

**Genetische Analyse eines modifizierenden
Gen-Locus für den neurologischen
Phänotyp der Wobbler Maus**

**Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld**

**vorgelegt von
Michael Ulbrich**

Oktober 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Molekulare Medizin.....	2
2.1.1 Genetisch bedingte Erbkrankheiten.....	3
2.1.1.1 Chromosomenanomalien.....	4
2.1.1.2 Monogene Erkrankungen.....	4
2.1.1.3 Polygen-multifaktorielle Erkrankungen.....	4
2.2 Analyse von Quantitativen Trait Loci.....	5
2.2.1 Quantitative Trait Loci (QTL).....	5
2.2.2 QTL-Kartierung.....	8
2.2.2.1 Einsatz von Mausstämmen zur QTL Kartierung.....	9
2.2.2.1.1 Verwendung von Inzuchtstämmen.....	11
2.3 Die Mutation <i>wobbler</i> der Maus.....	14
2.3.1 Pathomechanismen der Wobbler-Erkrankung.....	14
2.3.2 Zuchtstrategie zur Identifizierung der <i>wr</i> -Mutation.....	14
2.4 Humane Motoneuronenerkrankungen.....	15
2.5 Zielsetzung der Arbeit.....	17
3. Material und Methoden.....	18
3.1 Material.....	18
3.1.1 Mausstämme.....	18
3.1.1.1 <i>Mus musculus C57Bl/6J</i>	18
3.1.1.2 <i>Mus musculus C57Bl/6J-wr</i>	18
3.1.1.3 <i>Mus musculus castaneus</i>	18
3.1.1.4 <i>Mus musculus C57Bl/6J-mdf</i>	18
3.1.2 Oligonukleotide.....	19
3.1.2.1 Verwendete Mikrosatelliten.....	20
3.1.2.2 Diagnostische Marker.....	22
3.1.3 Erst- und Zweitantikörper.....	23
3.1.4 Enzyme.....	24
3.1.5 Verwendete Bausätze (Kits).....	24
3.1.6 Restriktionsenzyme.....	24
3.1.7 Fragmentlängenstandards für Agarosegele.....	24

3.1.8 Verwendete Datenbanken.....	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Kreuzungsstrategie zur Identifizierung des <i>wr</i> - und <i>wrmod1</i> -Locus.....	26
3.2.2 Interval Haplotype Analysis Programm.....	29
3.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.3.1 DNA-Methoden.....	29
3.2.3.1.1 Isolierung von DNA aus Maus-Schwanzspitzen.....	29
3.2.3.1.2 Isolierung von DNA aus Mausgeweben (Boehringer).....	29
3.2.3.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe.....	30
3.2.3.2 RNA-Methoden.....	31
3.2.3.2.1 RNA-Isolierung aus Mausgeweben.....	31
3.2.3.2.2 Kontroll-RNA-Gele.....	31
3.2.3.2.3 Große, denaturierende RNA-Gele.....	32
3.2.3.2.4 Reverse Transkription.....	32
3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
3.2.3.4 Restriktionsspaltung von DNA.....	33
3.2.3.5 Agarosegelelektrophorese.....	33
3.2.3.6 Ethidiumbromid-Färbung.....	34
3.2.3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	34
3.2.3.8 Quantitative Real Time PCR (light cycler).....	35
3.2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	36
3.2.3.10 Sequenzierung von PCR-Produkten.....	37
3.2.4 Aufbereitung der Gewebe für histologische Analysen.....	37
3.2.4.1 Gefrierblöcke.....	37
3.2.4.2 Gewebeschnitte.....	38
3.2.4.3 Methanolfixierung.....	38
3.2.4.4 Perfusion.....	38
3.2.4.4.1 Zusammensetzung der Fixiermittel.....	39
3.2.4.5 Antikörperfärbungen.....	39
3.2.4.6 Nissl-Kresylviolett-färbung.....	39
3.2.4.7 EM-Aufnahmen und Analyse der lumbalen Nervenbahnen.....	40

4. Ergebnisse	41
4.1 Charakterisierung von modifizierenden Einflüssen auf den WR-Phänotyp.....	41
4.1.1 Klassifizierung der WR*-Tiere.....	41
1.1.1.1 Gewichtsmessungen.....	42
1.1.1.2 Motoneuronendegeneration.....	43
1.1.1.3 Aktivierung von Gliazellen.....	44
4.1.1.3.1 Reaktive Astrogliose.....	44
4.1.1.3.2 Mikrogliaaktivierung.....	46
1.1.1.4 Expressionsanalyse des Gens für die α -Untereinheit des Acetyl-Cholin-Rezeptors.....	47
4.1.2. Modifier des Testis-Phänotyp.....	48
4.2 Kartierung des neuronalen Modifiers.....	50
4.2.1 Segregationskartierung von Chromosom 14.....	52
4.2.1.1 Etablierung einer partiellen kongene Mauslinie (Bl/C ^{cast14} -wr).....	53
4.2.2 Segregationskartierung Chromosom 13 und 17.....	55
4.3. Neurofilament Akkumulationen im Perikaryon von Neuronen.....	58
4.4 Degeneration der lumbalen Spinalnerven.....	60
4.5 Analyse der Positionskandidatengene <i>Nfh</i> und <i>Nfl</i>	63
4.5.1 Sequenzanalyse.....	63
4.5.1.1 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens <i>Nfl</i>	63
4.5.1.2 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens <i>Nfm</i>	63
4.5.1.2.1 Spezies übergreifende Aminosäureanalyse des NF-M Proteins.....	66
4.5.2 Expressionanalyse der Gene <i>Nfl</i> und <i>Nfm</i>	69
4.6 Kreuzung von F ₁ <i>Cast/Bl6</i> -Hybriden mit <i>C57Bl/6J-mdf</i>	71
5. Diskussion	73
5.1. Modifizierter neurologischer Phänotyp der <i>wobbler</i> Maus.....	73
5.1.1. Phänotypisierung der WR*-Tiere.....	73
5.1.2. QTL-Kartierung.....	74
5.1.2.1 Kandidatengenbereich <i>wrmod1</i>	76

5.1.2.2. Kandidatengen Neurofilament mittlere Kette (<i>Nfm</i>).....	77
5.1.2.2.1 Neurofilament - Aggregation versus Phosphorylierung.....	78
5.1.2.2.2 Neurofilament spezifische Phosphorylierungsmotive.....	79
5.1.2.2.3 KSP-Motiv spezifische Kinasen.....	80
5.1.2.2.4 Transgene Mausmodelle.....	81
5.1.2.2.5 Risikogen Neurofilament ?.....	81
5.1.3 Spezifität des <i>wr</i> -QTLs.....	82
5.1.4 Weitere QTLs der <i>wr</i> -Mutation.....	83
5.1.4.1 Intermediäre WR-Phänotypen.....	84
5.1.5 Kongene Zuchtstrategie.....	84
5.1.6. Differenzielle Genexpressionsanalyse.....	85
5.2 Modifizierende Gene der WR-Spermatogenese.....	86
5.3 Ausblick.....	86
6 Literaturverzeichnis.....	88
7. Anhang.....	102
7.1 Publikationen.....	102
7.1.1 Genetic modifiers that aggravate the neurological phenotype of the wobbler mouse NeuroReport, 2002, 13: 535-539.....	103
7.1.3 Comparative transcription map of the wobbler critical region on mouse chromosome 11 and homologous region on human chromosome 2p13-14 BMC Genetics 2002, 3: 14.....	108
7.2 Verwendete Abkürzungen.....	115
7.3 Bezugsquellen für Chemikalien.....	116
7.4 Bezugsquellen für Materialien und Geräte.....	116

1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein modifizierender genetischer Locus des neurologischen Phänotyps der Wobbler Maus untersucht.

Die autosomal rezessive Mutation *wobbler* (Gensymbol *wr*, Phänotyp WR) führt zu einer Muskelatrophie im Schulter- und Halsbereich, verursacht durch eine Degeneration von Motoneuronen in Hirnstamm und Rückenmark. Der neurologische Phänotyp der Wobbler Maus entspricht dem klinischen Bild humaner spinaler Muskelatrophien (SMA) und der Amyotrophen Lateral Sklerose (ALS). Männliche WR-Mäuse zeigen darüber hinaus einen Spermiogenesedefekt.

Die aus der Intraspezies Kreuzung *Mus musculus C57Bl/6J* x *M. m. castaneus* hervorgegangenen WR-Individuen bildeten phänotypisch eine heterogene Gruppe mit variabler neurologischer Symptomatik, eine Variation, die im homogenen Mutantenstamm *C57Bl/6J* nicht auftrat. Eine Klassifizierung der WR-Tiere in Subphänotypen konnte durch die teilweise auftretende Paralyse der Hinterextremitäten eindeutig erfolgen. Neben einem extrem progressiven Verlauf der Neuronendegeneration konnte sowohl eine verstärkte Astrogliose als auch eine fortschreitende Aktivierung der Mikroglia im Hirnstamm und Rückenmark der betroffenen Tiere beobachtet werden. Eine signifikant verstärkte Reaktivierung synapsenspezifischer Gene konnte am Beispiel der α -Untereinheit des nicotinischen Acetylcholinrezeptors (AChR α) in der Muskulatur der Vorder- (Tricepsmuskel) und Hinterbeine (Gastrocnemius / Soliusmuskels) nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Neurofilament-Ablagerungen in motorischen Neuronen des Hirnstammes und des Rückenmarks, sowie eine lumbale Axonopathie der ventralen Nervenbahnen festgestellt werden.

Segregationsanalysen führten zur Kartierung eines krankheitsassoziierten „Quantitativen Trait Locus“ (*wrmod1*) auf dem Chromosom 14 der Maus. Die Kartierungsdaten wurden durch die Etablierung einer partiell kongenen Mauslinie bestätigt. Innerhalb des ca. 10,6 Mb umfassenden Kandidatengenintervalls konnte das neuronenspezifische Gen für die mittlere Untereinheit des Neurofilamentes (*Nfm*) als Kandidat für *wrmod1* identifiziert werden. In der kodierenden Sequenz des *M.m. castaneus Nfm*-Allels wurden drei Punktmutationen nachgewiesen, die jeweils zu Aminosäuresubstitutionen in der carboxyterminalen Domäne führten. Die Substitution K609E betrifft ein hoch konserviertes Lysin - Serin - Prolin (KSP) Phosphorylierungsmotiv und führt unter Umständen zu einer differenzierten Phosphorylierung des NF-M-Proteins. Hieraus könnte ein gestörter axonaler Transport der NF-M-Untereinheiten resultieren, der zu einer beschleunigten Degeneration der durch die Wobbler Krankheit betroffenen Motoneuronen führt.

2. Einleitung

2.1 Molekulare Medizin

Die molekulare Medizin verbindet die klassische Medizin mit den Methoden der Molekularbiologie, der Zellbiologie und der Genomik. Erklärtes Ziel ist die molekulare Aufklärung von Krankheitsursachen und die damit einhergehende Entwicklung neuer Therapieverfahren.

Die Fülle an genetischen Daten, wie sie sich z.B. aus der Sequenzierung des humanen Genoms (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001; «<http://www.ornl.gov/hgmis/>») ergeben, kombiniert mit einer sich schnell entwickelnden Bioinformatik, bilden das Grundgerüst für die Erforschung und Identifizierung krankheitsrelevanter Gene (DHGP 2002; BMBF 2001). Mit den zur Zeit verfügbaren Algorithmen ist es immer noch nicht möglich, alle Gene aus der DNA zu identifizieren, eine Grundvoraussetzung für die funktionelle Genanalyse (functional genetics). Eine Alternative bietet die vergleichende Analyse von Genomen (comparative genomics) unterschiedlicher Spezies (Rubin et al., 2000). In eukaryontischen Genomen kommen die für einen Organismus essenziellen Gene mit einer hohen Konservierung in der Sequenz, in der chromosomalen Gruppierung (Syntänie) und in der relativen Anordnung (Genkarte) vor. Die Kartierung des *Clc1* Myotoniegens der ADR-Maus auf Chromosom 6 führte z.B. aufgrund konservierter Syntänie zur Vorhersage der Genposition auf dem humanen Chromosom 7q (Jockusch, 1990), die von Abdalla et al. (1992) bestätigt werden konnte. Zudem zeigen Gene, die für fundamentale Proteine wie z.B. Stoffwechsellzyme oder Cytoskelettproteine codieren, strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten, wodurch z.T. orthologe Mutationen zu ähnlichen Phänotypen führen können.

Neben der Sequenzierung des Mausgenoms (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002) wurden weitere eukaryontische Genome, wie z. B. das der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Goffeau et al., 1996), das des Fadenwurmes (*Caenorhabditis elegans*, The C elegans Sequencing Consortium, 1998) und das der Taufliege (*Drosophila melanogaster*, Adams et al., 2000; Myers et al., 2000) vollständig sequenziert und bildeten die Grundlage für eine komparative Gen- und Genomanalyse.

Zur Zeit sind ca. 6000 Erbkrankheiten in der MIM Database « Online Mendelian Inheritance in Man» beschrieben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>). Bei 1000

dieser Erblichen konnten bereits die verursachenden Gendefekte aufgeklärt werden (Antonarakis et al., 2000). Epidemiologisch bedeutsame Erkrankungen, deren Entstehung komplexe Gen – Gen und Gen – Umwelt Wechselwirkungen bedingen, rücken zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung. Die Identifizierung der genetischen Faktoren dieser polygen-multifaktoriell determinierten Krankheiten, ihre Interaktionen untereinander bzw. mit der Umwelt eröffnen nicht nur völlig neue Chancen für das Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen, sondern sind vor allem die Grundvoraussetzungen für die Entwicklung einer frühzeitigen Diagnostik und neuer Therapieansätze.

