCTTCAGACTCGATCTCTTCT
GTCCTTCTTTGGATTTTTTTCAGCGCTTCTCCAGCTCCTCCATCACGGGCAGACGGCCCTCGTATTTGTTGGTTTTCGATGGA
CCGGAGTTTTCTCTGATACTCTTCTGGAAGTCCGNTCTGTTCCGGCGCCATCACAATCACCTGCAGATACTGTGGTGAAGGTG
GAGCATAGACGNGCTGTTTCATGATGTAGGTCTGCAGCGGAGATGCTGGCCGCTGGTGGGAGACGGACACCTCCATGGGGCT
GTTAGATGCCCATCTTACATTTCTCTGCCCTGTCCAGAGACTCCAGGGTCCGAACATGTTTCATCTTCAACAACGCCCC
A

Klon 94, 15B6, M13

GTACTTCTCTACGGATTCAATGTTCCCGCATGTTTGAGTGCAGCCGCTACCCCTGCGTGAAGGAGTTGAATGTTACGTGT
CGCGTCCCACAGAGAAGACAGTTTTCTGGTGTTCATGTTTCGAGTTAGCGGAATCTGCGTGGTGTAAATTTGGCTGAGCTC
AACCACCTTGGCTGGCGCAAGATTAAGACGGCCATCCGTGGCTCCAAGCTCGTAGAAAAGTCTATTTGTGAGATCCGAAAAA
GGATGTCTACAGTGTCTCCTCGTGCAGCAACTTGGCGCCGACCCAGTCTAGCGAATCAGCTTATGTCTGACAGCGAATAGGGG
AGGGGCTTAAACGAGGTTGGGAGTGGCTGATGAGGCGACGGCCACGCCCTGTGCTGCAGACTTGACATGTGATATTTATGCAT
AAGTTCGATCAGGTGAGAGAGGGGTAGGGTGA AAAA AAAAAATCTAAAGGACCGAAGATCAGATTTGACATTTCTAAATGA
CTTTTTTCAGACTTTAATGATGGTTGGAGTGGACCGTAGCAGGGGCTCATGTTA

Klon 94, 15B6, M13R

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGNNGGGTGTAGNNGGGCTCANAGCTATCAGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTAATATGTGTGTAATATGTTTTAGTAACATGAGCCCTGCTACGTTCCACTCCAACCATCATTAAGTCTGAAAAAGTTCAT
TTAGAATGTCAAATCTGATCTTCGTCCTTTANATTTTTTGTGTTTACCCTACCCCTCTCTCACCTGATCGAACTATGCAT
AAATATCACATGTCAAGTCTGCAGCACAGGGCGTGGCCGTCGCTCATCAGCCACTCCAACCTCGTCTAAGCCCCCTCCCTA
TTCCGTGTGACACATAAGCTGATTCGCTAGACTGGTGTGCGGCCCAAGTTGGGCACGGAGGACAAGTGAAGACAC

Klon 96, 15D6, M13R

GTACTCTATGAGANAGACNGTAAAAATGAGAGTTGCAAGAAGGAGACTCTGCAGTTNCGNAAGCACCCNGAAGGAGATTCCCGT
NGATGCCACTCACGAGNCTGAGAGATACATGGGNAGCCCTCTCTCACCGAGCAGGGACTCAACAGTNCGAGNNGGAAACGGA
AAGACCCCTGAACTTCACGCTCACTACTCT

Klon 102, 9F5, M13

GGTACGCGGGGTTGGGGCGACCAGGAGTAAAAACAACCTCCAAGCGGAACGGGCACAGCCCTAAAAACCAAGAAACATC
TCTAAGCCTCAGAACAACCTGACCAAAGACGATCCGGCTATAAGCCGATCAACGAACCAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCA
ATCCTCTCTAAGAGTCCATATCGACGAGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCGAATAGG
AGGGTTCGTTTTGTTCAACGATTAATAGTCTACGTGATCTGAGTTTACAGCCGAGTAATCCAGGTCAAGTTTCTATCTGTA
GCTATTTTTTTCCTAGTACCTGCCCGGGCGCCGCTCGAAATCACTAGTGCAGCCGCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTC
CCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGCCGTAATCATGGTCATAGCTTGTTCCTG
TGGAAATTTGTTATCCGCTTCAAAATTTACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAAAGTGAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
TGACNAACTC

Klon 102, 9F5, M13R

GTACTAGGAAAAATAGCTTTACAGATAGAACTGACCTGGATTACTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAGGACTATTAATCG
TTGAACAAACGAACCCCTAATAGCGGCTGCACCATTAGGATGTCTGATCCAACATCGAGGTCGTAAACCCCTCGTTCGATAT
GGACTCTTAGAGAGGATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTAACCTGGTTGTTGATCGGCTTATAGGCCGGATCGTCTTTGGTCAG
GTGTTCTGAGGCTTAGAGATGTTTTCTTGGTTTTAGGGCTGTGCCCGTTCCGCTTGGAGGTTGTTTTTACTCCGTGGTTCG

Sequenzen der medialen Kandidaten_{Plasmid}

Klon 215, 3E11, M13

GTACAAATGAGATCATACAAATTAGCCACTAAATCAAGTTGCGAATTAGCATGCTCAGTTTAGTGGCACAAAAATGTAAAAGT
ATGATTTTTAAAAATGTCACCCCTAAACCCAACCATCATCATGGGTTGAGCAAATCGTATATAAATTGTTCGAATGAGATCTAT
GAATTCATACGAATTAGCCACTAAATCAAAAAGTTTCGAATTGCTGTGAGATTGTTGGAATATCCGCAAACGTCGACAGCCAT
CCTCTGTGACCTTTAGTTTACATTAATAAAAAAAAAAAAAAGTTTGTGTGTCATTAAGCTGTTCCCTTTACTATTATTGCTGCT
TTTTCCGCTCTAACGTTACTGAAACGTTCTCCTTTCCGGGAGAATTTAAAGAAAACGTCAGCACTTGACTTCGCCTANGCTTG
GGAGATGCTCTCTAAACTAGTGTCTATTTAACTTTTAGTTAGGGTTTTCTTTTTTGGCTGGAGCAAAAAATGGGNACCTT
TTTTTAATTTTAAATTTATAAACTTAAACCAA

Klon 215, 3E11, M13R

ACTGAAGCTACGAATATACNGACTACGAANACCTAGAATTNGACTCTTATATAGTGCCAACCCAAGACCTCACACCAGGGGGC
TTTCGGCTTCTTGAACAGACCATCGAATAGTAGTTCCCAAAGAATCACCAATTCGAATTTTAGTTTCAGCTGAAGACGTACT
CGAGACCTTGTAGNCGTAGCACTATCGTCTAATATTTATGGAGTTAAATGCAAAAACA

