

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI

1. Einleitung

1.1 Entwicklung des Nervensystems	2
1.2 Das Rhombencephalon	3
1.3 Musterbildung: Die Entstehung der neuronalen Vielfalt	5
1.4 Homöobox-Gene	7
1.5 Musterbildung im Rhombencephalon entlang der dorso-ventralen Achse	8
1.6 Zellwanderungen und die finale Position von Nervenzellen im Rhombencephalon	11
1.7 Der Transkriptionsfaktor Olig3 wird in Vorläuferzellen exprimiert	14
1.8 Der Transkriptionsfaktor c-Maf wird in postmitotischen Neuronen exprimiert	15
1.9 Zielsetzung der Arbeit	16

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.1.2 Bakterienstämme	18
2.1.3 Vektoren	18
2.1.4 Genomische Bibliotheken	18
2.1.5 Oligonukleotide	19
2.1.5.1 Primer für die Genotypisierungen	19
2.1.5.2 Sequenzierprimer	19
2.1.5.3 Primer zur Herstellung des konditionalen <i>c-Maf</i> -Allels	19
2.1.5.4 Primer zur Herstellung der <i>c-Maf</i> -Reporter-Allels	20
2.1.6 Antikörper	20
2.1.7 Zelllinie	21
2.1.8 Mausstämme und transgene Mauslinien	21
2.1.9 Nährmedien	22
2.1.10 Zellkulturmedien	22
2.1.11 Verwendete Software	23
2.1.12 Konfokale Mikroskopie	23

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von DNA und RNA	23
2.2.1.1 Aufzucht von PAC-Klonen und Präparation der PAC-DNA	23
2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	24
2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen	24
2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrlöchern bzw. Schwanzstücken	25

2.2.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus embryonalem Gewebe	25
2.2.2 Reinigung von Nukleinsäuren	26
2.2.2.1 Gelfiltration	26
2.2.2.2 Ethanol- und Isopropanolfällung von DNA	26
2.2.2.3 Mikrodialyse	26
2.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	27
2.2.4 Gelelektrophorese	27
2.2.4.1 Agarosegele	27
2.2.4.2 Sequenziergele	27
2.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgele	28
2.2.5 Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Nukleinsäuren	28
2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten	28
2.2.7.1 Herstellung von kompetenten DH10B Zellen und XL1-Blue MRF	28
2.2.7.2 Herstellung von Plasmid-Konstrukten	29
2.2.7.3 Einsatz von Restriktionsendonukleasen	29
2.2.7.4 Ligation	30
2.2.7.5 Transformation	30
2.2.7.6 Homologe Rekombination in Bakterien	30
2.2.8 Sequenzierung	31
2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion	32
2.2.9.1 Genotypisierung	32
2.2.9.2 RT-PCR	33
2.2.10 Southern-Blots von Agarosegelen	33
2.2.11 Markierung von Sonden	33
2.2.11.1 Radioaktive Markierung von Sonden	34
2.2.11.2 <i>In vitro</i> -Transkription und Digoxigenin-Markierung	34
2.2.12 <i>In situ</i> -Hybridisierungstechniken	34
2.2.12.1 <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefriergewebeschnitten	34
2.2.12.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Paraffinschnitten	35
2.2.12.3 „Whole mount“ <i>in situ</i> -Hybridisierung	36
2.2.12.4 Radioaktive Hybridisierung	38
2.2.13 Autoradiographie	38
2.2.14 Präparation von Embryo-Pulver	39
2.2.15 Zellkultur	39
2.2.15.1 Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten	39
2.2.15.2 Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen	40
2.2.15.3 Überprüfung der LacZ-Expression in COS-Zellen	41
2.2.16 Etablierung von genetisch veränderten Mäusen	41
2.2.17 Immunhistologische Methoden	41
2.2.17.1 Detektion neuronaler Zellpopulationen	41
2.2.17.2 Detektion von Zellproliferation und Zelltod	42
2.2.18 X-Gal-Färbung	42
2.2.19 Hämatoxylin von Methacrylatschnitten	43
2.2.20 Herstellung von Gewebeschnitten	43
2.2.20.1 Herstellung von Methacrylatschnitten	43
2.2.20.2 Herstellung von Gefrierschnitten	43
2.2.20.3 Herstellung von Paraffinschnitten	44
2.2.20.4 Herstellung von Vibratomschnitten	44