2.1.1 Genetisch bedingte Erbkrankheiten

Genetisch bedingte Erkrankungen sind immer durch Veränderungen in der Erbsubstanz (DNA) gekennzeichnet, die sich im Laufe der genetischen Expression gemeinsam mit allen anderen Merkmalen ausprägen. Solche Veränderungen (Mutationen) können ganze Chromosomen, Chromosomenabschnitte, Gene oder deren regulatorische Elemente betreffen und Auswirkungen auf das Transkript und damit auch auf das Genprodukt (Protein) haben. Mit welcher Penetranz (Durchschlagskraft einer Mutation, angegeben in Prozent der Häufigkeit) eine Veränderung im Genom zur Erkrankung führt, hängt nicht nur von der Art der Mutation, sondern auch vom genetischen Hintergrund des betroffenen Organismus und den auf ihn einwirkenden Umwelteinflüssen ab. Entsprechend des Genotyps können sich Genvarianten (Allele) abhängig vom genetischen und individuellen Kontext vorteilhaft oder nachteilig auswirken. Letztendlich legt der Genotyp fest, mit welchen Reaktionsnormen ein Organismus auf Einflüsse aus seiner Umwelt reagieren kann. Innerhalb dieses komplexen Bedingungsgefüges können Genveränderungen nicht nur eine Krankheit auslösen, sondern auch für eine Erkrankung prädisponieren, den Krankheitsverlauf modifizieren und/oder die Empfindlichkeit für Medikamente beeinflussen.

Ätiologisch betrachtet werden die genetisch bedingten Erbkrankheiten in drei Gruppen eingeteilt:

2.1.1.1 Chromosomenmutationen

Chromosomenanomalien können sowohl strukturell als auch numerisch bedingt sein. Deletionen führen zu einem Verlust von mehr oder weniger großen Chromosomenstücken. Duplikationen, Inversionen oder Translokationen bewirken dagegen einen Strukturumbau innerhalb der Chromosomen. Numerische Chromosomenaberrationen (Aneuploidien) entstehen z.B. durch das Nichttrennen von gepaarten Chromosomen während der Meiose, wodurch Keimzellen mit veränderten Chromosomenzahlen (Monosomien oder Trisomien) auftreten. Einige bedeutende Trisomien beim Menschen sind z.B. die Trisomie 13 (PATAU-Syndrom), die Trisomie 18 (EDWARDS-Syndrom) und die Trisomie 21 (DOWN-Syndrom) (Schneider und Weitzel, 1995).

2.1.1.2 Monogenetisch bedingte Erbkrankheiten

Monogenetisch vererbte Krankheiten sind durch Mutationen eines einzelnen Gens gekennzeichnet (Plomin et al., 1994). Diese werden nach den Mendel'schen Regeln vererbt (autosomal oder geschlechtsgebunden). In Einzelfällen können aber auch nicht mendelnde Vererbungen, wie mitochondriale (maternaler Effekt) oder „genetic imprinting“ (Schneider und Weitzel, 1995) auftreten. Häufige monogene Erkrankungen sind z.B. Zystische Fibrose, Muskeldystrophie Duchenne, Myotone Dystrophie oder Chorea Huntington.

2.1.1.3 Polygen-multifaktoriell bedingte Erkrankungen

Sind an der Ausprägung einer Krankheit mehrere Gene beteiligt, werden diese unter dem Begriff der polygenen Erkrankungen zusammengefasst. Das Zusammenwirken der entsprechenden Gene kann dabei entweder additiver Natur oder aber von einem Schwellenwert abhängig sein, der bei Überschreitung zur Manifestation der Krankheit führt (Schneider und Weitzel, 1995). Kommen die betroffenen Gene nicht in einer Kopplungsgruppe vor, wird jedes einzelne Gen, den Mendel'schen Regeln folgend, frei rekombinierend vererbt, d.h. bei familiärem Auftreten fehlt eine Segregation im Mendel'schen Sinne (Murken und Cleve, 1996).

Der Begriff „multifaktoriell“ bezieht sich auf die Interaktion der veränderten Gene mit Umweltfaktoren, wie z.B. Ernährungsgewohnheiten, individuellem Lebensstil, chemischen und/oder physikalischen Faktoren. Die meisten der sogenannten „Volkskrankheiten“, wie Krebs oder Alzheimer, sind polygen-multifaktoriell bedingte

Erkrankungen. Ob ein Individuum prädisponiert für oder resistent gegen diese und andere Krankheiten ist, ergibt sich aus dem komplexen Zusammenspiel vieler verschiedener Gene mit verhältnismäßig geringer Wirkung im Kontext verschiedenster Umwelteinflüsse. Streng genommen gilt dies auch für monogenetisch bedingte Erbkrankheiten. Ein Organismus muss als ein offenes System betrachtet werden, dessen Entwicklung vom Genotyp zum Phänotyp stets in enger Interaktion mit sämtlichen Einflüssen aus der Umwelt steht, unabhängig vom Vererbungsmodus. Je nachdem, ob sich die Erkrankung phänotypisch bereits in einem Frühstadium der postnatalen Entwicklung oder aber erst im Laufe des Lebens manifestiert, variieren die umweltbedingten Anteile. Zudem können krankheits-assoziierte Gene von monogenetisch bedingten Erbkrankheiten den Verlauf der Krankheit wie z.B. im Fall der Zystischen Fibrose (Bronsveld et al., 2001; Henry et al., 2001; Hull et al., 1997), positiv oder negativ beeinflussen. Die individuelle genetische Ausstattung führt dann inter- oder intrafamiliär vererbt zu modifizierten Krankheitsverläufen und somit zur phänotypischen Diversität unter den Nachkommen.

Solche, auch als quantitative Merkmalsorte oder Quantitative-Trait-Loci (QTL) bezeichnete chromosomale Regionen, beinhalten genetische Faktoren, die für die Entstehung einer Krankheit weder Voraussetzung noch notwendig sind, aber mit variierenden Effektgrößen, Interaktionen untereinander oder Einflüssen aus der Umwelt zum klinischen Verlauf der Erkrankung beitragen können.

2.2 Analyse von "Quantitative Trait Loci"

2.2.1 Quantitative Trait Loci (QTL)

Als Quantitative Trait Loci werden spezifische „Genorte“ bezeichnet, die eine signifikante Kopplung mit der Ausprägung eines komplexen Merkmals zeigen (Doerge, 2002). Diese oft noch sehr großen QTL Regionen mit einer durchschnittlichen Größe von >10cM beinhalten i.d.R. eine Vielzahl von möglichen Genen unbekannter Varianz. Da in jedem Fall ein modifizierender Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps ausgeübt wird, kann in diesem Zusammenhang von modifizierenden Loci bzw. «Modifier-Genen», gesprochen werden. Ultimatives Ziel einer QTL Analyse ist die Identifizierung solcher Modifier-Gene, um deren zelluläre Rolle und Funktion im Kontext der Krankheit zu verstehen. Allerdings werden komplexe Merkmale häufig nicht nur durch einen Locus, sondern durch die

Interaktion vieler verschiedener Loci beeinflusst, wodurch die Erschließung der molekularen Ursachen von Erkrankungen wesentlich erschwert wird (Holtzman et al., 2001). Unterschiedliche Effektstärken einzelner QTLs bewirken eine unvollständige Penetranz, weshalb oft keine eindeutige Genotyp–Phänotyp-Korrelation herzustellen ist. Unerlässlich ist in diesem Zusammenhang die exakte Definition der phänotypischen Ausprägung einer Krankheit. Alle Symptome und Charakteristika müssen ausreichend beschrieben werden, da der Einfluss der verantwortlichen Gene nicht bekannt ist.

Modifier oder QTLs sind letztendlich Genvarianten (Allele) die sich hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden. Solche Polymorphismen sind - wie Mutationen - Veränderungen, die allerdings nicht ursächlich krankheitsauslösend sind. Neben Insertionen, Deletionen und Duplikationen finden sich größtenteils einzeln ausgetauschte Nukleotide, sogenannte Single-Nukleotid-Polymorphisms - SNPs - (www.Ornl.gov/hgmis/fag/snps.html), die im Genprodukt zu Aminosäure-substitutionen führen können und die die Funktionalität des Proteins verändern. In diesem Zusammenhang werden modifizierende Gene bzw. „Genorte“ in der Literatur zunehmend auch als Quantitative Trait Nucleotides (QTN) bezeichnet (Flint und Mott, 2001). Im Humangenom finden sich im Durchschnitt alle 500 - 1000bp solche Basenpaaraustausche (<http://www.ornl.gov/hgmis/faq/snps.html>; Human Genome Projekt Information). Bei ca. drei Milliarden Basenpaaren beträgt die Anzahl der Variationen demnach 3-6 Millionen pro Individuum. Vom SNP Konsortium konnten bereits über 1,4 Millionen SNPs identifiziert werden (The International SNP Map Working Group, 2001). Treten SNPs mit einer Häufigkeit von mehr als 1% bezogen auf die Untersuchungsgruppe auf (Kutzner et al., 2001), ist davon auszugehen, dass sie stabil vererbt werden und in Strukturgenen oder regulatorischen Elementen unter Umständen Auswirkungen auf Qualität und Menge eines Genproduktes haben.

Welche physiologischen Auswirkungen solche individuellen Genvarianten haben können, lässt sich am Beispiel der Alzheimer-Erkrankung (AD) erschließen.

Pathogenetisch bewirken Abweichungen im neuronalen Proteinstoffwechsel, unphysiologische Proteolyse des Amyloid Precursor Proteins (APP) und übermäßige Phosphorylierung des Tau Proteins eine Degeneration von Nervenzellen und Synapsen. Als relevante Einflussgrößen gelten verschiedene Allele des Apolipoproteins E, die sich durch Substitutionen von Arginin durch Cystein in Position 112 (Apo E4) und 158 (Apo E2) unterscheiden (Weisgraber et al., 1981; de Knijff et

al., 1994). Im Apo E3-Allel ist Arginin nicht substituiert. Epidemiologische Untersuchungen ergaben deutliche Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen Kontrollpersonen und Betroffenen, wodurch dem E2-Allel eher eine protektive Wirkung zugeschrieben wurde und das E4-Allel als Risikofaktor galt. Allerdings ist das E4-Allel weder hinreichende noch notwendige Bedingung für die Entstehung der Alzheimer Erkrankung. Zum Einen sind zwei Drittel der AD Betroffenen nicht im Besitz des E4-Allels, zum Anderen zeigen Träger des E4-Allels aus der Kontrollgruppe keinerlei Symptome (Lautenschläger et al., 1999).

Aufgrund der enormen Anzahl von SNPs muss davon ausgegangen werden, dass nur eine begrenzte Anzahl tatsächlich funktionell und damit auch physiologisch bedeutsam ist (Schork et al., 2000). Gerade die häufig in der Bevölkerung auftretenden polygen-multifaktoriellen Krankheiten wie z.B. Alzheimer, Krebs, Koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck, Diabetes Typ 2 und Adipositas scheinen mit häufig vorkommenden Genvarianten assoziiert zu sein («Common Disease – Common Variant Hypothese», Cargill et al., 1999) und stellen somit ein erhöhtes Risiko dar.

Die funktionelle Analyse bzw. Kartierung von quantitativen Merkmalen wird in den nächsten Jahren noch weiter in den Mittelpunkt der molekularen Biologie rücken. Insbesondere in der Erforschung von Infektionskrankheiten wie AIDS, Tuberkulose oder Malaria, bei denen bereits zahlreiche QTLs kartiert wurden (McNicholl et al., 2000; O'Brien et al., 2000), sind auch Ergebnisse zu erwarten, die sich auf die Virulenz von Krankheitserregern beziehen. Welche genetischen Variationen von Bakterien oder Viren erhöhen z. B. in Abhängigkeit eigener disponierender Faktoren die Infektionsgefahr? Welche Dispositionen spielen bei allergischen Reaktionen oder Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle? Solche und andere Fragen werden in der Zukunft Gegenstand neuerer Forschungsarbeiten sein (Balling, 2002). In der Nutztierhaltung (Kim et al., 2000; Rothschild et al., 2000) oder der Pflanzenzucht (Toojinda et al., 2003; Roman et al., 2002) wurden mit dem Ziel der züchterischen Selektion in den letzten Jahren ebenfalls zahlreiche QTLs charakterisiert. Durch die Zerlegung von QTLs in monogen mendelnde Faktoren können wirtschaftlich bedeutende Merkmale gezielt kombiniert und Resistenzen oder Erträge bestimmter Rassen oder Pflanzen erhöht werden.

2.2.2 QTL-Kartierung

In der Humanmedizin kamen in der Vergangenheit vor allem Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien zur Klärung der genetischen und umweltbedingten Varianz zum Einsatz (Strachan und Read, 1996). Mit diesen Methoden lassen sich statistisch betrachtet Grade der Erblichkeit (Heritabilität) von Eigenschaften feststellen, nicht aber die daran beteiligten Gene. Im Zuge der molekulargenetischen Entwicklung werden zur Zeit zwei unterschiedliche Verfahren für die Identifizierung krankheitsassoziiierter Gene angewendet.

1. In Studien zur Allelverknüpfung werden z.B. vermehrt groß angelegte Assoziationsanalysen (linkage disequilibrium mapping) für epidemiologisch bedeutsame Volkskrankheiten durchgeführt (Schork et al., 2000; Plomin et al., 2001). In solchen Studien, z.B. für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wird eine große Anzahl von Probanden phänotypisiert, anschließend genotypisiert und nach signifikant auftretenden merkmalsassoziierten Genvarianten gesucht (GSF, 2002; Klopp, 2002.).
2. In Kopplungsstudien (linkage mapping) wird im Gegensatz zu den Assoziationsstudien keine Beziehung zwischen zwei Allelen, sondern zwischen zwei Loci hergestellt. Unter der Voraussetzung, dass zumindest ein Haupt-QTL existiert, können mit dieser Methode komplexe genetische Einflüsse lokalisiert werden. Zufällig auftretende meiotische Rekombinationsereignisse führen dazu, dass in Abhängigkeit zur Entfernung zweier Loci unterschiedliche Rekombinationsfrequenzen auftreten. Weit voneinander entfernt liegende Genloci z.B. Haupt-QTL und Test-Marker werden unabhängig voneinander vererbt, relativ benachbarte werden dagegen in einer Kopplungsgruppe vererbt. Der Abstand zwischen Marker und Locus errechnet sich aus der Rekombinationshäufigkeit. Dabei entspricht eine Rekombinationsrate von 1 einer genetischen Distanz von einem cM. Entscheidend für eine erfolgreiche Kopplungsanalyse ist die Verfügbarkeit von gleichmäßig über das Genom verteilten polymorphen Test-Markern um eine Ko-Segregation festzustellen. Die verwendeten Marker sollten ausreichend polymorph in der Untersuchungsgruppe auftreten, genomisch kartiert und leicht nachweisbar sein.