Klon 218, 3G1, M13

ACCGAGCCGTAAACATTGTCGGTGCAGGCTACAGGCACTGAGACAAACTGAATAAGAATGGCTTTGAGAAGAATTTATATTCA
ATAGTGCAGAAATACACTGCCCCTGAGGTGGCCAAATTCCTGAAAGAAAATAGTTGTCATTGAGGGTAGACTGACCAGCACAG
TGCACCTCAGGTCTAAATTAATTAATGTTGTTTTGTTGAAGTTTAACTGGGTTGGGAATTTCTATACAGTATGTGCATGAT
GCTGAATAGTAACGTGAATGATGAATGAAAGAAAAGCAAAGACATTTCTAACAGGGTTTTCTGCATTGAGAATTAGGCAGCC
AAGTCCCTCAAATTTTGTATCACTTTCCGCTCTTGACAAAAGACAGGAAGACTCTAAGCGGTGCCAAGAAGTGGTCATGTGC
AATTACATTTTCATGTTAGCCTTTTTTAAATAAGATCAAGTTTTTACCTGATTACAAGAATAATACAAAATTTGTTTTCAAGTAG
CAAAAATTCATGACCGGGATACCACCTCCACCTCATTTTTGAGCTAGGAAAAACCCCTGGCTAAAGGCATATTTCTAAA

Klon 218, 3G1, M13R

ACTAATTTAGCGAACTCAGATACTGTTGGTGTGCACGTTTTTTACCAAGTTCCTCAACACTATTATAATGACACAGATCA
ATTTGCCTGTTTCATGCCAGAGTCCCGNGGAAAAAGTGATTTGACGGGTGGTAATTNAGNGTGCAACTTTTTAAAAATTNATTTA
TGATTTGATTATGGGTAACAGACCATGCTGGTCAGGTAGTTGAAACGGTAGGCTACAACATAAATTTNGTTCTCACTTA
ATTATTTTTAAATAATTNATTTACCGTTCGCTACAACGACAAAGCCATCATCC

Klon 231, 4+G2, M13R

AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGTACCTCAAGAGCCTCAAGTGTCTCCAGAGACACCTGACTAAATGCAATCTCCGGCACCCACCAG
GAAATGAAATCTATCGCAAAGGAACGATATCCTTTTTCGAAATAGATGGTCGAAAAACAAGATGTATTCCAAATTTTGTGT
TTATTGGCCAAATGCTTCTGGAACCAAGACTCTCTACTACGACACGGATCCTTTCTCTTCTATGTAATGACAGAGTATGA
CTCTAAGGGTTTTCCACATAGTCGGCTACTTCTCCAAGGAAAAGGAATCAACAGAGGACTATTAACGTGGCCTGCATTTAACT
TTACCACCTTACCAGAGAAGAGGCTATGGAAAACTTCTAATTGAGTTTAAAGTTATGAGCTCTCAAAGTGAAGGAAAAACTG
GTACCTGCCCGGGCGGCGCTCGAAATCCCGCGGCCATGGCGGCGGGAGCATGCCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGG
GAGTCGTATTACAATTCCTGGGCCG

Klon 231, 4+G2, M13

ACGCGGGGATCTCGTTTTGAAAGAGCGACAAAAGCGGATGTTCCGGTGGAAATGGAGCCGTC AACGAGCGGTTCTCCCGTG
TCACCGAATCCTCTAAACATCCGCTATATCCGCATCTGCCGTCAACCTGAATGTAACGTTGCCGGACAATCCGTTTGAAGAA
TCGTTGATGAGCAGATATCTTTGAGTAAGATCGCAGCGGAGGCCCTGAGAAGTGCAATTTTATTTATCTTTACTTGAACCGG
ACATCCTAAATATGAAGCAGACAGCGACTTCATGCTTTAAAGTATTTTTTTTAAATCGATCTCGTTTCGCTATTTATTAGATAGC
TTTTAATCGCTAATCAAACGCAGTAACGTCATCGAGCGTCTGGATATTTTTCCAACTTTTAAACCTTTTTGTTTTTAACTGC

Klon 235, 4A8, M13R

ACGCGGGGACGACGGGTGAGGCGCTATGGAAGGCAGGGAGGCTTCGTTGATCTGGTGAATGTTCTCATTTTGTCTGTTTA
ATTTTTTGATAACTAATAGGCATTTTTTATTTACAAACCTTTTCAGTCTTAAAACTCTAGACGTTTTCCGTTGGTTATACAAA
GGTTTTCTTTGAAATAGCAAGCGTGACGAAGATAAAAACAAGCTTACTTTTCACTTAAATAGGTAGAAGTGCCTTTATGAGA
AAAAATTCATTTTTTGTATCTTAAAAAGACAAAAACGTTTATTTAGTGAACATTTAACGTTTATCTTCAGGTTAATGT
TTAACTAGCTTACGTTACCGAAAGCCTAAACAAAGCTCGACTGTAATGGCTAAGCGAACGTTATCCTTTTCACTTAACTCA
TTTTAAGCTTATTTTTGTTTACAAAGGTTTTCTGAAATACGTGATTTTATACACCTATTTTTGACGCTGTTTAGTTTGA
TTCTCGACGCTAGAAAGAAATTTACAAAATGGCGGTTCGCGACGACGGATTA

Klon 235, 4A8, M13

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATCTACTGTAACTTGTAGTCGTTTACCCTCCATCTAATTTAAACTGGTTGCTTTT
AAGTTCATCCTTGCTAAATGGGTCACTTACTAATCTTAATATCAAGATAGAAAAAAAAGACTTGCTGTTTGACCTCACTAC
CATAAAAGGCTGCTATTACTCGTTATGGTCTGAATATAAAAAAAGAAACAAAGTTTTTCCCTTGAAAAATTTACAAGTTAAAAATG
GTTGTANATACCTGGGTCCTTACTGTTACCATAAAAGGCTGTTACTAATCGGTATTGTAAAAAAAATAATAAAA

Klon 240, 4E8, M13

ACAAGGAGGATGAGGTTTACCCCAAACCACCTCATAACAATGTTGCCACGTCCCTTCCGTCTTACGACGAGGCTGAGAGGAGC
AAAGCAGAGGCCACTGTTCTCTAGTCACTGACAGGGATGAGGACTTCATTGCCAGGGACAGCTTTGAAGACACGGATCAGCT
GCGGGTTGAAATGATGGGATTTTCATGCTGACATTTTTCATGGCGTTCCTTTTAACTGGATTGGCTTCTTCTGTCTTCT
GTCTGACCACGTCGTCGCGGACGTTATGGGGCCATCTCTGGGTTCCGACTTTCCCTGGTCAAATGGGTCTGATTGTGAGG
TTTTCCACCTACTTCCCTGGATATTTTGTATGGCCAGTACCTCGGCCGCGACACGCTAATCACTAGTGCAGGCGGCTGCAGGT
CGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCAT
GG