2.2.21 Herstellung von Antikörpern	45
2.2.22 Elektrokardiogramm	45
2.2.23 Statistische Auswertung der erhobenen Daten	45
3. Ergebnisse	
3.1 Olig3 in der Entwicklung neuronaler Zellpopulationen im siebten Rhombomer	46
3.1.1 Expression von Olig3 während der Embryonalentwicklung des Rhombencephalons	47
3.1.2 Verschiedene neuronale Populationen werden in der Olig3-Vorläuferdomäne im siebten Rhombomer spezifiziert	48
3.1.3 Die Olig3-Vorläuferdomäne im siebten Rhombomer gliedert sich in unterschiedliche Domänen	50
3.1.4 Eine Subpopulation des Nucleus olivaris inferior stammt aus der Wnt1-Vorläuferdomäne	53
3.1.5 Mis-Spezifizierung der A2-, A3- und A4-Neurone im siebten Rhombomer von homozygoten <i>Olig3</i> -mutierten Mäusen	54
3.1.6 Olig3 ist für die Entwicklung des Nucleus olivaris inferior im siebten Rhombomer notwendig	56
3.1.7 Analyse des Zelltods in <i>Olig3</i> -mutierten Mäusen	58
3.1.8 Die Entwicklung des Nucleus tractus solitarii und der Area postrema im siebten Rhombomer ist von Olig3 abhängig	60
3.1.9 Die Area postrema ist in <i>Olig3</i> -mutierten Mäusen verkleinert	61
3.1.10 Für die Entwicklung des Nucleus reticularis lateralis und des Nucleus cuneatus externus im siebten Rhombomer ist Olig3 notwendig	64
3.1.11 Die Fehlentwicklung des Nucleus tractus solitarii führt zu abnormalen Herzkontraktionen und Herzrhythmusstörungen	65
3.2 Olig3 in der Entwicklung neuronaler Zellpopulationen im ersten bis dritten Rhombomer	67
3.2.1 Die Bildung von Math1-Derivaten ist im zweiten bzw. dritten Rhombomer von <i>Olig3</i> -mutierten Mäusen beeinträchtigt	67
3.2.2 In <i>Olig3</i> -mutierten Mäusen ist die Bildung von Math1-Derivaten im ersten Rhombomer verändert	68
3.3 Mutagenese des <i>c-Maf</i> -Gens	70
3.3.1 Isolierung von genomischen Klonen des <i>c-maf</i> -Gens	70
3.3.2 Konstruktion der „Targeting“-Vektoren für die <i>c-Maf</i> -Mutagenese in ES-Zellen	70
3.3.2.1 Herstellung eines genomischen Subklons des <i>c-Maf</i> -Gens	70
3.3.2.2 Konstruktion des <i>c-Maf</i> -Reporter-Allels	71
3.3.2.3 Konstruktion des konditionalen <i>c-Maf</i> - Allels	72
3.3.3 Mutation des <i>c-Maf</i> -Gens in ES-Zellen	73
3.3.4 Phänotypische Analyse der <i>c-Maf</i> -Mutation	74
4. Diskussion	
4.1 Olig3 und das Programm zur Spezifizierung von dorsalen Neuronen im Rhombencephalon	76
4.2 Zelltod und Proliferation	78
4.3 Nervenzellen des Nucleus olivaris inferior werden in der Olig3-Vorläuferdomäne geboren	78

4.4 Olig3 ist für die Bildung des Nucleus tractus solitarii und der Area postrema nötig	80
4.5 Olig3 ist für die korrekte Entwicklung des Nucleus reticularis lateralis und des Nucleus cuneatus externus notwendig	82
4.6 Abnorme Herzschlagrate	83
5. Zusammenfassung	85
6. Literatur	89