2.2.2.1 Einsatz von Mausstämmen zur QTL Kartierung

Die Ausprägung komplexer quantitativer Merkmale setzt unabhängig vom untersuchten Organismus immer ein hohes Maß an genetischer Heterogenität voraus. Diese Voraussetzung ist zwar in Humanstudien gegeben, die molekulare Identifikation wird allerdings durch mehrere Punkte wesentlich erschwert. Einerseits setzt die individuelle genetische Variabilität selbst Grenzen, da z.B. Geninteraktionen (Epistase), wechselnde Erbgänge und inkomplette Penetranz zu Fehlinterpretationen führen können. Andererseits wird die Analyse durch die Anzahl der betroffenen Personen limitiert, da i.d.R. nur wenige Generationen in Familienstammbäumen dokumentiert sind. Weiterhin ist eine Standardisierung der Umweltfaktoren nicht möglich.

Tiermodelle, insbesondere die Spezies Maus, bieten mehrere entscheidende Vorteile für die systematische Charakterisierung und Kartierung von QTLs (Lander und Schork, 1994; Nadeau et al., 2000; Moore und Nagle, 2000).

Aufgrund der kurzen Generationszeit, ca. 5-6 Generationen pro Jahr, können große Tierzahlen unter standardisierten Bedingungen gezüchtet und untersucht werden. Neben den schon erwähnten Vorteilen (Syntänie/Homologie) lassen sich bei der Maus die Voraussetzungen für genetische Analysen manipulieren. Je nach Fragestellung können unterschiedliche Züchtungsstrategien mit verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen durchgeführt werden. Insgesamt sind mehr als 500 Inzuchtstämme beschrieben, die sich aus Bruder-Schwesterpaarungen über mindestens 20 Generationen ableiten und genetisch als homogen betrachtet werden (Frankel, 1995; Festing, 1994).

Durch einfache Genotyp-Phänotyp Korrelation inter- oder intraspezifischer Kreuzungen zwischen einem Kontrollstamm und einem sensitiven „Krankheitsstamm“ kann ein schnelles QTL-Screening durchgeführt werden. Da Inzuchtstämme an allen Genloci homozygot sind, können z. B. einzelne an einen Krankheitslocus assoziierte Modifier-Gene, durch Ko-Segregationsanalysen von F₂-Generationen identifiziert werden. Hierfür stehen ca. 6500 leicht zu typisierende Mikrosatellitenmarker (Di- und Trinukleotidrepeats) zur Verfügung (Dietrich et al., 1996). Diese Repeats unterliegen keinem Selektionsdruck, wodurch sie hoch polymorph zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen auftreten und in Segregationsanalysen eingesetzt werden können. Zusätzlich können ca. 80.000 SNPs als genomische Marker genutzt werden. Deren Verteilung tritt über das

Mausgenom in Mosaiken mit sehr hoher SNP Rate (~ 40 SNPs auf 10 Kb) und Abschnitten mit extrem niedriger Rate (~0,5 SNPs auf 10 Kb) auf (Wade et al., 2002). Mittels spezieller mathematischer Algorithmen bzw. statistischer Analyseprogramme wie z.B. der Intervallkartierung («Map-Manager QT», Manley und Olson, 1999; «Haplotype-Analysis-Program», Neuhaus und Beier, 1998; «MIM-Program», Kao et al., 1999; «Mapmaker/QTL», Lincoln et al., 1992) wird bei einer signifikanten Kopplung zwischen Merkmal und Marker die chromosomale Region ermittelt in der ein QTL lokalisiert ist. Signifikante Kopplung wird ab einem ermittelten, Lod-Score von 3 (Log of odds; negativer Logarithmus der Kopplungswahrscheinlichkeit) erreicht. Die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Effekt von einem mit dem Marker gekoppelten QTL stammt, bzw. dass er nicht gekoppelt vorliegt, beträgt dann 1000:1.

Zur Feinkartierung wie auch zur Überprüfung der Kartierungsdaten können kongene Mauslinien (vgl.2.2.2.1.1) etabliert werden (Darvasi, 1998), in denen der entsprechende QTL durch sukzessive Rückkreuzungen in einen Kontrollstamm eingezüchtet wird und für eine Positionsklonierung zugänglicher wird (Collins, 1992, 1995). Im Idealfall kann über die phänotypische Analyse der kongenen Nachkommen eine genetische Auflösung von 1-2 cM erreicht werden und somit die Grundlage für die Konstruktion eines QTL überspannenden Klon-Contigs ermöglichen. Eine hierfür notwendige physikalische Mauskarte wurde 1999 mit ca. 300.000 BACs der RCPI23 BAC-Bank erstellt (Osoegawa et al., 2000), seit 2002 ist eine „draft“ Sequenz mit 7,7-facher Abdeckung unter - www.ensembl.org - öffentlich verfügbar (Mouse Sequencing Consortium 2002). Mögliche Modifier-Gene können anschließend mit verschiedenen Methoden auf ihre physiologische Relevanz untersucht werden.

In der Tabelle 1 sind einige in Mausstämmen erfolgreich durchgeführte QTL-Analysen dargestellt.

Erkrankung	QTL	Maus Chr.	Hum. Chr.	Literatur
Cholesterin- cholelithiasis	<i>Lith1 – Lith4</i> Lithogenic gene	2, 10, 17, X	2, 6, 10, X	Lammert, et al., 1999
Adipositas	<i>Mob1 – Mob4</i> Multigenic obesity gene	6, 7, 12, 15	5, 7, 14	Chagnon, et al., 2000
Gastroschisis	<i>Rig1</i> Radiation-induced gastroschisis gene	7	15	Hillebrandt, et al., 1998
Asthma bronchiale	<i>Bhr1 – Bhr4</i> Bronchial hyperresponsiveness gene	2, 13, 15, 17	-	De Sanctis, et al., 1995
Atherosklerose	<i>Ath1 – Ath6</i> Atherogenic gene	1, 5, 7, 12	1, 2	Mu, et al., 1999

Tab. 1: Beispiele für erfolgreich abgeschlossene QTL-Analysen in Mausstämmen

(verändert nach: Hillebrandt et al., 2001).

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der möglichen Manipulation des Mausgenoms.

Medizinisch relevante Phänotypen aus Spontan- oder induzierten Mutationen, wie z.B. der ungerichteten ENU- (Ethyl-Nitrosoharnstoff) Mutagenese (Nadeau und Frankel, 2000; Balling et al., 2000; Belkamp et al., 2001) können auf QTLs hin untersucht werden.

Um die Entdeckung und Identifizierung weiterer QTLs zu erleichtern, wurden die physiologischen Daten (wie z.B. Körpergewicht, Verhaltensmuster, Krankheitsanfälligkeiten, u.a.) von über 50 Inzuchtstämmen in der Mouse Phenome Database (<http://www.jax.org/phenome>) gesammelt und frei zugänglich gemacht. Geeignete Kreuzungen solcher Linien mit anschließender Genotypisierung können die Kartierung von QTLs wesentlich effizienter gestalten (Paigen und Eppig, 2000).

2.2.2.1.1 Verwendung von Inzuchtstämmen

Eine häufig angewendete Methode zum Auffinden und zur Kartierung von QTLs beruht im Wesentlichen auf der reziproken Kreuzung verschiedener Inzuchtstämme (Grisel, JE. 2000; Hillebrandt et al., 2001). In reinen Inzuchten sind alle Tiere

genetisch völlig identisch (homozygot für jedes Merkmal), so dass unter standardisierten Bedingungen keine abweichenden Phänotypen zu beobachten sein sollten. Werden zwei verschiedene Inzuchtstämme miteinander gekreuzt ist die F_1 -Generation ebenfalls genetisch homogen. Allerdings zeigen die Tiere an denjenigen Loci, an denen die Parentalstämme unterschiedliche Allele tragen eine heterozygote Verteilung. Eine sich anschließende Phänotypisierung der F_1 -Generation gibt Aufschlüsse über den Vererbungsmodus. Eine Kartierung der merkmalsassoziierten Gene setzt die Verpaarung der F_1 -Nachkommen zur F_2 -Generation voraus (intercross) oder aber die Rückkreuzung in den sensitiven Parentalstamm (backcross). Zufällig auftretende Rekombinationsereignisse bedingen eine individuelle genetische Ausstattung der einzelnen F_2 -Individuen. Treten variable Merkmalsausprägungen bzw. heterogene Phänotypen innerhalb dieser Generation auf, muss von der Existenz von QTLs ausgegangen werden. Im Fall der *nmd*-Mutation der Maus (neuro muscular degeneration) konnte z.B. ein QTL auf dem Chromosom 13 (Cox et al., 1998), bei der *vibrator* Mutation ein QTL auf dem Chromosom 19 kartiert werden (Hamilton et al., 1997).

Bereits bei zwei merkmalsausprägenden Loci ergibt sich in der F_2 -Generation keine mendelnde, sondern eine quantitative Verteilung, die bei steigender Loci-Anzahl in eine Normalverteilung (Gauß-Verteilung) übergeht (Strachan und Read, 1996).

Neben der genauen Phänotypisierung hinsichtlich des QTLs schließt sich die Genotypisierung interessanter Phänotypen mittels beschriebener Kopplungsanalyse bzw. Intervallkartierung mit entsprechenden Software-Programmen an. Je weiter die eingesetzten Parentalstämme phylogenetisch voneinander entfernt sind, desto höher ist der zu erwartende Polymorphiegrad und in Verbindung damit sind kleinere Kartierungsintervalle möglich.

Mit dieser Methode lassen sich zwar QTLs lokalisieren, aber keine aussagekräftigen Angaben über die Anzahl involvierter QTLs und deren Effektgrößen machen. Zudem sind die kartierten QTL-Intervalle immer noch zu groß (ca. 10-40 cM), um Aussagen über die tatsächlich zugrundeliegenden genetischen Faktoren machen zu können.

Einen Ausweg bieten verschiedene Zuchtstrategien, die im Folgenden kurz vorgestellt werden:

- **Rekombinante Inzuchtstämme (RI-Strains)**

Der Einsatz rekombinanter Inzuchtstämme zur Identifikation von QTLs beruht auf der züchterischen Neukombination von Allelen in einem genetisch homozygoten Hintergrund (Grisel, 2000; Williams, et al., 2001). Generiert werden diese Tiere aus der systematischen Inzucht von rekombinanten F₂-Nachkommen einer Kreuzung. Mit dieser Methode läßt sich eine große Anzahl von RI-Linien ableiten, die sich durch ihre definierten chromosomalen Rekombinationstellen unterscheiden. Jede RI-Linie besitzt demnach einen einzigartigen Satz elterlicher Merkmale, wodurch QTLs in eine Reihe von einzelnen Merkmalen zerlegt und anschließend separat analysiert werden können (Justice et al., 1992). Anunciade et al. (2000) konnten mit Hilfe dieser Strategie QTLs für das Körpergewicht (Chr.1, 6), den Blutinsulinanteil (Chr.1, 3, 10, 17) und den Fettstoffwechsel (Chr. 4, 11) kartieren.

- **Kongene Mausstämme**

Kongene Linien unterscheiden sich genetisch nur an einem einzigen, bekannten Locus. Diese Zuchtstrategie ermöglicht es, einzelne QTLs und deren Effektgrößen und Abhängigkeiten voneinander zu analysieren. Gezüchtet werden kongene Mausstämme, indem ein stammfremder Locus in eine Mauslinie eingekreuzt und über mehrere Generationen in den Rezipientenstamm rückgekreuzt wird (Silver, 1995). Mit dieser Methode konnte z.B. der Diabetes Typ 1 QTL insulin-dependent diabetes (*Idd3*) Locus auf eine chromosomale Region von 780 kb auf dem Chromosom 3 der Maus eingeschränkt werden (Lyons et al., 2000).

Basierend auf diesen Strategien wurden zahlreiche abgewandelte Züchtungen vorgenommen, die zur erfolgreichen Identifizierung weiterer Quantitativer Trait Loci führten (chromosome substitution strain, Nadeau et al., 2000; recombinant congen strains, Symula et al., 1999; van Wezel et al., 1999; outbreed strains, Talbot et al., 1999; Mott et al., 2002).

2.3 Die Mutation *wobbler* der Maus

2.3.1 Pathomechanismen der Wobbler-Erkrankung

Die Mutation *wobbler* (Gensymbol: *wr*, Phänotyp: WR) trat 1955 spontan im Inzuchtstamm *C57BL/Fa* auf (Falconer, 1956). Phänotypisch zeigen die betroffenen Mäuse ab der vierten Lebenswoche den namensgebenden wackeligen Gang. Ausgelöst wird die fortschreitende Atrophie der Vorderextremitäten durch die nekrotische Degeneration von Neuronen ab Tag 13 im Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark (Duchen und Strich et al., 1968; Rathke-Hartlieb et al., 1999). Die Motoneuronen der Vorderhörner des cervikalen und thorakalen Rückenmarks zeigen lichtmikroskopisch eine Volumenzunahme mit einsetzender Vakuolisierung (Andrews et al., 1974), gefolgt von einer Astrozyten- und Mikroglia- Aktivierung (Laage et al., 1988; Rathke-Hartlieb et al., 1999).

Neben der neuronalen Symptomatik zeigt die pleiotrope *wr*-Mutation einen starken Einfluß auf die männlichen Gonaden. Die Spermien zeigen abgerundete Kopfstrukturen und bilden kein funktionsfähiges Akrosom aus (Heimann et al., 1991). Die Mitochondrien sind in Richtung des Spermienkopfes verschoben und den Axonemata fehlen ein bis vier der äußeren Mikrotubuli-Doublers (Leestma und Sepsenwol, 1980). Augustin et al. (1997) konnten eine zellautonome Wirkung des *wr*-Gens in Testis und Rückenmark in Aggregations-Chimären nachweisen.

2.3.2 Zuchtstrategie zur Identifizierung der *wr*-Mutation

Aus der Interspezies-Rückkreuzung zwischen *Mus musculus C57Bl/6J* und *Mus spretus* SEG ((*C57BL/6J-wr* x *SPRET/Ei*); *F1* x *C57BL/6J-wr*) konnte mittels Kopplungsanalysen das *wr*-Gen auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus zwischen dem Erythroblastose Onkogen (*ErbB*) und dem Reticuloendotheliose Onkogen (*Rel*) kartiert werden (Kaupmann et al., 1992). Eine weitere Eingrenzung des Kandidatengenintervalls konnte sowohl durch eine Intraspezies Rückkreuzung mit dem Mausstamm AKR (Wedemeyer et al., 1996; D. Korthaus, Diplomarbeit, 1996) als auch mit der Intraspezies Kreuzung mit dem Mausstamm *CAST/Ei* erreicht werden (V. Schmidt, Diplomarbeit, 1997; M. Ulbrich, Diplomarbeit, 2000).