Klon 240, E48, M13R

ACTGGCCATCAAAATATCCAGGGAAAGTAGGTGGAAAACCTCACAAATCAGGACCCATTTGACCAGGGAAAGTCCGAACCCAGAG
ATGGCCCCATAACGTCGGGCAGCAGCGTGGTCAGACAGAAGGACAGGAAGAAGCCAATCCAGTTAAAGAGGAACGCCATGAA
AAATGTCAGCATGAAAATCCCATCATTTCCAACCCGAGCTGATCCGTGTCTTCAAAGCTGTCCCTGGCAATGAAGTCCCTCAT
CCCTGTCACTGACTAGAGGAACAGTGGCCTCTGCTTTGCTCCTCTCAGCCTCGTCTAGGACGGAAGGGACGTGGCAACATTG
TATGAGGGTGGTTTGGGGTAAACCTCATCCTCCTGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGAAATCCCGCGCCATGGCGGCCGGG
AGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTGAATCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCTGGCGGTACCCAACCTTAATCCCTTG

Klon 241, 4E9, M13

GGTACTCTGNCACTTACAAAGGGGATTGAAAACATAAAGAATGAGATAGAAGACACCCTGAACCTCTGANCGACCCTGTT
TATGGCCACGGCAGCCAGAGTNTAATTAACCTGCTGGTACTGATCATGCTGTGTCTAACGTGTGGGACGGCGATAGANAATG
TTCTGGAATGAAGCTTACGGTATTTATCAGCAGGCTTCTGTTGGTTTCTCACACTAATGGAGTCACTGCGCTATTGTAAGG
TTGGCGCATTCTCAAATCTCAAAGTTACCTATTTGGATCCTTGGCAGCGAAACTCACCTCTCAGTATTTCTTACTAAGGAA
ATGGCNTTGGTTGCTCCTGAGTCTNCGTTAGAACAGGCCATAAGAGTTTTTTCAGACATTTTGA

Klon 244, 4F10, M13

GTACATTTTATTATTTTTTTTTTTTACAATACCGATTAGTAACAGNCTTTTATGGTAACAGTAAGGACCCAGGGTATCTACAAC
CATTTTAACTTGCAAATTTTCAAGGAAAAACTTTGNTTCTTTTTTTTATATTAGACCATANCGAGTAATAGCAGCCTTTTATG
GTAGTGAGGTCAAACAGCAAGCCTTTTTTTTTCTATCTTGATATTAAGATTAGTAAGTTGACCCATTTAGCAAGGATGAACCTT
AAAAGCAACCANTTTAAATTAGATGGAGGGTAAACGACTACAAGTTACNGNAGATTTACAAAAAATAAAACTTCAATTTTT
TGCCATTTAGGGNGACTANACNAACCAACNTAACCGACNTTTTTAGTTACCTGCCCGGGCGGGCCGCTC

Klon 245, 4G10, M13

ACATAGTGCATATTTGATGGCTAGAACTCACGTGCGAAGGTTCTT

Klon 245, 4G10, M13R

ACATAGTGCATATTTGATGGCTAGAACTCACGTGTGAAGTTTCTTCTTTTTATTTTTGTCTTTTCATTTCTTTATCAAGTG
TATATCATCAAGTCCATTTACACACCATTTTTTTTTGTTTTGTTGTTGATGAAANTTCTTAAGGTTTTAGTCATCTGTGTGTC
CATGCTCTCTGTGTTTTACTCTATATAAGCCATGCTTCATATTGAGACGTAGCGCAGCAGGAGATGAATTAGAGATGGTGAAG
CGCTGGAGATCACATGACAGATTGCTTATCTTAGCCTGCCATTTTGTAAATCGCCTTTAGACAGTGTTCAGTGACGATTATTC
ACCTTAAAGTGGTCATCCATGTATGCGGCGTGTCACTTTACGTGTTATTACCTCCTCGAGTCCCTCTTATGTGTAGACAT
TTACCATACGAGCATGGGCATGTGCGACCTGCCCGGGCGCCGCTAACTACTAGTGCGGCCGCTGCAGGT

Klon 246, 5A6, M13

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGNAANCTACTGTAACCTTGTAGTCGTTTTACCCTCCATCTAATTTAACTGGTTGC
TTTTAAGTTCATCCTTGCTAAATGGGTCAACTTACTAATCTTAATATCAAGATAGAAAAAAGACTTGCTGTTTGACCTCA
CTACCATAAAAGGTGCTATTACTCGTTATGGTCTGAATATAAAAAAAGAAACAAAGCTTTTTCTTGAAAAATTTACA

Klon 246, 5A6, M13R

ACGCGGGGACGACGGGGTGAAGGCGCTATGGAAGGCAGGGAGGCTTCGTTGATCTGGTGAATGTTCTCATTTTTGTTCTGTTTA
ATTTTTTGATAACTAATAGGCATTTTTTATTTACAAACCTTTTCAGTCTTAAACTCTAGACGTTTTCCGTTGGTTATACAAA
GGTTTTCTTTTGAATAGCAAGCGTGACGAAGATAAAATACAAGCTTACTTTTCACTTAAATAGGTAGAAGTGCCTTTATGAGA
AAAAATTCATTTTTTTGTTTATCTTAAAAAGACAAAAACGTCTTATTTAGTGAACATTTAACGTTTATCTTCAGGTTAATGT
TTAACTAGCTTACGTTACCGAAAGCCTAAACAAGCTCGACTGTAAT

Klon 250, 5D10, M13

ACCAGTTTTTCCCTCCACTTTAGAGAGCTCATAACTAAACTCAATTAGAAGTTTTCCATAGCCTCTTCTCTGGTAAGGTGGTA
AAGTTAAATGCAGGCCACGTTATAGTCCCTCTGTTGATTCTTTTTCTTTGGAGAAGTAGCCGACTATGTGGAACCCCTTAGAG
TCATACTCTGTCAATACATAGAAGAGGAAAGGATCCGTGTCTGATGAGAGTCTTGTGGTCCAGGAACATTTGGCCATAA
ACACAAATTTGGGAAATACATCTTGTTTTTGGCACCATCTATTTGAAAAAGGATATCGTTCTTTGCGATAGATTTCAATTC
CTGGTGGGTGCCGAGATTGCATTTAGTCAAGTGTCTCTGGAGACACTTGAAGCTCTTGAAGTACCTCGGCCGCGACCACGCT
AATCACTAGTGCCCGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCACCCCGT

Klon 250, 5D10, M13R

ACCTCAAGAGCCTCAAGTGTCTCCAGAGACACCTGACTAAATGCAATCTCCGGCACCCACCAGGAAATGAAATCTATCGCAAA
GGAACGATATCCTTTTTGAAATAGATGGTCGCAAAAAAAGATGTATTTCCAAAAATTTGTGTTTATTTGGCCAAATGCTTCCT
GGACCAAGACTCTACTACTACGACACGGATCCTTTCTCTCTATGTAATGACAGAGTATGACTCTAAGGGTTTTCCACATAG
TCGGCTACTTCTCCAAGGAAAAGGAATCAACAGAGGACTATAACGTGGCCTGCATTTTAACTTTACCACCTTACCAGAGAAGA
GGCTATGAAAACCTCTAATTTAGTTTATGATCTCTAAAGTGAAGGAAAACTGGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTC
GAAATCCCGCGCCATGGCGGGGAGCATGCAACGTCGGGCCAATTC

Klon 253, 5E6, M13

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGNTTCTTTATTTATTCAGGGTATTAGGCAACCAGCACAAATTTTAAATGCAAATGTTTT
TTATTTCAAATTTCAACCTTAAATATAAGTTTTATTTCAAACGTGTATAATATAACAGTCAAAAAATAAACTTCAGCCACACA
TACATGTCCATTTCAATAGGTATAATTTATTTGTTATGCCACGCATATAGAACTAACACTTCTCAAAGCAACACAACGCACA
TACTGACGCTGCACGTCGACGCATTAATGGCTTGATCTCTGCTAAAATATTGAGTGGAGCACCAGAATCACTACAAATCA
CAAGAAACTAAACAAGAT

Klon 253, 5E6, M13R

ACAATCAGCTGCTGAGGATTGGAGGAGCTCGGAGACAAGGCTCGCTTCGCTGGCAAGAACTTCAGGAAACCCATCTGAAGC
ACTGACCCGTCCTGAGTCTCGGCGTGTTCATCCTGCTTTACTGTCCCACACATAAACGCCACGCAAAGCCACATCCTGTAGAA
TGGAGATTAGATGGAAAAGCAGTGAAACGAAAGGTCCAGATCAATAGCGTATGGCGCAGAACACTGCCAGATCTCCATCTGTG
CTTTGGTATCCAAATAGCATCAGTCCATTAATCGTGTCTCTGTGTTGTGTGAAGAGATCTTTGTTTAGTTTCTTGTGATTTGT
AGTGATCTGGTGCCTCAATATTTAGCAAGAGATCAAGCCATTTAATGTGCTGCGACGTGCAGCGTCAAGATGTGCCG
TTGTGTTGCTTTTGAGAAGTGGTTAAGTTCTATATGCGTGGCATAACAAATAAATTATACCTATTG

Klon 265, 6F12, M13

ACAGACGCAAGATCATGCTGGCGCTTCCAGTGTCCAGGCAGATCGATGCTACCTTTATCCGTTTCTGATCATCCATCCATCCA
CCCACATGCACATTAATAACACGCCACCACCATCACCTCATGGACACCACATGCCCTATTATCTCTTTTACTTTTTTAA
ATAACAAAATCGACGAAACACACACTCCAGTGTTCACATGCTGGCACCTTTTACTCGCACGGAGACTATATAATAATATACCG
ATGCTCTGACTTATGCTATAGCGCGAATGCTCGTTAATTTATTAGGACCTGATGAGTTTGACCTGAAAGAAAGTGACGCCTGA
TGCTCAGAAAATATACACTTCTGACCCATACTACATTTTGGTAAGGAAATTTTACAACATAGACATCACTTCTTCTCTCCA
GCCATGTAGCTCATTTAAGACCGTATTTGCTATATGAAGTGAATTCAGTGAATAAAGAGATTTCTGGACTCAATTTGCAT
ATCGGTTTGTCTTTTTTGGNAGTAGAAGTATGGTCAAACCTCTGCTTGGAAATGAGATCACTTTTTCATCAACCGTGAATACATA
GAAGCCTCACAAAGGAGAGATTATTCCTTTTAAATGAAGGGATGGCC

Klon 265, 6F12, M13R

ACATTCAAATCTGAAACAGTCAACTTGTAAAACAAAGTGAAAATTACAGCAAATTTAAAGCTATTCCATGCAGTTGTTCTGTCT
ACTCTTTTAAATGAGCGATGTTTTTCAATCATGAATCAGCAGTGAAGCTCTCACACCCTCCGATGTGCCAAGTGGAAAGCG
TCCAACACACAAGCACCACACCGTGGCTACATCCATTCACCTCTTATAGGGAGGGGAGAAAAAACTACTCAAGTCAAACATT
AATATGAGGTGGTGTGAATAGTTTGAAGTGCATAAGATACCTTTCTTTTAAAAAAAACACAACAACGATCACCTGATAAGACCTT
GCTCTACTCCACACTGTAAAACGCCATTAGTTCGATTTTACTTTAAACAAAATTGAGTAAACCGCTTGTCTTGAAGGAATTAAG
TTGACTTTACTTAATAAAAAGCAGGTAGACCTGTTTCTTAAACTGTGTAATGAACATATGTGCATAATTATACAAATTAAGT
CAACTTA

Klon 267, 7A10, M13

TCGAGCGGCCGCCGGGCGAGGTACGCGAGGCCCTACCTGGAGTTCATGGTTTCAATGGCGAGGATTGCAAGGGAAGACAGAAAT
TTGACCAAGATGAAGAGCGTGTGTTGGAGGACATGTCTCAAGTCCCTGGAGCTGGAGACAGACATCGCTAACGCTACCTCACC
AGCAGAGAAGCAGCAATGACATCACTGTGCTCTACAACAAGATGACGCTGAGGGAAAGCGCAGAAAACGTTCAACCTCAATGGCT
TTAACTGGACGCGCTACATCCAGGTATCATGTGAGCAGTTCATTTTCAAGTGAATCAGATGAGCCCATTTGTTATTTACTGC
TCCCCTTACCTTGGAGAAGCTCAGCCGAGGTCTGTCCAAACACAGCCACAGGACTCTGCAGAAC

Klon 267, 7A10, M13R

ACTGCTCCACCATGCATTTAGACTGATCCTCGAAGCGTTCAGCAGAGTAGTTGCTCCACCAGTTATACATGTTTCCATCCTTG
TCAAATTAACGGCCGTGATCATCAAATCCATGAGTGATTTTATGTCCTATAACCATCCCGATTTCTCCAAAGTTTAGAGCTTG
CAGCTGTTTCTCAGTGAAGAAGCGAGGTTGAAGGATGCCAGCAGGAAACACAATCTGATTTCTGTTGTGAGTAAAAGCGCT
TGACCACTGCCGACCAATAATCCACATGTGAGGATCCACGGGCTCCCGCAGCTTTTTATGACCTTTCTGGGCCGATGTGCC
AGGTTTTCCAGAATGTTCTCGAAGTAGTTTCTCCTCAGTAAATTAAGGTGAGCATATTCCTGGTCCAGCTTCTTATTTTCTC
TTCAAGGATGTGGTCCGGATAACCAATCTGTTCTGATATGGCCATGGCTTCTCTCTGGCTTCACTTTGGACTG

Klon 271, 7C9, M13

ACTGCTCAGCAGATGCCCTTCCAGCTCAAACATCTTAACTCAATAGAATGTGTGTTGGAGTGTGAGGAGCAACCGAACGCA
GGCAGCTCTTGGAGTCAAGTCAAACATTTTATGTCAGAAATGCTGATAACAGTCTGAGGGTAACCGAGCAGCCACACAAATCGA
ACACTCAAACAGCCAACAGCACCAGGTAGACAAAAAATATGGCGGCTTTCATGAAACGTTCTGAAAAGTTTAAATNAAGCGTTATG
GAGGATTCATGAAGAAGGCAGTGAATTTCTATGGGCTTGGAGTCAAGGGATGTTTGATCAGGGGCAGAGCAATCCTGACTAA
TATGGATGTTGAAATGCTGGCCAATCAAGTTGAGGCTGACGGGGGAGGGGAAGGAAGCGGCTCTGAACACGTTCAAGGGGAG
GTGAAGAGGGGAAGTGCAAAACG

Klon 271, 7C9, M13R

ACTGTTAAAATGGTCTTACTCACACAATAACATCACAATAAAGACATAATGAACACTTTTATTAATACATTACATTAGCGTGT
TTAAGCATATTTTCTGTTTCTAGTTTTTTCAGGTGTTTTTTTATCTTAAAGAGGAAGTGAACCTGGACATCGCGGACATCATCTTAA
TATCCCATAAATCCACCATACCTCTTTTCTACCTCTGATGAATTTTATCCTCGTCTTGTCTTTGAGACCGCTTTAAGAAGCC
TCCGTAAAGTTTACTGCTCTGACCAATCTGGTCTGCTACTCTCCTCATGAAGCCCCATAACGTTTTTTCAGTTCCCTAA
CCCCACTCTCCAAGGCATAAAGCCCTCCCTTCTCATAAAAACCCCATAAACGTTTTTGCAGTTCCCTCTTCACTCCCTTTGAA
CGTGTGAGGCGGCTTCTCTTCCCGTCAAGCTCAACTTGATTGGCCAGCATTTCAACATCATGATTAAGTCAAGGATTG

Klon 273, 7F5, M13

TCGAGCGGCCGCCGGGCGAGGTACGCGGACTCTTTTTAGTGTGATGAGTGTATTAGTTTACCATTCTGATGGTGCAGTTCA
GAACAGGGAAGCGAAAAGTGGCAAACATCCAGGTAGAATCAGTGTACAAATGGGAGGACTGTAAACATCTCATTTAAGTTTT
ATTTGAACGTTTGTCTCTTTTATCTACAAGTAACTTCAATGAAATTTATCGTGTTTTATTTGTGTGATTTCTTTTGTACTAT
TGCATAGAACAGGGCAGCTCTGTGAAATAATGGCACTTCAATGTGACCTCCAGGGTCTGATTGAGTATGCAAGAAATGT
TTGGAAAAGATGAGCATGTGATGAAATGGTTATGGAAAAGGACTGATGGAATGACAGGGTTATTGAATCTTGGCCTCACTTG
GACGCCAACAGCTCTCAGGAGGACATAAATCAATGGATGGCAAGGGCAATACAGGAAAGGGGAAGTATTTAGATTAGGCA
AATAGAAAAGCAAGCATGTTGAATGGATTGTTGGTGCATTTTAAATTCATGGACTCTGGTATGTC

Klon 273, 7F5, M13R

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGTTTCTCCANAGGCTCAGTTTCTTCCACACAGGGACAATCAAGGAACATCAAAC
TGTTGAAATATATAATCAACAATATAACACTTAAAACGATGGGCTCAGAAATAAGACATAACAGAGTCCATGAATTAATAAAT
TGCACCAACAATCCATTCACATGCTTGNCTTTCTATTTGCCTAATCTAAAATACTTCCCTTCTCTGATTTGCCCTTGCCATC
CATTGATTTATGTCTCTCTGTA

Klon 281, 8G11, M13

ACCTGGATGGGAGACCACATGGGAAAACTAGGTTGCTGTGCGGAAGTGGTGTAGTGAGGCCAGCAGGAGGCGCTCAACCTGTG
GTCTGTGTGTCAGTCCTAATGCCCCTGTAAAAGTGAAGCAGACACTATAATGTCAGTGGGCGCCATCTTTCGGATGAGACGATAA
ATTGACATCCTGACCCTCTGTGGTTATTAAAGATCCCATGCCACTTCTTGTAAGAGTAGGGGTGTAACCCAGTGTCTTGGC
CAAAGTCCCTCAATCAGCCCTTACGATCATGGCCTCCAAACCATCCCATCCACTGAATTGCCTCTATCACTGTCTCTCCAG
CCACCAATAGCTGGTGTGGTGTAGCGCACTGGTGTCTGTTGTCTGTAGCTGCTGTTGCATCATCCAAGTGGATGCTGCACAC
TGGTGGTGGTGGGAAGAGACCCCTCATGATTGTGAAGCACTTTGGGTGGTTAACCATACACAAAAATACGCT

Klon 281, 8G11, M13R

ACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGACNGCTCATATTTCANAAAGACTGGTTTGCTTCCATTATTTTACAAAAGTGCA
ATGTTTTGTTGTTATTAGAGCACACAAATAAACAGTCTTTACTGATTGAAATCTAATACTATTTTCTGTAATG

Klon 283, 9C11, M13

ACCGCTTATGCAAGGTGTTTCTTTTGTGTCATCTATGAAGCTGAGAGAAAATTTGACGTTATTTTCTTTTCTGGCTGTCTGCA
TCAGTCTCACACTATTTTCCCTTTTCCAAAAGTCACCATCCTGGCATTTTTCTTTTATTAATTCANCAAATGATTGTA
AAAATATATATTTGTTGGACTTTTATTCAAATAGAGAAAAAAGAGTAAGGAATGAAAAGCAGAACTGAACAAATTA
ATTTAGACACAAGTAAGGAACAGAGCAAGAGAAATCAATGGATGGGACAGGAAAAATGCTGGAATGAATGGAAGACNAAATA
GTAATAGACTGAACGAAGGAAATGAAAGGAGGAAAAAGA

Protokolle

Protokoll zur in situ Hybridisierung an whole mount olfaktorischen Bulbi und Telencephalon