Innerhalb der *BL6/SPRET-WR*- (Kaupmann et al., 1992) sowie der *BL6/CAST-WR*-Phänotypen konnten bei einigen Individuen verstärkte neurologische Symptome beobachtet werden. Interessanterweise wurde ebenfalls in einigen *BL6/CAST-WR* Tieren eine modifizierende Wirkung auf die Spermatogenese beobachtet. Beide

QTLs, neurologisch «*wrmod1*»; spermiogenetisch «*wrsprm1*», treten völlig unabhängig voneinander auf. Dieses Ergebnis stärkt die Vermutung, dass die *wr*-Mutation nicht auf ein Gen, sondern vielleicht auf zwei unterschiedliche Gene wirkt.

Für die Kartierung des *wr*-Gens schloss sich ein F₂-F₃-Rekombinations-Screening an (V. Schmidt, Diplomarbeit, 1997; Schmitt-John et al., 1999; M. Ulbrich, Diplomarbeit, 2000), bei dem alle rekombinanten heterozygoten (*wr/+*) Wildtypen mit heterozygoten (*wr/+*) F₁ oder F₂-Tieren zur F₃ Generation verpaart wurden (vgl. Abb. 1). Mit dieser Methode lassen sich alle Rekombinationsereignisse innerhalb der F₂-Generation auswerten, nicht nur das Mendel'sche Viertel der erkrankten F₂-Tiere. Für eine möglichst genaue Bruchpunktbestimmung der Rekombinationsereignisse wurde von allen Kandidatengenen, teilweise auch von BAC-Endsequenzen (bakterielles artifizielles Chromosom) Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen generiert (M. Ulbrich, Diplomarbeit, 2000; S. Fuchs, Dissertation 2002).

Basierend auf den Informationen der durchgeführten Kreuzungen (s.o.) wurde eine Positionsklonierung durchgeführt (Korthaus et al., 1996; A. Lengeling, Dissertation 1997). Aufgrund der konservierten Syntanie zwischen Maus und Mensch innerhalb des *wr*-Intervalls und dem humanen Chromosom 2p13, konnten Rückschlüsse auf den Gengehalt, -abfolge und -orientierung der *wr*-Region gezogen werden (Resch et al., 1998; 2001).

2.4 Humane Motoneuronenerkrankungen

Wie eingangs erwähnt, gewinnen Tiermodelle wie z.B. die Maus eine immer größere Bedeutung für die medizinische Erforschung humaner Erbkrankheiten. Die Etablierung dieser Tiermodelle erfolgt entweder über die Verwendung von spontanen Mutationen oder aber von künstlich induzierten Mutanten, die eine pathologisch vergleichbare Symptomatik aufweisen.

Trotz vieler Übereinstimmungen beider Genome trennten sich die Vorfahren von Mensch und Maus vor etwa 75 Millionen Jahren. Unterschiedlich starkem Selektionsdruck ausgesetzt, blieben letztendlich nur ca. 5% der Säugergenome hochkonserviert (Mouse Sequence Consortium 2002), weshalb jedes Modell oft nur gewisse Teilaspekte eines Krankheitsbildes darstellt.

Für neurologische Erkrankungen wie z.B. Alzheimer, Parkinson oder Huntington stehen eine Vielzahl von Mausmodellen zur Verfügung (Hafezparast et al., 2002).

Für degenerative Erkrankungen des motorischen Systems wird z.B. die *wr*-Mutation der Maus (Piro und Mitsumoto, 1995; Green und Tolwani, 1999) herangezogen. Sind bei diesem degenerativen Prozess die ersten und zweiten Motoneuronen (Betz-Zelle und motorische Vorderhornzelle) und die Pyramidenbahnen betroffen, werden sie unter dem Sammelbegriff der Motoneuronenerkrankungen zusammengefasst (Ludolph, 1999). Hierzu zählen sowohl die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS; MIM 105400) wie auch die spinale Muskelatrophie (SMA; MIM 253300).

Die spinale Muskelatrophie ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und tritt mit einer Inzidenz von 1 auf 10.000 Neugeborenen auf (Pearn, 1978). Je nach Verlauf und Symptomatik werden drei SMA-Formen unterschieden (Munsat und Davies, 1992). Vermutlich führen Mutationen im survival of motoneuron (SMN1) Gen, (Lefebvre et al., 1995) dessen Produkt in hoher Konzentration in Motoneuronen vorliegt (Liu und Dreyfuss, 1996), zu unphysiologischen RNA-Splicevarianten (Pellizzoni et al., 1998).

Die Amyotrophe Lateralsklerose tritt mit einer Inzidenz von 0,2 bis 2 Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen (Rowland, 1994) auf. Bei 10-20% der erbten familiären ALS (FALS 1) konnten Mutationen im Gen für die Cu/Zn-Superoxid Dismutase (SOD1) nachgewiesen werden, das in der Zelle die Umsetzung von O_2^- Sauerstoffradikalen in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff katalysiert (Rosen et al., 1993; Bachus et al., 1997).

Neben der *wr*-Mutation existieren noch drei weitere spontane Mausmutanten für motorische Systemdegenerationen, die in Tab. 2 zusammenfassend dargestellt sind.

Mausmodell	Mutation/ Lokalisierung	Krankheitsbeginn	Lebenserwartung	Neuropathologie	Literatur
<i>mnd</i> -Maus (motor neuron degeneration)	Gen unbekannt Chr. 8	5-11 Monate	normal	Lysomale Speicherkrankheit	Messer et al., 1986
<i>wasted</i> -Maus	Eef1a2 (eukaryotic elongations faktor 1A-2) Chr.2	4-10 Tage	28 Tage	Vakuolen	Chambers et al., 1998
<i>pmn</i> -Maus (progressive motor neuropathy)	Tbce (Tubulin-specific chaperone E gene) Chr.13	3 Wochen	6-7 Wochen	Chromatolyse	Martin et al., 2002

Tab.2. Mausmodelle für humane Motoneuronenerkrankungen

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die aus der o.g. Intraspezies-Zucht hervorgegangenen modifizierten Wobbler-Tiere mit schwerem neurologischen Phänotyp sollten molekularbiologisch und histochemisch charakterisiert werden, um eine Klassifizierung in Subphänotypen zu ermöglichen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die bereits von verschiedenen Arbeitsgruppenmitgliedern initiierte genomweite Kopplungsanalyse zur Kartierung möglich involvierter „Quantitative Trait Loci“ (QTL) fortgeführt.

Mit einer sich anschließenden Feinkartierung und der Überprüfung der Kartierungsdaten durch die Etablierung einer partiell kongenen Linie sollten möglichst kleine Kandidatengenintervalle generiert werden, um letztendlich Kandidatengene identifizieren zu können, die einen modifizierenden Einfluss auf den WR Phänotyp ausüben können.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mausstämme

3.1.1.1 *Mus musculus C57Bl/6J*

Die primären Mauslinien B6 und C57 stammen, wie RFLP-Analysen mitochondrialer DNA zeigen, von einem Weibchen der Unterart *Mus musculus domesticus* ab, deren Hauptverbreitungsgebiet sich über West- und Südeuropa erstreckt (Beck, et al., 2000). Erste Züchtungen wurden vermutlich von Abbie E. C. Lathrop um 1900 in Massachusetts durchgeführt. Unter standardisierten Bedingungen wurde dieser Inzuchtstamm jedoch vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA etabliert. Bezogen wurden die Tiere vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht GmbH, Hannover.

3.1.1.2 *Mus musculus C57Bl/6J-wr*

Der Mausstamm ist Träger der 1955 spontan aufgetretenen *wobbler*-Mutation (Falconer et al., 1956). Die Zuchttiere stammen aus dem Labor von R. Sidman des Childrens Hospital, Harvard Medical School, Boston und wurden 1980 der Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Da die Mutation homozygot zu vermehrungsunfähigen Tieren führt, kann das betreffende Allel nur über Heterozygotenverpaarung in der Mauszucht gehalten werden.

3.1.1.3 *Mus musculus castaneus*

Dieser Inzuchtstamm wurde 1996 vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA bezogen und als geschlossene Kolonie am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie in Bielefeld gehalten. Durch ihre isolierte geographische Verbreitung (Südost-Asien, Japan) ist ein hoher Polymorphiegrad im Genom bekannt.

3.1.1.4 *Mus musculus C57Bl/6J-mdf*

Der Mausstamm *C57Bl/6J-mdf* wird als eigene Zucht am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie in Bielefeld gehalten.

3.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Gibco BRL, Eggenstein und MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

Bezeichnung	T _A (°C)	Sequenz (5'-3')	Referenz
Primer für die Sequenzanalyse			
NFM 1	63	ATGAGCTACACGCTGGACTC	
NFM 2	63	GTCCAGCTCCACCTTAACCA	
NFM 3	63	TCAAGGAGCGCTTCGAGGAG	
NFM 5.1	63	ACTTGGTTCCCCGAAGTTCA	
NFM Int C	60	GCAAGTGTCTTGTGAAGG	
NFM Int D	60	TAGCCACTCCCAGTAGACAA	
NFM Int D1	63	TTGTCTACTGGGAGTGGCTA	
NFM 8	63	CTTCCTTCTTGGACTCCTGC	
NFM 9	60	ATCACCATCAGCAAGTCGGT	
NFM 10.1	60	ACCTTTTGCAACGGACTCCGAT	
NFL Int 1A	60	TCAGAGTCCCGGCGTATA	
NFL 2	60	TGCAGGTTGCGCAGAGTCT	
NFL 3	60	CGCCACTAACGAGAAGCA	
NFL Int 1B	60	GCGTTCACTCTCTGGGTACA	
NFL Int 2A	58	CTGGAAGGTGTACACTTTGG	
NFL Int 2B	58	GGCTGGATGTGTTTCATTGCT	
NFL Int 3A	58	GCCTTTGAGGTTGGTTGTAG	
NFL Int 3B	58	GCCTGCATAGGTCATGGATC	
NFL Int 4A	60	AGCCCACAAAGCCTCAGTAG	
NFL Int 4B	60	TGCACATAACTCGAGGTC	
Primer für die Expressionsanalysen			
AChR- α A1	62	CATCAACACACACCACCGTTTCG	Sedehizade et al., 1997
AChR- α A2	62	GGAAGCAAAGGGGAGACACTTC	Sedehizade et al., 1997
L7 A	62	AGATGTACCGCACTGAGATTC	Vullhorst et al., 1998
L7 B	62	ACTTACCAAGAGACCGAGCAA	Vullhorst et al., 1998
NFL 3	60	CGCCACTAACGAGAAGCA	
NFL 2.1	60	CAGCACTTCTTCCTCATAGCG	
NFL 5	60	TCTGGAGAAGCAGCTGCAGG	
NFL 4.1	60	GCTTCTCAGCTCATTCTCCAG	
NFL 7	60	GGAGACCATTGAGGCTACG	
NFL 8	60	CACATTGCCATAGATCCTG	
NFM 4	60	CCAGGGCCATCTTGACGTTA	

NFM 5	60	TGAACTTCGGGGAACCAAGT	
NFM 6	60	CCTTGACAGCCACTTCCTCA	
NFM 7	60	ACCGAGGCAGAAGGTGAAGGA	
NFM 8	60	CTTCCTTCTTGGACTCCTGC	
NFM 9	60	ATCACCATCAGCAAGTCGGT	
HPRT A	60	CCTGCTGGATTACATTAAAGCACT G	Pernas-Alonso et al., 1996
HPRT C	60	GACTGATCATTACAGTAGCTC	
Primer für die Deletionskartierung			
NFM 12	60	CATGCATTCAATCTGGCTAG	
NFM Int D2	60	TAGCCACTCCCAGTAGACAA	
Fluoreszenz-markierte Primer			
AchR- α 1Fi		CATCAACACACACCACCGTTTCG	
AChR- α 2		GGAAGCAAAGGGGAGACACTTC	
L7 1Fi		AGATGTACCGCACTGAGATTC	Vullhorst et al., 1998
L7 2		ACTTACCAAGAGACCGAGCAA	

3.1.2.1 Verwendete Mikrosatelliten

Die Sequenzen der Mikrosatellitenmarker wurden der *MIT*-Datenbank (<http://www-genome.wi.edu>) entnommen.