(modifiziert durch A. Celik basierend auf einem Protokoll von F. Weth, beide 2001)

- Präparation der olfaktorischen Bulbi mit anhängendem Telencephalon
- Proteinase K (15 µg/ml) in PBS, 10', 37°C
- PBS waschen
- 15% gesättigte Pikrinsäure, 3,4% PFA und 0,085% Glutaraldehyd, 5'
- PBS waschen
- PBSTx (PBS mit 0,15% Triton X-100), 10'
- 10 % (5'), 25 % (5'), 3 x 50 % (10'), 25 % (5'), 10 % (5') Methanol in PBS
- PBSTw (PBS mit 0,05% Tween-20), abspülen und waschen, 5'
- Proteinase K (10 µg/ml) in PBSTw, 15', 37°C
- PBSTw abspülen
- 4 % PFA, 0,1 % Glutaraldehyd in PBS, 5', 4 °C
- PBSTw, abspülen und waschen, 5'
- Prähybridisierungslösung (Prähyb; 50% Formamid, 5 x SSC, 0,2 % Tween 20, 0,5 % Chaps, 100 µg/ml Torula RNA, 100 µg/ml Heparin) in 2 ml Reaktionsgefäße, 2 h, 60 °C
- frische Prähyb ad 0,5 ng/µl Sonde, über Nacht, 60 °C
- Prähyb-Lösung, 2 x spülen, 2 x waschen, 30', 60 °C
- 1:1 Prähyb/MaBSTw-Lösung (MaBS mit 0,05 % Tween-20), 20', 60°C
- MaBSTw, 3 x spülen, 2 x waschen, 30'
- 2 % Blockierungsreagenz, 2 h, 4°C
- 2 % Blockierungsreagenz mit 20 % hitze-inaktiviertes (30 Minuten, 56°C) Schafserum, 2 h, 4°C
- 1:2000 Verdünnung des Anti-DIG-Fab/AP in 2 % Blockierungsreagenz mit 20 % Schafserum, über Nacht, 4°C
- MaBSTw, 3 x spülen, 4 x waschen, 1 h
- RBTw-Puffer (Reaktionspuffer mit 0,05 % Tween-20), 2 x, 10'
- NBT/BCIP (3,5 µl/ 4,5 µl in 1 ml RBTw-Puffer, Länge nach Bedarf
- PBSTw, spülen
- 4 % PFA, über Nacht, 4°C
- PBS, lagern, 4°C

Tabellen

Vergleich der Dil-Färbungen in den rechten und linken olfaktorischen Bulbi nach der Behandlung mit Zinksulfat von Tag 3 bis Tag 28 und Kontrolle

		Quotient aus (Pixelintegral linke Seite/ Pixelintegral rechte Seite) x 100 [%]					
		offene Blende			halb-geschlossene Blende		
	Präparat	Position 1	Mittelwert* Position 2	Mittelwert* Position 2	Position 1	Mittelwert* Position 2	Mittelwert*
Kontrolle	K3	99,9	98,1 (+/- 7,1)				
	K4	104,1					
	K2	90,2					
Tag 3	3.1	30,1	25,8 (+/- 9)	35,9	28,7 (+/- 8,2)	23,5	18,3 (+/- 7,5)
	3.2	32,4		31,4		n.a.	19,9
	3.3	30,4		32,7		23,9	18,9
	3.4	10,4		14,9		7,8	5,1
Tag 7	7.1	46,0	50 (+/- 8,9)				
	7.2	53,2					
	7.3	38,3					
	7.4	62,4					
Tag 14	14.1	79,0	82,3 (+/- 4,2)	n.a.	89,7 (+/- 3,6)	81,1	76,9 (+/- 5,3)
	14.2	89,4		86,1		82,1	n.a.
	14.3	81,4		93,3		68,7	85,9
	14.4	79,3		n.a.		75,7	79,6
Tag 28	28.1	96,4	96,5 (+/- 6,4)				82,4 (+/- 2,6)
	28.2	88,7					
	28.3	104,4					

*: in Klammern der Standardfehler

n.a.: nicht analysiert

Anzahl der Schnitte in der lateralen und medialen Gewebefraktion in Abhängigkeit zur Schnittposition

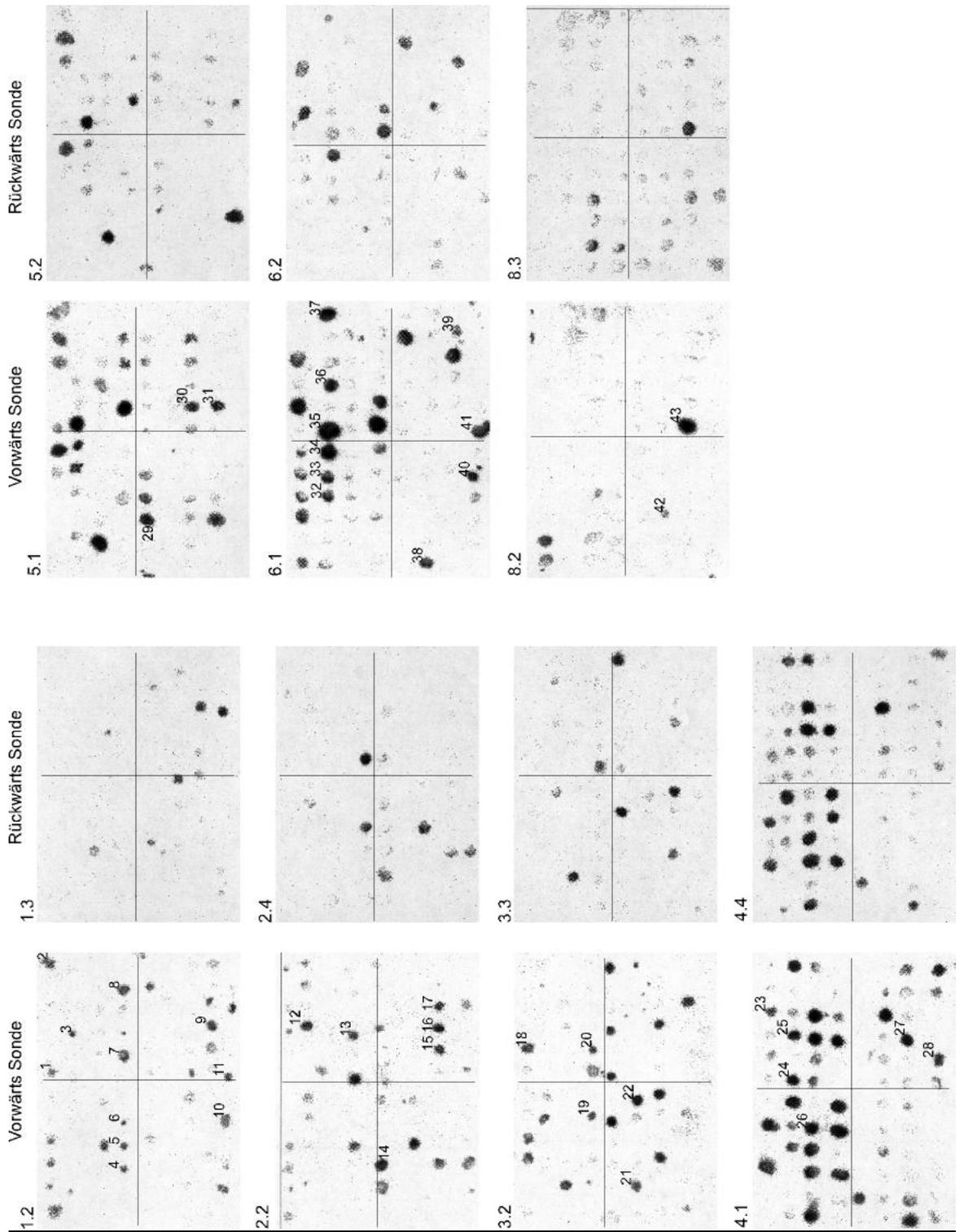
	Anzahl der Schnitte in den Gewebefraktionen	
	lateral	medial
1. Schnitt	42	44
2. Schnitt	88	81
3. Schnitt	90	87
4. Schnitt	90	91
5. Schnitt	81	86
gesamt	391	389

Die Schnitttiefe betrug 20 µm.

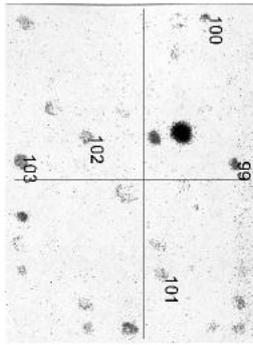
Vergleich der eingesetzten Gewebemengen und der cDNA-Amplifikationen.

Gewebe	Präparation der olfaktorischen Bulbi	Gewebemenge in [Anzahl olfaktorische Bulbi]	% der gesamten cDNA als Matrize in Amplifikation	Anzahl der optimalen Zyklen
laterale Bulbuskappen	Gefrierschnitte	<9	20	14
mediale Bulbuskappen	Gefrierschnitte	<9	20	14
Regeneration, Tag 8	frisch entnommen	10	2	18
Kontrolle	frisch entnommen	10	2	18

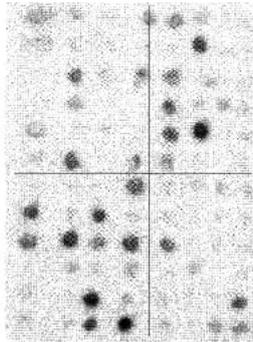
Lateral-Bib Kolonie Dot Blots



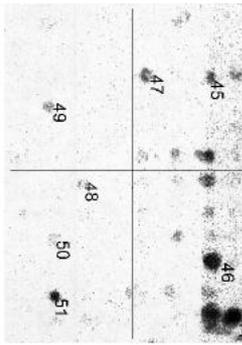
9.2 Vorwärts Sonde



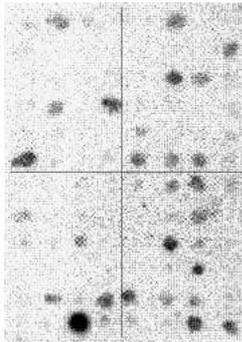
9.3 Rückwärts Sonde



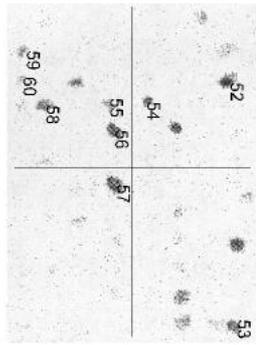
10.2



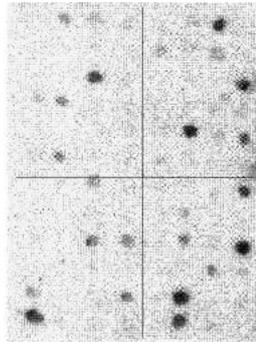
10.3



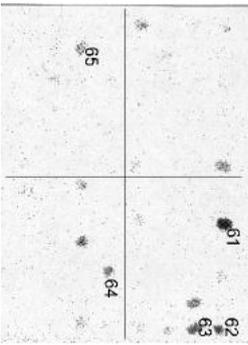
11.2



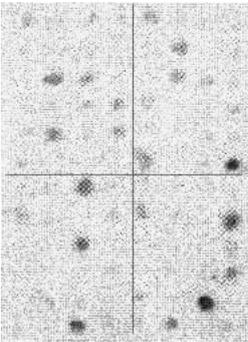
11.3



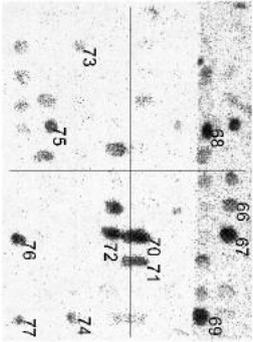
12.1



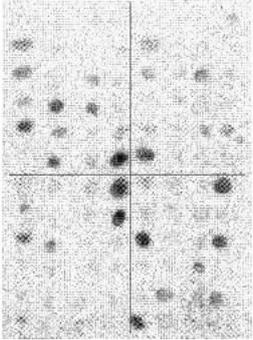
12.2



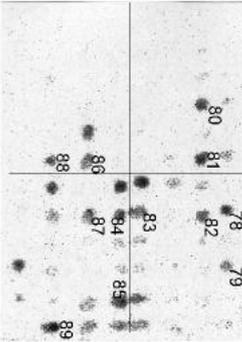
13.2 Vorwärts Sonde



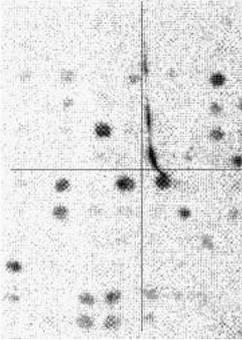
13.3 Rückwärts Sonde



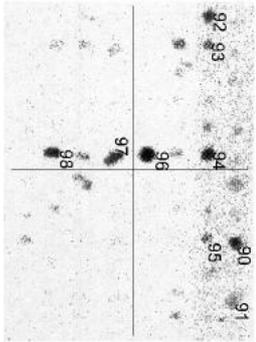
14.2



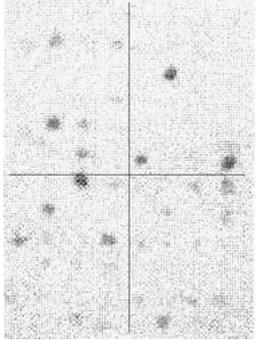
14.3



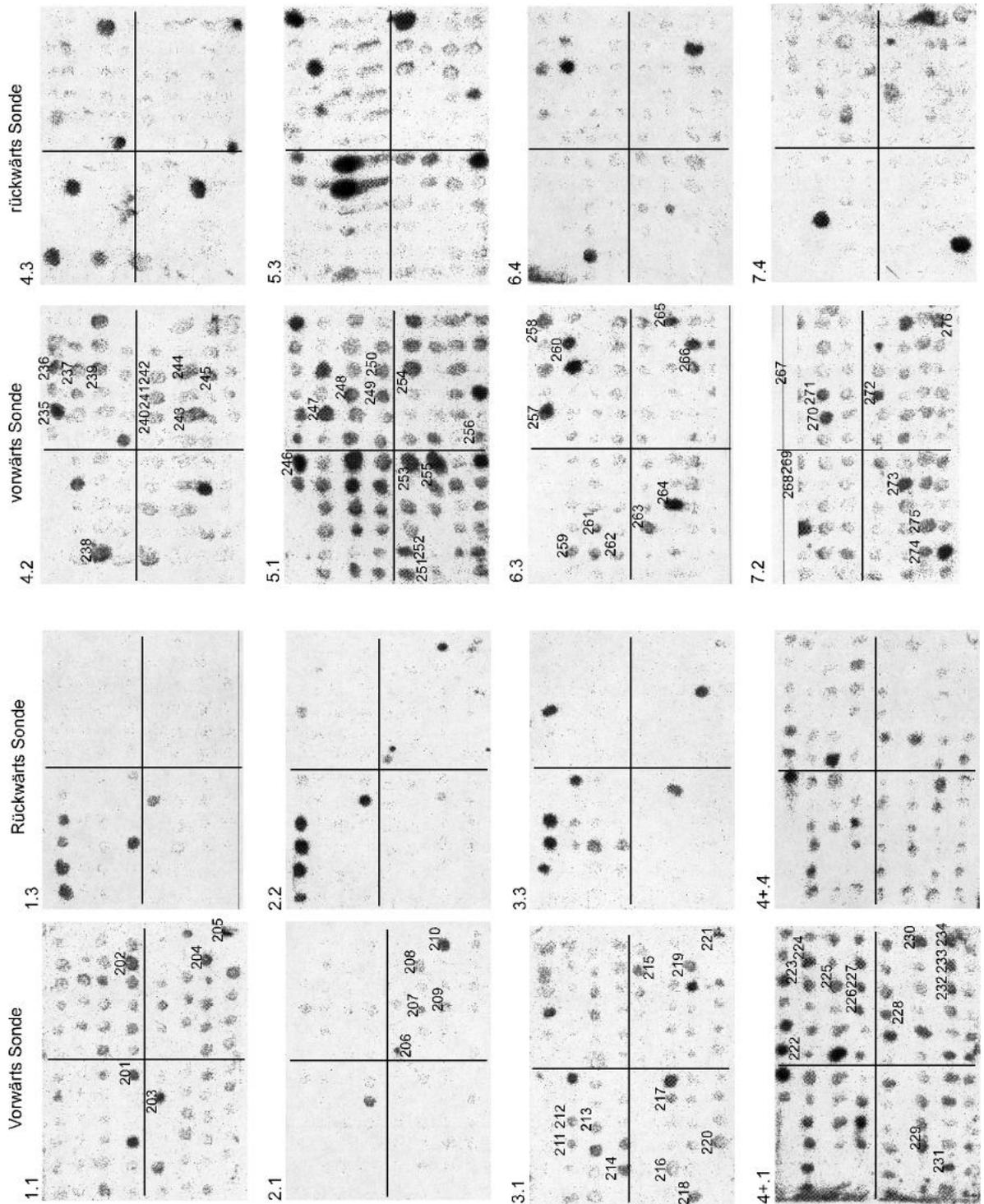