Mikrosatelliten (Interval Haplotype Analysis)

Marker	Position (cM)	T _A (°C)	Fragment (bp) <i>M.m. Castaneus</i>	Fragment (bp) <i>M.m.C57Bl/6J</i>	Differenz (bp)
<i>D1Mit372</i>	9,8	62	132	124	8
<i>D1Mit386</i>	60,1	62	86	96	10
<i>D1Mit386</i>	60,1	62	86	96	10
<i>D1Mit155</i>	115,8	58	216	252	36
<i>D2Mit464</i>	10,9	58,5	134	126	8
<i>D2Mit15</i>	49,2	60	175	142	33
<i>D2Mit15</i>	49,2	60	175	142	33
<i>D2Mit504</i>	91,8	60	236	194	42
<i>D3Mit204</i>	9,8	58,5	196	192	4
<i>D3Mit147</i>	59	58,5	120	132	12
<i>D4Mit98</i>	10,9	58,5	164	168	4
<i>D4Mit160</i>	71	62	169	189	20
<i>D5Mit1T251</i>	8,7	62	116	134	18
<i>D5Mit189</i>	60,1	64	155	145	10

D6Mit74	10,9	58,5	182	150	32
D6Mit110	63,9	60	131	139	8
D7Mit55	12	61,4	162	150	12
D7Mit371	53,6	58,5	144	124	20
D8Mit356	8,7	58,5	509	247	262
D8Mit200	60	60	233	197	36
D9Mit66	12	58,5	180	124	56
D9Mit184	60,1	64	128	136	8
D10Mit124	8,7	58,5	131	143	12
D10Mit73	62,3	58,5	104	86	18
D11Mit19	10,9	60	164	140	24
D11Mit100	71,1	58,5	126	122	4
D12Mit136	9,8	58,5	165	147	18
D12Mit79	50,3	58,5	132	154	22
D13Mit18	7,7	58,5	214	196	18
D13MitT77	53,6	58,5	300	280	20
D14Mit222	10,9	64,2	134	118	16
D14Mit103	44	60	124	148	24
D15Mit131	10,9	60	162	137	25
D15Mit96	49,2	58,5	134	140	6
D16Mit165	10,9	58,5	161	171	10
D16Mit191	45,9	58,5	152	122	30
D17Mit34	9,8	58,5	154	148	6
D17Mit94	40,4	58,5	126	150	24
D18Mit147	9,8	58,5	176	152	24
D18Mit196	39,3	58,5	97	117	20
D19Mit129	10,9	58,5	84	114	30
D19Mit1	43,7	58,5	136	121	15

Mikrosatelliten Chromosom 13

Marker	Position (cM)	T _A (°C)	Fragment (bp) <i>M.m. Castaneus</i>	Fragment (bp) <i>M.m. C57Bl/6J</i>	Differenz (bp)
D13Mit306	3,3	61	179	153	26
D13Mit18	7,7	58,5	214	196	18
D13Mit19	14,2	61	172	150	22
D13MitT27	29,5	58	186	202	16
D13Mit108	33,9	61	163	138	25
D13Mit77	53,6	58,5	300	280	20

Mikrosatelliten Chromosom 14

Marker	Position (cM)	T _A (°C)	Fragment (bp) <i>M.m. Castaneus</i>	Fragment (bp) <i>M.m.C57Bl/6J</i>	Differenz (bp)
D14Mit179	2,2	58	174	148	36
D14MIT222	10,9	64	142	126	16
D14Mit253	12,0	58	154	122	32
D14Mit45	19,7	63,5	140	106	34
D14Mit152	24,0	58	113	126	13
D14Mit154	30,6	58	113	131	18
D14Mit37	36,1	58	72	136	64
D14Mit59	38,3	58,5	173	143	30
D14Mit24	40,4	58,5	156	140	16
D14Mit103	44,0	58	124	148	24
D14Mit68	45,9	58,5	136	151	15
D14Mit160	47	58,5	160	141	19
D14Mit224	49,2	58	152	116	36
D14Mit263	52,5	63,5	106	122	16
D14Mit105	59,0	63,5	188	147	41
D14Mit94	61,2	58	79	107	28
D14Mit197	62,3	61	124	94	30
D14Mit9	63,4	63,5	244	237	7
D14Mit131	66,7	61	88	108	20
D14Mit266	67,8	61	156	148	12
D14Mit107	69,9	55,5	178	150	28

Mikrosatelliten Chromosom 17

Marker	Position (cM)	T _A (°C)	Fragment (bp) <i>M.m. Castaneus</i>	Fragment (bp) <i>M.m.C57Bl/6J</i>	Differenz (bp)
D17Mit34	9,8	58,5	154	148	6
D17Mit66	19,7	58	112	132	20
D17Mit86	27,3	58	125	151	26
D17Mit94	40,4	58,5	126	150	24

3.1.2.2 Diagnostische Marker**Mikrosatelliten**

Marker	Position (cM)	T _A (°C)	Fragment (bp) <i>M.m. Castaneus</i>	Fragment (bp) <i>M.m.C57Bl/6J</i>	Differenz (bp)
D11Mit19	13	60	164	140	24
D11Mit294	12	60	87	117	30

<i>D11Mit343</i>	11	64	120	108	12
<i>D14Mit253</i>	12,0	58	154	122	32
<i>D14Mit154</i>	30,6	58	113	131	18
<i>D14Mit224</i>	49,2	58	152	116	36
<i>D14Mit94</i>	61,2	58	79	107	28

Gene

Bezeichnung	T _A (°C)	Sequenz (5' - 3')	Referenz
Cct4 A	60	TCATCGATTTTCAGAATGCTCCGC	Rathke-Hartlieb et al. 1999
Cct4 B	60	TCAGAATAAAGATGATGCCATGGG	Rathke-Hartlieb et al. 1999
NFM 12	60	CATGCATTCAATCTGGCTAG	
NFM Int D1	60	TTG TCT ACT GGG AGT GGC TA	

3.1.3 Erst-und Zweitantikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung	Blocken	Bezugsquelle
GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein	monoklonal, Maus, Cy3 konjugiert	1:150 in 0,5% BSA	mit 0,5 % BSA, 1h	Sigma, Taufkirchen
MAP2 Microtubuli assoziiertes Protein 2	monoklonal, Maus,	1:200 in 0,5% BSA	mit 0,5 % BSA, 1h	Sigma, Taufkirchen
NF-M Neurofilament mittlere Kette	monoklonal Maus	1.20 in 0,5 % BSA	mit 0,5 % BSA, 1h	Sigma, Taufkirchen
CD45 LCA, LY1 Oberflächenantigen von Leukozyten und Mikroglia	monoklonal Maus	1:100 in 0,5 % BSA	mit 0,5 % BSA, 1h	Pharmingen, Hamburg

Als Zweitantikörper wurden Ziegen Anti-Maus IgG (1:200, Dianova, Hamburg, Germany) konjugiert mit Cy3 oder Hasen Anti-Maus IgG (1:200, Dianova) konjugiert mit Cy2 verwendet.

Für die Analyse des Spermatogenese-Modifiers wurde ein mit Rhodamin konjugierter Peanut Agglutinin-Ligand verwendet (Sigma).

3.1.4 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Taq-DNA-Polymerase	Gibco, BRL
ThermoZyme™ DNA-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNase	Boehringer, Mannheim

3.1.5 Verwendete Bausätze (Kits)

Bezeichnung	Bezugsquelle
Omnisript RT-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR-Green PCR-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Quiaquick PCR-Purifikation Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Genomic tip	Qiagen GmbH, Hilden
Taq PCR-Master-Mix	Qiagen GmbH, Hilden

3.1.6 Restriktionsenzyme

Restriktionsendo- nukleasen	Erkennungssequenz (5' - 3')	Bezugsquelle
<i>AluI</i>	AG/CT	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HinI</i>	G/ANTC	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>SdI</i>	GDGCH/C	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.7 Fragmentlängenstandards für Agarosegele

Abhängig von der Fragmentgröße wurden folgende Längenstandards der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot bei Gelelektrophoresen aufgetragen:

φX174 Hae III-Restriktionsfragmente	von 72 bis 1353bp
Gene Ruler™ 100bp Ladder Plus (SMO 321)	von 100 bis 3000bp
Gene Ruler™ 100bp Ladder (SMO 241)	von 80 bis 1000bp
Gene Ruler™ 100bp Ladder (SMO 331)	von 100 bis 10000bp

3.1.8 Verwendete Datenbanken / Internetadressen

Bezeichnung	Anwendung	Adresse (http//.....)
Webcutter	Erstellen von Restriktionskarten	www.dedkem.gu.se/cutter
BCM search launcher	Verschiedene Möglichkeiten der DNA / Protein -Analyse	searchlauncher.bcm.edu
Jackson Laboratory Homepage	Allg. Informationen (z.B. Mikrosatelliten)	www.jax.org
NCBI Homepage	Allgemeine Informationen & links	www.ncbi.nlm.nih.gov
Blast	Sequenzvergleiche	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Pub-Med	Literaturrecherche	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
OMIN (Online Mendelian Inheritance of Man)	Informationen zu Erbkrankheiten	www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIN
Ensemble-Browser	Allgemeine Informationen draft Sequenz	www.ensembl.org

3.2 Methoden:

3.2.1 Kreuzungsstrategie zur Identifizierung des *wr*- und *wrmod1* locus

Für die intraspezies Kreuzung *Mus musculus C57BL/6J-wr* x *Mus musculus castaneus* wurden heterozygote *C57Bl/6J (wr/+)* mit homozygoten *Cast/Ei* Wildtyptieren (+/+) zur F₁ Generation verpaart. Der heterozygote Allelzustand im Kandidatengenbereich wurde im *C57Bl/6J*-Hintergrund mittels der *Cct4*-Diagnostik bestimmt (Rathke-Hartlieb et al., 1999), wodurch aufwendige Rückkreuzungen nicht durchgeführt werden mussten. Alle heterozygoten F₁-Tiere (*Bl6/Cast-wr/+*) wurden zur weiteren Zucht eingesetzt, bzw. die Nachkommen zur Einengung des Kandidatenintervalls analysiert (vgl F₂F₃- Rekombinationscreening Abb. 1).

Die neurologisch modifizierten Wobblers (Genotyp *wrmod1*, Phenotyp WR*) wurden mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern genotypisiert und mit dem „Interval Haplotype Analysis“ Programm von D. Beier und I. Neuhaus (1998) die relevanten QTLs lokalisiert. Der QTLs mit der jeweils höchsten prozentualen Kopplung wurde feinkartiert. Die weitere Eingrenzung des QTLs erfolgte mit Hilfe einer partiell kongenen Mauszucht (vgl. Abb. 1). Über heterozygote *BL6/Cast*-Hybride (*wr/+*) wurden der entsprechenden QTL über mehrere Generationen in den sensitiven *C57Bl/6J (wr/+)* Parentalstamm eingezüchtet. Wird aufgrund der Selektion, bei gleichzeitiger Ausdünnung des genomischen *castaneus* Anteils (pro backcross 50%), eine signifikante Erhöhung stark neurologisch modifizierter Wobblers (WR*) erreicht, ist in diesem chromosomalen Abschnitt ein modifizierender genetischer Faktor lokalisiert.

Über die Verpaarung von Tieren mit Rekombinationen innerhalb des Kartierungsintervalls kann die chromosomale Region, wie im Fall der *wr*-Kartierung, weiterhin eingegrenzt werden. Finden sich Gene innerhalb dieser Region, die bereits mit vergleichbaren Erkrankungen bei Tier oder Mensch assoziiert sind, können diese als physiologische und positionelle Kandidaten für den QTL vorrangig mit verschiedenen molekulargenetischen Methoden analysiert werden.

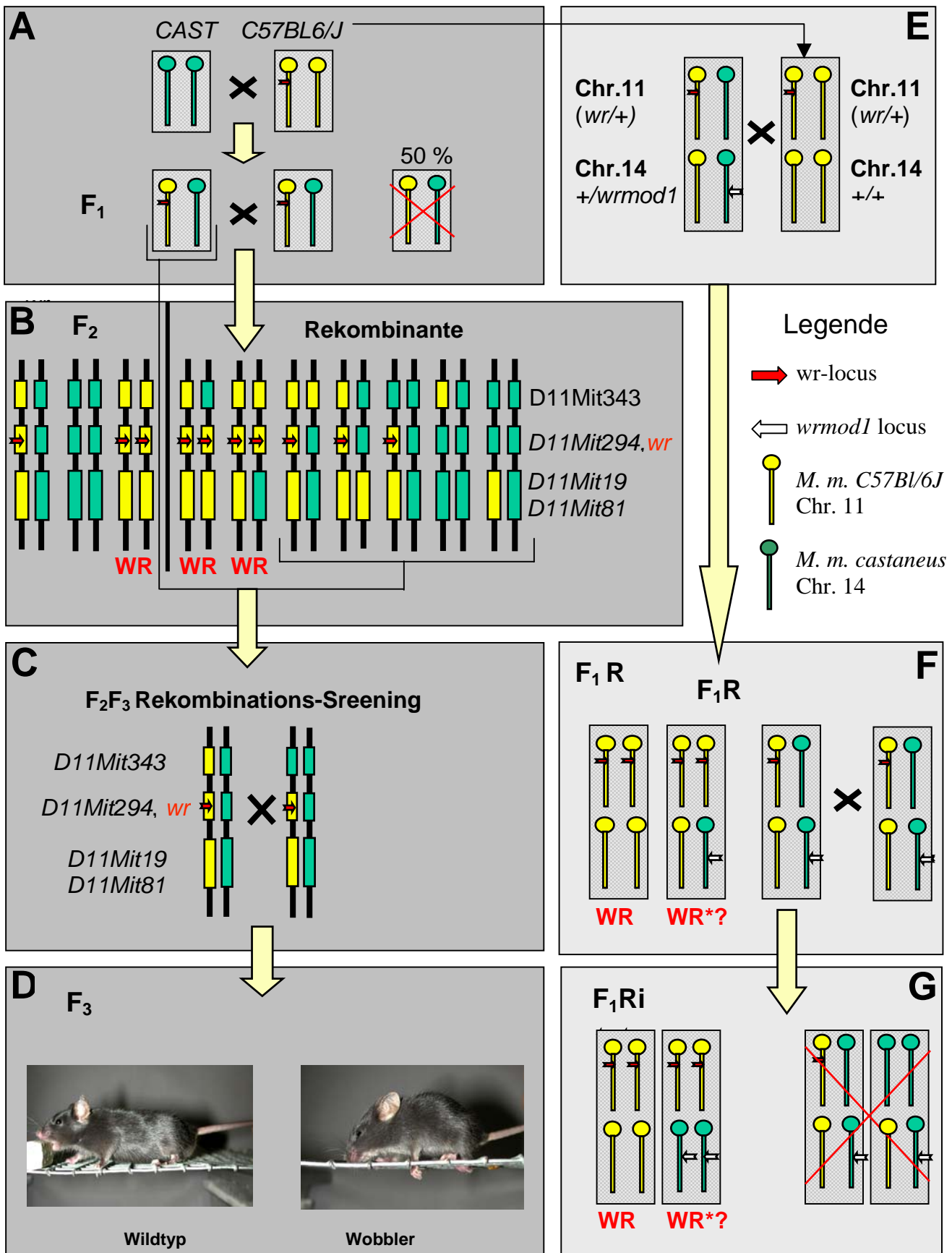


Abb.1: Kreuzungsstrategien zur Identifizierung der *wr*-Mutation bzw. des *wrmod1*-locus (erweitert nach: Schmitt-John et al., 1999)

In der Abbildung 1 sind nur die jeweils relevanten Chromosomen (Chr.11 und Chr.14) der Maus dargestellt. *Bl6/Cast*-Hybride, die aufgrund ihres Allelstatus in der weiteren Zucht keine Verwendung fanden, sind mit einem roten Kreuz durchgestrichen.

F₂F₃-Rekombinations-Screening (BOX A – D)

A: Intraspezies Kreuzung der Parental-Inzuchtstämme *Mus musculus C57Bl/6J (wr/+)* mit *M. m. castaneus* Wildtyp-Mäuse (+/+) zur F₁-Generation. Heterozygote F₁ Hybride (*Bl6/Cast-wr*), die die *wr*-Mutation tragen, wurden untereinander zur F₂ verpaart.

B: Der Allelstatus der F₂-Individuen, bzw. die verwendeten polymorphen genetischen Marker der *wr*-Region auf dem proximalen Chromosom 11 wurden repräsentativ durch die Diplotypen-Schemata dargestellt. Die generierten F₂ WR- sowie die WT-Mäuse mit einem kompletten Bl6- und einem rekombinanten Chromosom (Bruchpunkt innerhalb des Kandidatengenintervalls) sind direkt informativ.

C: Für das Rekombinations-Screening müssen alle phänotypisch gesunden, rekombinanten F₂ Individuen mit heterozygoten F₁- oder F₂-Tieren (*wr/+*) zur F₃-Generation verpaart werden.

D: Das Rekombinationsereignis kann dann über den Phänotyp einer bestimmten Allelkombination ausgewertet werden.

kongene Zuchtstrategie (BOX E – G)

E: Zur Verifizierung der *wrmod1*-Kartierungsdaten wurden die heterozygoten F₁ Elterntiere (*wr/+; wrmod1/+*) von schwer betroffenen WR*-Hybriden mit sensitiven Mäusen des *C57BL/6J*-Inzuchtstammes zur ersten backcross-Generation (F₁R) verpaart.

F: Die generierten Wobblers wurden exakt phänotypisiert und auf vermehrt auftretende WR*-Phänotypen untersucht. Um WR-Mäuse mit homozygoten *wrmod1*-Allelstatus zu züchten wurden die heterozygoten F₁R-Geschwistertiere (*wr/+; wrmod1/+*) untereinander in einem intercross zur F₁Ri Generation verpaart oder aber im zweiten backcross-System eingesetzt.

G: Die F₁Ri Mäuse wurden wiederum auf WR*-Phänotypen mit verstärkter neurologischer Symptomatik hin untersucht.

Mit jeder Rückkreuzung wird der genomische *CAST/Ei*-Anteil um 50% ausgedünnt (bis auf den selektionierten *wrmod1*-Locus), so dass bereits nach drei Generationen der Phänotyp durch ca 87,5% der *C57Bl/6J* Allele definiert wird. Der Übersicht halber wurden in der Abbildung 1 nicht alle möglichen Diplotypen aus den beschriebenen Kreuzungen dargestellt.

3.2.2 „Interval Haplotype Analysis“ Programm (Neuhaus und Beier, 1998)

Für die Kartierung des neurologischen Modifiers wurde das von Neuhaus und Beier entwickelte „Interval Haplotype Analysis“ Programm verwendet.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 DNA-Methoden

3.2.3.1.1 Isolierung von DNA aus Maus-Schwanzspitzen

Die einer Maus abgeschnittene Schwanzspitze (ca. 0,5 cm) wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 300 µl 1x PCR-Puffer (1 mM Tris-HCl, 5 mM KCL), 0,45 % NP 40 und 0,45 % Tween 20 zur Extraktion der DNA überschichtet. In dieser Lösung wurde die Schwanzspitze mit einer Schere in kleinstmögliche Teile zerschnitten und nach Zugabe von 5 µl einer 20 mg/ml Stammlösung Proteinase K über Nacht bei 55° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 95° C erhitzt, um die Proteinase K zu denaturieren. Nach 10 sec Zentrifugation wurde 1 µl dieses Ansatzes für die Amplifikation kleiner PCR-Produkte eingesetzt. Die Lagerung der DNA-Proben erfolgte bei 4° C im Kühlschrank.

3.2.3.1.2 Isolierung von DNA aus Mausgeweben (Boehringer)

Die DNA wurde aus Lungen- oder Nierengewebe gewonnen. Nach der Präparation wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Pistill in einem Mörser zerkleinert (vorgekühlt in flüssigem N₂). Das pulverisierte Gewebe wurde in 4 ml DNA-Extraktionspuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS pH 8,0) aufgenommen und nach Zugabe von 0,1 mg/ml Proteinase K bei 55° C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal bei Raumtemperatur extrahiert:

- 4 ml Phenol für 2,5 h
- 4ml Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) für 1,5 h
- mit 4ml Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) für 0,5 h

Die Proben wurden für den Extraktionsschritt an einem senkrecht aufgestellten Plattenspieler befestigt und bei 45 Umdrehungen pro Minute rotiert. Jedem Teilschritt

folgte eine 10-minütige Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge, Typ Rotana S) bei 4500 rpm. Die wässrige Phase wurde mit einer abgeschnittenen 1 ml Eppendorf-Pipettenspitze (minimale Scherung der DNA) abgenommen und in ein 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Fällung erfolgte nach dem letzten Extraktionsschritt mit dem halben Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und dem doppelten Volumen Ethanol (vorgekühlt auf -20° C). Anschließend wurde die Probe vorsichtig invertiert und 10 min bei 4500 U/min zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 3 ml 70%-igem Ethanol (vorgekühlt auf -20° C) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 2 ml TE - Puffer (10 mM Tris-Cl pH 7,6 und 1 ml EDTA) aufgenommen und eine Woche bei 4° C auf einer Wippe durch langsames Invertieren gelöst. Die Lagerung der aufgereinigten DNA erfolgte bei 4° C im Kühlschrank.

3.2.3.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe (Qiagen Genomic tip)

Bei dieser Methode entfällt die Phenol/Chloroform-Extraktion durch die Aufreinigung über eine Säule, an deren Matrix DNA bindet und Proteine abgewaschen werden. 20 mg tiefgefrorenes Gewebe wurde in ein 20/G-Röhrchen von Qiagen überführt und mit 2 ml G2 Puffer und 4 µl RNase A stock solution (100 mg / ml) versetzt. Anschließend wurde die Probe 1 min homogenisiert (Homogenisator, Typ Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel), mit 100 µl Proteinase K (20 mg / ml) versetzt und über Nacht bei 50° C im Wasserbad inkubiert. Das Lysat wurde 10 min bei 6500 rpm (Sorvall GS2-Rotor, 4° C) in einem SS34-Röhrchen zentrifugiert, das Pellet in 1 ml QC-Puffer resuspendiert und in die vorher mit 1 ml QTB-Puffer equilibriert Quiagen-Säulen überführt. Vorhandene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit jeweils 1ml QC-Puffer entfernt. Die Elution der DNA in ein SS34-Röhrchen erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 1 ml QF-Puffer (vorgewärmt auf 50° C). Die DNA wurde durch Zugabe von 1,4 ml Isopropanol gefällt (leicht invertieren, bzw. 5 min auf Eis) und für 15 min bei 6500 rpm (Sorvall GS2-Rotor, 4° C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol entsalzt. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation (6500 rpm, Sorvall GS2-Rotor, 4° C) wurde das Pellet luftgetrocknet, in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 7,6, und 1 ml EDTA) aufgenommen und für 2 h bei 55° C auf dem Schüttler gelöst.

Puffer	Verwendung	Zusammensetzung
Puffer G2	Lysierung	800 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM EDTA, 0,5% Tween-20, 0,5 % TritonX-100
Puffer QBT	Equilibrierung	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol; 0.15 % TritonX-100
Puffer QC	Waschung	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15 % Isopropanol;
Puffer QF	Elution	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5; 15 % Isopropanol

3.2.3.2 RNA-Methoden

3.2.3.2.1 RNA-Isolierung aus Mausgeweben (Chomczynski und Sacchi, 1987)

Für die RNA-Isolierung wurde je 100 mg frisch präpariertes Mausgewebe mit 1 ml GTC-Denaturierungslösung (4 M Guanidinium-Thiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7,0, 0,5 % Na-Sarcosyl (v/v), 0,1 M β -Mercaptoethanol) versetzt, für 1 min im Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Homogenat mit wassergesättigtem Phenol (1 ml/100 mg), 200 μ l CHCl_3 /Isoamylalkohol (49/1) und mit 100 μ l 2 M Na-Acetat pH 4 versetzt und kräftig geschüttelt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm in der Kühlzentrifuge (4° C) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Greiner-Röhrchen überführt. Gefällt wurde die Probe mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol und einer Inkubation von 15 min bei -70° C. Anschließend erfolgte die Sedimentation der RNA unter gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 700 μ l Denaturierungslösung resuspendiert. Die Lösung wurde mit 700 μ l eiskaltem Isopropanol versetzt, erneut bei -70° C für 15 min gefällt und bei 13.000 rpm in der Eppendorfzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 μ l 70 % EtOH gewaschen und das Pellet luftgetrocknet. Die Proben wurden in 200 μ l DEPC- H_2O aufgenommen und in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei 65° C für ca. 10 min gelöst.

3.2.3.2.2 Kontroll-RNA-Gele

Um die Qualität isolierter RNA abschätzen zu können wurden RNA-Minigele angefertigt. Die Gelkammern wurden zur RNase-Dekontamination für eine halbe Stunde mit 3 % H_2O_2 behandelt und danach kurz in DEPC- H_2O gespült. Für ein 1 %-

iges Gel wurden 0,3 g Agarose in 3 ml 10 x MOPS-Puffer (0,2 M 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure pH 7,0, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH 7,0) und 27 ml DEPC-H₂O eingewogen und unter Aufkochen gelöst. Nach der Erstarrung wurde das Gel mit 1 x MOPS überschichtet.

Die RNA-Proben wurden folgendermaßen vorbereitet:

1 bis 2 µg RNA werden in 9 µl RNA -Probenpuffer (50 % Formamid, 10 % 10 x MOPS, 0,45 % Formaldehyd, 7 % Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugesetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 65° C denaturiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe sofort auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 10 V/cm bis die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreicht hatte.

3.2.3.2.3 Große, denaturierende RNA-Gele

1,25 g Agarose wurden für ein großes RNA-Gel in 12,5 ml 10 x MOPS und 108,8 ml DEPC-H₂O eingewogen und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 50° C wurden 6,38 ml Formaldehyd hinzugefügt. Anschließend wurden 10-20 µg RNA lyophilisiert, in 20 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen und mit 2 µl EtBr (1 mg/ml) versetzt. Nach 15 bis 30 minütiger Denaturierung bei 65° C und 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe direkt auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 70 V für 4 h.

3.2.3.2.4 Reverse Transkription

Um Transkripte in der PCR untersuchen zu können musste die RNA durch eine RNA-abhängige DNA Polymerase (reverse Transkriptase) in eine „copy DNA“ umgeschrieben werden. Dieser auch als reverse Transkription (RT) beschriebene Vorgang wurde mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als Template wurden 1 bis 2 µg Gesamt-RNA bzw. 100 ng mRNA in 10 µl DEPC-H₂O pipettiert und in 10 µl des folgenden Mastermixes überführt.

- 1 µl Rnasin, 1 : 4 verdünnt (Promega)
- 0,5 µl polyT-Primer (0,5 µg/µl)
- 2 µl RT-Puffer
- 2 µl dNTPs (5µM)

- 1 µl Omniscript (4 units/µl)
- 3,5 µl DEPC-H₂O

Anschließend wurde die Probe bei 37°C für 60 min inkubiert. Für die PCR wurden 1 bis 2 µl des RT-Ansatzes eingesetzt.

3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Die Extinktion (optische Dichte) von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, wenn die Schichtdicke der Quarzküvette 1 cm beträgt (Sambrook et al., 1989). Mit einer zusätzlichen Messung der optischen Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) und dem Quotienten aus OD 260 / 280 wurde der Reinheitsgrad der Probe bestimmt. Bei einem Quotienten von unter 1,8 liegt die DNA in unzureichender Reinheit vor.

3.2.4.4 Restriktionsspaltung von DNA

Die von der Firma Fermentas empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen wurden für jede Restriktionsspaltung eingehalten. Definitionsgemäß spaltet eine Unit Enzym 1 µg DNA pro Stunde.

3.2.3.5 Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

In einem Spannungsfeld lassen sich DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphodiesterbrücken auftrennen. Unter Spannung ist die Laufgeschwindigkeit - und damit die zurückgelegte Wegstrecke des Moleküls - umgekehrt proportional zur Länge der Nukleinsäure-Fragmente. Große Fragmente tragen zwar mehr negative Ladungen, die Gelmatrix (Agarose von Gibco, BRL) wirkt aber als Molekularsieb und behindert die Wanderung größerer Fragmente. Das elektrische Feld wirkt stets in senkrechter Orientierung zum Agarosegel.

Die Agarose, ein lineares Polysaccharid (D-galactose / 3,6-Anhydrose-L-galaktose), wurde in TBE-Puffer (0,089 M Tris-Cl, pH 8; 0,089 M Borsäure; 20 mM EDTA) durch einmaliges Aufkochen gelöst. Die aufzutrennende DNA wurde mit BPB-Probenpuffer (6 x Probenpuffer: 0,025 % Xylen Cyanol; 40 % (w/v) Saccharose in H₂O) versetzt und in die Taschen des auspolymerisierten Gels pipettiert.

Agarose (w/v)	Fragmentgröße (Bp)	Spannung (V)	Laufzeit
1,0 %	2000-500	80	1 h
2,0 %	500-100	80	1 h
4,0 % NuSieve	300-10	80	0,45 h

3.2.3.6 Ethidiumbromid-Färbung

Ethidiumbromid ist ein den Acridinen strukturverwandter Fluoreszenzfarbstoff, dessen flaches Ringsystem zwischen den Basenpaaren der DNA interkaliert. Kurzwelliges UV-Licht (254 - 260 nm) wird von Nukleinsäuren absorbiert und auf den Farbstoff übertragen, längerwelliges UV-Licht (302 -360 nm) wird direkt absorbiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA in ein Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) eingebracht, für 10 min gefärbt und auf dem Transilluminator zur Fluoreszenz angeregt. Mit einer Polaroid-Kamera (Cü-5; Positiv-Negativ-Film 667) wurden die entsprechenden Gele abgelichtet.