15.2

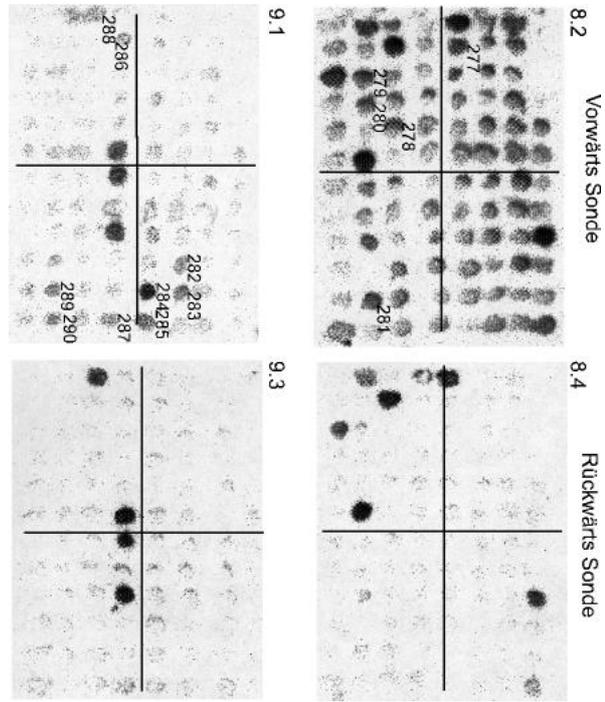


15.3



Medial-Bib Kolonie Dot Blots





LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Verena Doris Oehlmann
Geburtsdatum: 24. März 1973
Geburtsort: Stade
Anschrift: Marienstraße 2f
50825 Köln
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1979 - 1983 Pestalozzi Grundschule, Stade
1983 - 1985 Orientierungsstufe Camper Höhe, Stade
1985 - 1992 Gymnasium Athenaeum, Stade

Hochschulausbildung

10/1992 - 11/1997 Biochemiestudium, Universität Hannover
Abschluß: Diplom
04/1997 - 11/1997 Diplomarbeit, Medizinische Hochschule Hannover
Institut für Molekularbiologie, Prof. Dr. Nordheim
Titel: Isolierung *Bone Morphogenetic Protein* - induzierter Transkripte
aus embryonalen Stammzellen der Maus
01/1998 - 02/2002 Promotionsstudium, Universität zu Köln
Institut für Genetik, Prof. Dr. Korsching
Titel: Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte im
olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio*

Publikationen

A. Hollnagel, V. Oehlmann, J. Heymer, U. Rüther, A. Nordheim (1999). *Id* Genes are Direct Targets of Bone Morphogenetic Protein Induction in Embryonic Stem Cells.
J Biol Chem 274(28):19838-19845

Köln, den 4. Dezember 2001



Verena Oehlmann