3.2.3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das grundlegende Prinzip der PCR Methode (Polymerase Chain Reaktion nach Saiki et al., 1985, 1988) ist die exponentielle Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments von einer genomischen DNA-Matrize. Den Startpunkt der Reaktion bildet ein thermisch (94° C) denaturierter DNA-Strang, dem zur Amplifikation antiparallele Primer (Oligonukleotide) im Überschuss zugesetzt werden. Deren Sequenzen sind so gewählt, dass sie zu der gewünschten Fragmentsequenz komplementär sind. Nach dem Denaturierungsschritt wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und die Primer lagern sich jeweils an einen der komplementären DNA-Stränge an. Die freien 3' OH-Enden der Primer bilden das Substrat für die DNA-Polymerase, die in Gegenwart aller vier dNTP's mit der in vitro-Elongation beginnen kann. Da das 3' Ende durch den Primer des vorherigen Syntheszyklus begrenzend festgelegt ist, entsprechen exponentiell immer mehr DNA-Kopien dem gewünschten Fragment. Die Zahl der DNA-Stränge deren 3'Ende nicht festgelegt ist, steigt dagegen nur linear. Die Kettenreaktion läuft vollautomatisiert in einem "Cycler" (TRIO-Block PCR-

Maschine, Biometra, Göttingen) ab und liefert mehrere Mikrogramm eines genau definierten DNA-Fragmentes.

Voraussetzung für diese Entwicklung war die Entdeckung einer hitzestabilen Polymerase (Polymerase 1 aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*), die bei den hohen Temperaturen nicht selbst denaturiert wird (Optimum bei 72°C). Die ungefähre Annealing-Temperatur wird nach der 2 + 4-Regel bestimmt. Für jedes Purin werden 4°C; für jedes Pyrimidin 2°C angenommen und somit durch einfache Addition die Anlagerungstemperatur ermittelt. Die tatsächliche Primertemperatur konnte nur experimentell bestimmt werden, indem nur ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde. Zur Kontrolle wurden 8 µl eines 20 µl-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Bedingungen, sowie die eingesetzten Reaktionsansätze sind im Folgenden aufgeführt.

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (min)
initiale Denaturierung	94	4
Denaturierung	92	1
Annealing 35 Zyklen	primerspezifisch	1
Elongation	72	2
finale Polymerisation	72	10

Bestandteile	eingesetzte Menge
genom. DNA (100 ng / µl)	1 µl
Primer (je 50 pmol)	0.4 µl
Taq PCR-Master Mix (Qiagen)	10 µl
Wasser	8,2 µl

3.2.3.8 Quantitative Real Time PCR (light cycler)

Mit Hilfe des Light Cycler Systems konnte eine Quantifizierung in der online PCR unter der Verwendung des Farbstoffes SYBR Green durchgeführt werden.

SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA (dsDNA) und fluoresziert bei entsprechender Anregung. Über die Fluoreszenzzunahme wurde die lineare Logphase bestimmt, in der sich die PCR in der exponentiellen Amplifikationsphase

befand. Zur Quantifizierung wurde bei festgelegter Fluoreszenzschwelle der crossing point jeder Probe bestimmt.

Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes durchgeführt. Hierzu wurden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie entsprechend ihrem Schmelzpunkt nur noch als Einzelstrang vorlagen. Jedes PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur T_M , die von der Länge und vom GC-Gehalt der Probe abhängig ist. Somit entfiel eine Überprüfung der amplifizierten Produkte durch eine gelelektrophoretische Auftrennung.

Der Mastermix (Vorgabe des Herstellers) wurde in die für den Light Cycler konzipierten Glaskapillaren vorgelegt und die Probe entsprechend ausgewertet.

Die PCR-Bedingungen sind im Folgenden aufgeführt:

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit
initiale Denaturierung	95	15 min
Denaturierung	94	15 sec
Annealing 55 Zyklen	primerspezifisch	20 sec
Elongation	72	5-10 sec
TM - Bedingung	$TM\text{-Dimer} \leq x \leq$ $TM\text{-Produkt}$	5 sec

3.2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten.

In einer PCR-Aufreinigungssäule (Qiagen, Hilden) wurden 10 µl eines PCR-Produktes mit 60 µl PB-Puffer (keine Herstellerangaben) versetzt, dann wurde die Säule in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 13000 rpm (Biofuge A, Heraeus Christ) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, in die Säule 0,75 ml Puffer PE (keine Herstellerangaben) pipettiert und erneut für 1 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen und bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Elution wurde die Säule in ein neues steriles 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 50 µl Aqua bidest beschichtet und 1 min bei 1300 rpm

zentrifugiert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde die Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt bzw. zur Sequenzierung gegeben.

3.2.3.10 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma GATC, Konstanz mit einer garantierten Spezifität von 99,9 % durchgeführt.

Die zur Amplifikation verwendeten Primer sowie die Sequenzierprimer sind im Folgenden aufgelistet.

PCR-Amplifikate <i>Nfl</i>	Sequenzierprimer
NFL Int 1A / NFL 2	NFL Int 1A / NFL 2
NFL 3 / NFL Int 1B	NFL 3 / NFL Int 1B
NFL Int 2A / NFL Int 2B	NFL Int 2A / NFL Int 2B
NFL Int 3A / NFL Int 3B	NFL Int 3A / NFL Int 3B
NFL Int 4A / NFL Int 4B	NFL Int 4A / NFL Int 4B

PCR-Amplifikate <i>Nfm</i>	Sequenzierprimer
NFM 1 / NFM 2	NFM 1 / NFM 2
NFM 3 / NFM 5.1	NFM 3 / NFM 5.1
NFM Int C / NFM Int D	NFM Int C / NFM Int D
NFM Int D1 / NFM 8	NFM Int D1 / NFM 8
NFM 9 / NFM 10.1	NFM 9 / NFM 10.1

3.2.4 Aufbereitung der Gewebe für histologische Analysen

3.2.4.1 Gefrierblöcke

Gefrierblöcke wurden sowohl von frisch entnommenen als auch von fixierten Geweben hergestellt, die jedoch zur Entfernung des überschüssigen Formalins zuvor in PBS gespült wurden.

Die einzelnen Gewebe wurden mit Einbettmedium der Firma Jung auf Korkplatten aufgeklebt.

Eine Schädigung des Gewebes durch zu schnelles Abkühlen wurde per Vorkühlung für 1 min in flüssigem Propan vermieden. Anschließend wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt und in Greinerröhrchen bei -80°C gelagert.

3.2.4.2 Gewebeschnitte

Gefrierschnitte wurden mit einem Leitz Kryostat 2040 in einer Dicke von 10-12 μm angefertigt, direkt mit dem Objektträger abgenommen und 10 min zum Antrocknen bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.4.3 Methanolfixierung

Nach dem Antrocknen wurden die Gefrierschnitte für 5 min in eiskaltem 70 %igem Methanol, danach für 15 min in eiskaltem 100 %igem Methanol und anschließend wieder für 5 min in 70 %igem Methanol fixiert bzw. nach dieser Prozedur dreimal jeweils 5 min in PBS gewaschen.

3.2.4.4 Perfusion

Um eine besonders gute Strukturhaltung der zu untersuchenden Gewebe zu erhalten, wurde bei der Perfusion das Fixans durch die Blutgefäße in die Gewebe des zu untersuchenden Tieres eingeleitet. Des weiteren wurde durch dieses Verfahren ein Verklumpen von Blutresten in den Gefäßen verhindert bzw. eine Weitung und Stabilisierung der Gefäße erreicht.

100 ml Vorspüllösung enthalten:

- 0,9 g NaCl
- 2,5 g Polyvinylpyrrolidon (30 oder 40k) (30 ml einer 5g/60 ml Stammlösung zugesetzt)
- 0,025 g Heparin
- 0,5 g Procain-HCl
- in dest. Wasser

Der pH wurde mit NaOH auf 7,2 - 7,4 eingestellt.

Vorweg wurde den Tieren das Betäubungsmittel Avertin injiziert.

In der Tiefnarkose wurde das noch schlagende Herz freipräpariert und die verwendeten Lösungen wurden in die linke Herzkammer eingeleitet. In einem weiteren Arbeitsschritt wurde der rechte Vorhof geöffnet um ein Abfließen des Blutes bzw. der eingeleiteten Lösung zu ermöglichen.

Um sämtliches Blut aus den Gefäßen zu entfernen wurde zunächst eine Vorspüllösung eingeleitet und anschließend für 2 min das Fixiermittel eingeleitet.

Dann wurden die entsprechenden Gewebe herauspräpariert und über Nacht in das jeweilige Fixans eingelegt.

3.2.4.4.1 Zusammensetzung der Fixiermittel

Für die Perfusion wurde eine 3 %ige Paraformaldehydlösung (3 % Glutaraldehyd, 3 % Paraformaldehyd in 0.12 Phospatpuffer, pH 7,4) verwendet. Das Fixiermittel wurde vor der Perfusion frisch angesetzt und durch einen Filter mit 1 µm Porengröße filtriert, um ein Verstopfen kleiner Kapillaren durch eventuell ungelöste Substanzen zu verhindern.

3.2.4.5 Antikörperfärbungen

Die in Paraformaldehyd fixierten Gewebeschnitte wurden zweimal für 15 min in 0,2 %igem Glycin, gelöst in PBS (0,2M pH 7,0), gewaschen und für 1 h in einer feuchten Kammer mit frisch filtriertem Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. Hierdurch wurde die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert. Anschließend wurde die Blockierlösung vollständig abgesaugt und der Antikörper in der entsprechenden Verdünnung aufgetropft und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abgesaugt, erneut mit BSA für 1 h inkubiert und der zweite Fluorochrom konjugierte Antikörper im Dunkeln bei Raumtemperatur für 45 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Hieran schlossen sich erneut drei aufeinander folgende Waschschrte für jeweils 5 min in PBS an. Vor der Eindeckung der Schnitte in Elvanol wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und abschließend im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiophot) analysiert.

3.2.4.6 Nissl-Kresylviolett färbung

Mit der Nisselfärbung werden die Bestandteile des Zellkerns und die in das Zytoplasma der Nervenzellen eingelagerten Trigroidschollen (Nissel-Schollen) angefärbt. Bei den Substraten handelt es sich Ribonukleoproteine. Bestandteil der Färbelösung ist 0,5 g Kresylviolett gelöst in 100 ml Acetatpuffer (pH 3,8 – 4).

Die verwendeten Gewebeschnitte wurden 15 min bei 60° C in der Kresylviolettlösung gefärbt, anschließend jeweils 5 min in 70 %igem, 80 %igem, 90 %igem und 100 %igem Ethanol bzw. abschließend für 5 min in Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckt.

3.2.4.7 EM-Aufnahmen und Analyse der lumbalen Nervenbahnen

Die lumbalen Nervenbahnen wurden von Dr. P. Heimann präpariert. Zur Kontrastierung wurde das Präparat in einer 1,5 % Osmium-Tetroxid-Lösung für 2h bei 4°C fixiert. Vor der Einbettung in Araldit wurde das Präparat für jeweils 15 Minuten 2 mal in 70%-, 1 mal in 80%-, 1 mal in 90%- und zweimal in 100%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Präparat für 5-10 Minuten in einer 1:1 Lösung aus Ethanol und Propylenoxid gewaschen bzw. nachfolgend zweimal für 5 bis 10 Minuten mit Propylenoxid inkubiert. Danach wurde die Probe jeweils 30 Minuten bei 30°C in einer Propylenoxid-Araldit-Lösung (Verhältnis 2:1), mit einer Propylenoxid-Araldit-Lösung im Verhältnis 1:1, bei 50°C in einer Propylenoxid-Araldit-Lösung (Verhältnis 1:2) und zum Schluss in pures Araldit gegeben.

Anschließend wurde die Probe für eine bessere Trimmung in eine Blockform überführt. Die Präparate wurden bei 60°C ca. 3 bis 4 Tage ausgehärtet, dann trapezförmig getrimmt und mit Hilfe des Ultracutter Semidünnschnitte mit einer Schichtdicke von ca. 1,5 Mikrometer angefertigt, um diese am Lichtmikroskop zu überprüfen bzw. die lumbalen Nervenbahnen mit Richardson Blue (1% (w/v), Methylenblau, (1% (w/v) Azur) einzufärben. Für die EM-Aufnahmen wurden Schnitte von ca. 90 Nanometern angefertigt und auf ein Dünnsteg-Netzchen (200 mesh, w. Piano GmbH, Wetzlar) aufgebracht. Zur Kontrastierung wurde das Präparat 40 Minuten in 2% Uranylacetat gegeben und anschließend 3 mal je 5 Minuten mit Wasser gewaschen. Abschließend wurde das Präparat für 7 Minuten mit Bleicitrat inkubiert.

Die Aufnahmen wurden mit Unterstützung von Dr. Heimann an dem Elektronenmikroskop Zeiss EM 109 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von modifizierenden Einflüssen auf den WR-Phänotyp

4.1.1 Klassifizierung der WR*-Tiere

Die aus der Intraspezies Kreuzung *Mus musculus C57Bl/6J* x *M. m. castaneus* hervorgegangenen Wobbler-Individuen entwickelten in ihrem Ausmaß variierende neurologische Symptome und stellten damit eine phänotypisch heterogene Gruppe dar. Für eine erfolgreiche QTL-Kartierung war es daher notwendig eine genaue Charakterisierung bzw. eine Klassifizierung in Subphänotypen vorzunehmen, um eine in sich homogene Untersuchungsgruppe zu bilden. Die phänotypische Divergenz bezog sich in erster Linie auf das zeitliche Auftreten der Atrophie der Hinterextremitäten, die im reinen *C57Bl/6J* Hintergrund frühestens ab dem achten Lebensmonat bzw. erst im finalen Stadium der spinalen Muskelatrophie (SMA) auftritt.

Alle Wobbler bei denen bereits um den Tag 40 p.n. erste Anzeichen einer Hinterbeinatrophy vorlagen, entwickelten innerhalb der folgenden sechs Lebenswochen eine vollständige Paralyse derselben. Alle weiteren Untersuchungen von der Kartierung des *wmod1*-Locus bis hin zu den immunhistochemischen Analysen wurden mit Gewebeproben von diesen neurologisch stark modifizierten Wobblern (WR*) durchgeführt.

In die Gruppe der intermediären Wobbler-Phänotypen (WRⁱ) wurden diejenigen Tiere eingestuft, bei denen eine Atrophie der Hinterextremitäten zu einem Zeitpunkt beobachtet wurde, der zwischen dem der „normalen“ und dem der schwer betroffenen WR* Tiere lag. Eine vollständige Paralyse der Hinterbeine konnte bei keinem der Tiere aus dieser Gruppe festgestellt werden.

Eine Variation im „Onset“, dem Zeitpunkt der sich im Phänotyp manifestierenden neurologischen Symptome konnte im keinem Fall beobachtet werden. Ebenso konnten keine signifikanten Schwankungen im Schweregrad der Atrophie der Vorderextremitäten festgestellt werden.

Für die Diagnostik des *wr*-Allels wurde die von V. Schmidt entwickelte *Cct4*-Diagnostik angewendet, mit der sowohl homozygote als auch heterozygote Mutationsträger im *C57Bl/6J*-Hintergrund eindeutig bestimmbar sind (Radtke-Hartlieb et al., 1999).

Für die pathologische Analyse wurden wenn keine anderen Angaben gemacht wurden, perfundierte Gewebe von 50 bis 65 Tage alten Wildtyp (WT, +/+ oder +/*wr*), Wobbler (WR, *wr/wr*) und modifiziertem Wobbler (WR*, *wr/wr*) verwendet (Forssmann et al., 1977; Ulbrich et al., 2000).

1.1.1.1 Gewichtsmessungen

Insgesamt wurden die *Cast/Bl6-wr* Nachkommen von 10 verschiedenen F₂ - Würfen (N = 6-10 Tiere) ab dem 8. Lebenstag durchschnittlich alle 4–6 Tage über einen Zeitraum von ca. 10 Wochen zur Ermittlung des Körpergewichts gewogen.

Bis in die dritte Lebenswoche hinein verlief die Gewichtszunahme bei allen untersuchten Tieren relativ synchron. Spätestens ab der vierten Lebenswoche zeigten jedoch alle WR und WR* Tiere unabhängig vom Geschlecht eine reduzierte Gewichtsentwicklung. Insgesamt war das Körpergewicht von adulten Wobblern im Vergleich zu den Wildtypen um ca. 50 %, das der modifizierten Wobbler um ca. 60 % reduziert. Genaue Angaben über die tatsächlichen durchschnittlichen Körpergewichte der einzelnen Phänotypen in Gramm können aufgrund starker individueller Schwankungen nicht angegeben werden. Tendenziell blieben aber alle modifizierten Wobbler Tiere mit schwerster neurologischer Symptomatik in ihrem Körpergewicht gegenüber unmodifizierten WR-Tieren zurück (vgl. Abb. 2).

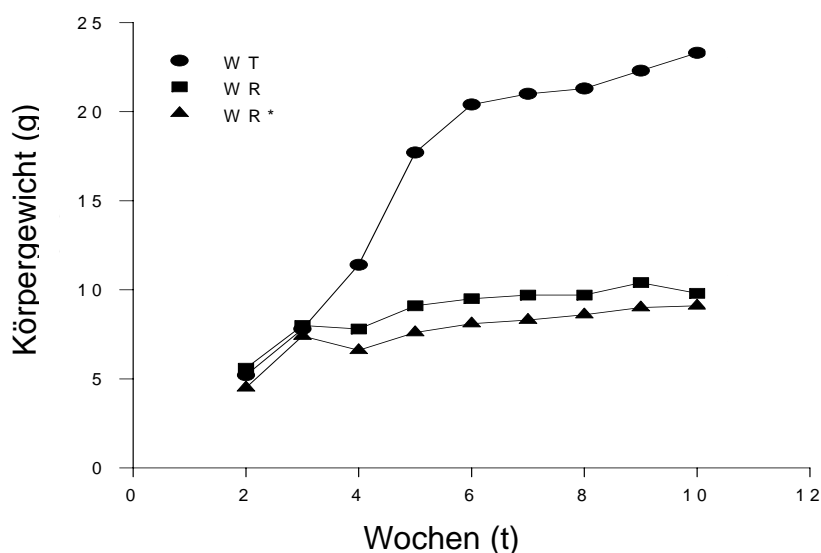


Abb. 2: Entwicklung des Körpergewichtes (vgl. Ulbrich et al., 2002)

Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Phänotyp, Wildtyp (+/+), Wobbler (*wr/wr*) und modifizierter Wobbler, (*wr/wr*) eines *Cast/Bl6-wr* F₂ Geschwisterwurfes.

4.1.1.2 Motoneuronendegeneration

Die beobachtete progressive Hinterbeinatriphie der WR*-Mäuse könnte eine direkte Folge einer verstärkten Motoneuronendegeneration im zentralen Nervensystem sein. Zur Klärung dieser Frage wurde mittels eines Antikörpers gegen MAP2 (Mikrotubuli assoziiertes Protein 2), das überwiegend in neuronalen Zellkörpern und Dendriten lokalisiert ist, das Ausmaß der Neuronendegeneration im Hirnstamm und im Rückenmark untersucht.

Im Vergleich zu Wobbler-Mäusen konnte eine deutlich progressivere Motoneuronendegeneration in der grauen Substanz des Vorderhornes im gesamten Rückenmark festgestellt werden. Sowohl im cervikalen, thorakalen als auch im lumbalen Rückenmark wurde eine große Anzahl von Motoneuronen mit typischen Degenerationserscheinungen (Vakuolisierung, Chromatolyse und aufgeblähter Zellkörper) identifiziert (vgl. Abb. 3). Im Hirnstamm konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WR und WR* gefunden werden.

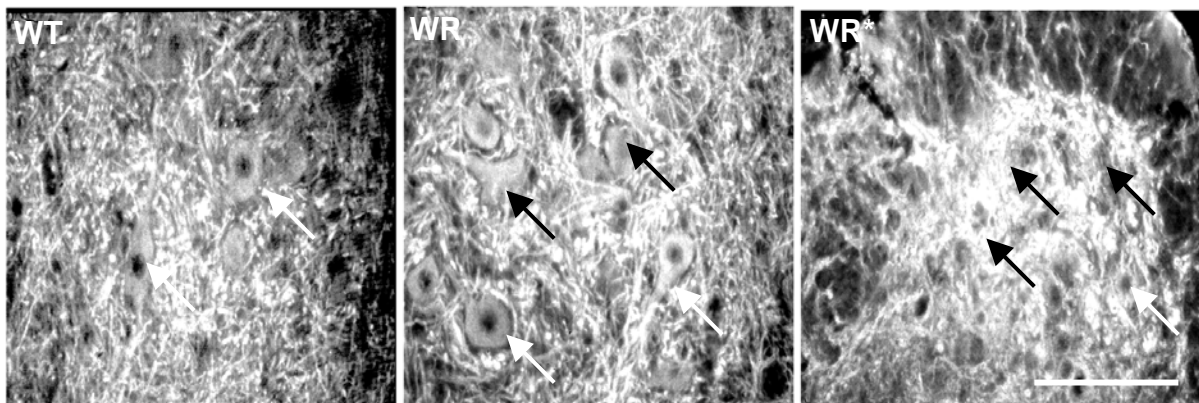


Abb. 3: Motoneuronendegeneration im lumbalen Rückenmark (vgl. Ulbrich et al., 2002)

Ausschnitt von MAP2 Antikörperfärbungen aus dem Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks von Wildtyp (WT), Wobbler (WR) und modifizierten Wobbler (WR*). Die weißen Pfeile deuten auf intakte Neuronen, die schwarzen Pfeile auf stark vakuolierte degenerierte Neuronen hin. Maßstab 100µm.

4.1.1.3 Aktivierung von Gliazellen

Pathologische Prozesse gehen im ZNS häufig mit einer Aktivierung der Gliazellen (Astrocyten und Mikroglia) einher. Die Aktivierung bewirkt u.a. eine vermehrte Zellteilung, um die im verletzten Nervengewebe entstehenden Lücken aufzufüllen. Ob diese Aktivierung für die einzelnen Nervenzellen von Vorteil oder Nachteil ist wird kontrovers diskutiert. Die positiv zu bewertende Läsionenbildung wird durch die Einstellung der Versorgung und die Vernichtung auch von angeschlagenen, aber noch lebensfähigen Neuronen negatiert. Häufig finden sich die aktivierten Gliazellen in der direkten Umgebung von degenerierten Neuronen.

Eine Aktivierung von Gliazellen bei der Wobbler Maus wurde bereits von Radtke-Hartlieb et al., (1999) beschrieben. Eine verstärkte Motoneuronendegeneration bei modifizierten Wobblern sollte folglich mit einer weiteren Zunahme der Gliaaktivierung einhergehen.

4.1.1.3.1 Reaktive Astroglie

Für den immunhistochemischen Nachweis der reaktiven Astroglie wurden Färbungen mit Antikörpern gegen GFAP (glial acidic fibrillary protein) - dem für Astrozyten spezifischen Intermediärfilament eingesetzt.

Es konnte im Vergleich zu gleichaltrigen „normalen Wobblern“ bzw. Wildtypen zweifelsfrei eine deutliche Zunahme der Aktivierung von Astrocyten im Rückenmark von adulten WR*-Tieren nachgewiesen werden.

Erwartungsgemäß korreliert die Aktivierung mit der Degeneration der Motoneuronen und zieht sich vom cervikalen bis weit in das lumbale Rückenmark hinein (vgl. Abb. 4). Mittels des Image-J-Programms (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wurde ein ca. dreifach höheres GFAP-Immunfluoreszenzsignal gegenüber WR-Mäusen und ein ca. zehnfaches gegenüber Wildtyp-Tieren gemessen (vgl. Abb. 5). Im Hirnstamm konnte keine verstärkte Astroglie in WR* Mäusen detektiert werden.

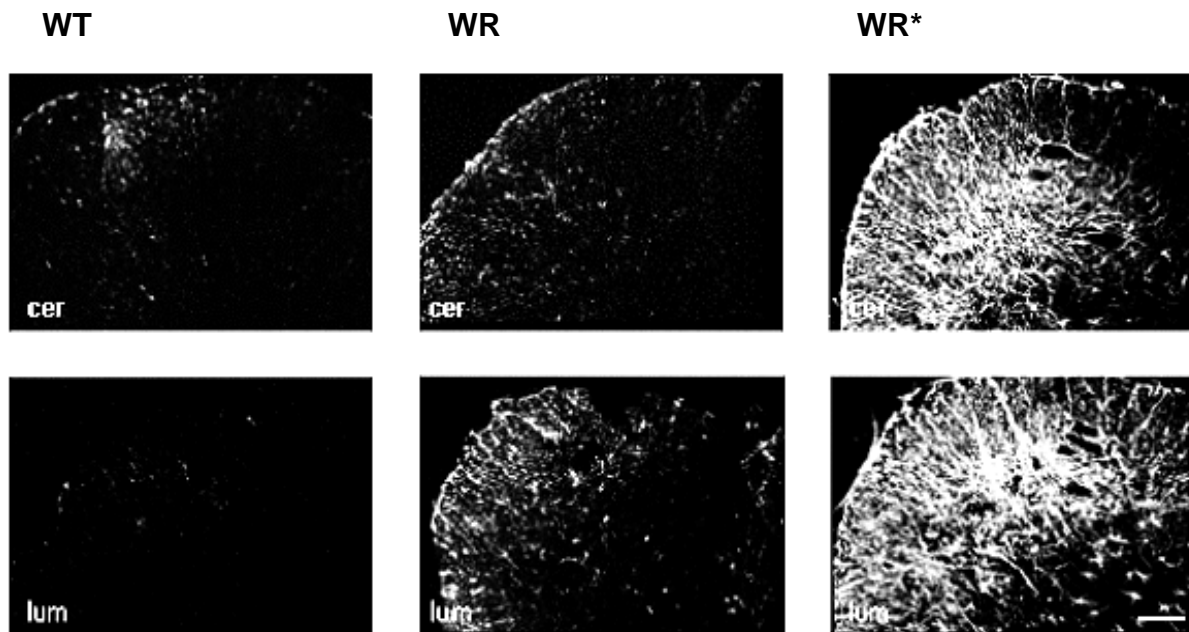


Abb. 4: Verstärkte reaktive Astrogliose im Rückenmark von modifizierten Wobblers (vgl. Ulbrich et al., 2002).

GFAP-Antikörperfärbungen in cervikalen (cer) und lumbalen (lum) Rückenmark von Wildtyp- (WT), Wobblern- (WR) und modifizierten Wobblers- (WR*) Tieren. Die aktivierten Astrocyten finden sich bei WR und WR* Mäusen analog zu den degenerierenden Motoneuronen in der grauen Substanz des Vorderhornes sowie in der Nähe des Zentralkanals. Maßstab 100 μ m.

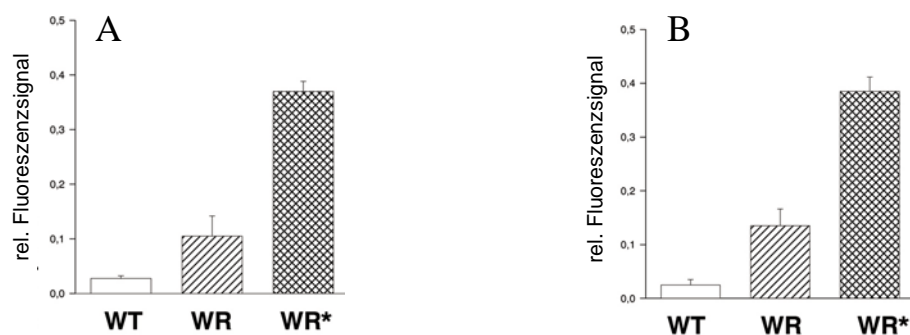


Abb. 5: Relative GFAP Immunfluoreszenz (vgl. Ulbrich et al., 2002)

Die relative GFAP Immunfluoreszenz jedes Phänotyps wurde für das cervikale (A) und das lumbale Rückenmark (B) mit dem „Image-J-Program“ eingemessen und graphisch dargestellt.

4.1.1.3.2 Mikrogliaaktivierung

Für den Nachweis von Mikrogliazellen wurde ein CD45 Antikörper verwendet. Bei CD45 handelt es sich um ein mikroglia- und leukozytenspezifisches Oberflächenprotein, das bei einer Aktivierung der Mikroglia vermehrt produziert wird. Eine Aktivierung ist demnach über die Stärke der Fluoreszenzsignale zu erkennen. Allerdings zeigen aktivierte Mikrogliazellen auch eine hypertrophe Zellmorphologie und verlängerte Zellfortsätze (vgl. Abb. 6, Bildausschnitte 1 und 2).

Im Hirnstamm und im cervikalen Rückenmark konnte im Vergleich von WR* zu WR eine deutliche Aktivierung der Mikrogliazellen beobachtet werden (Abb. 6).

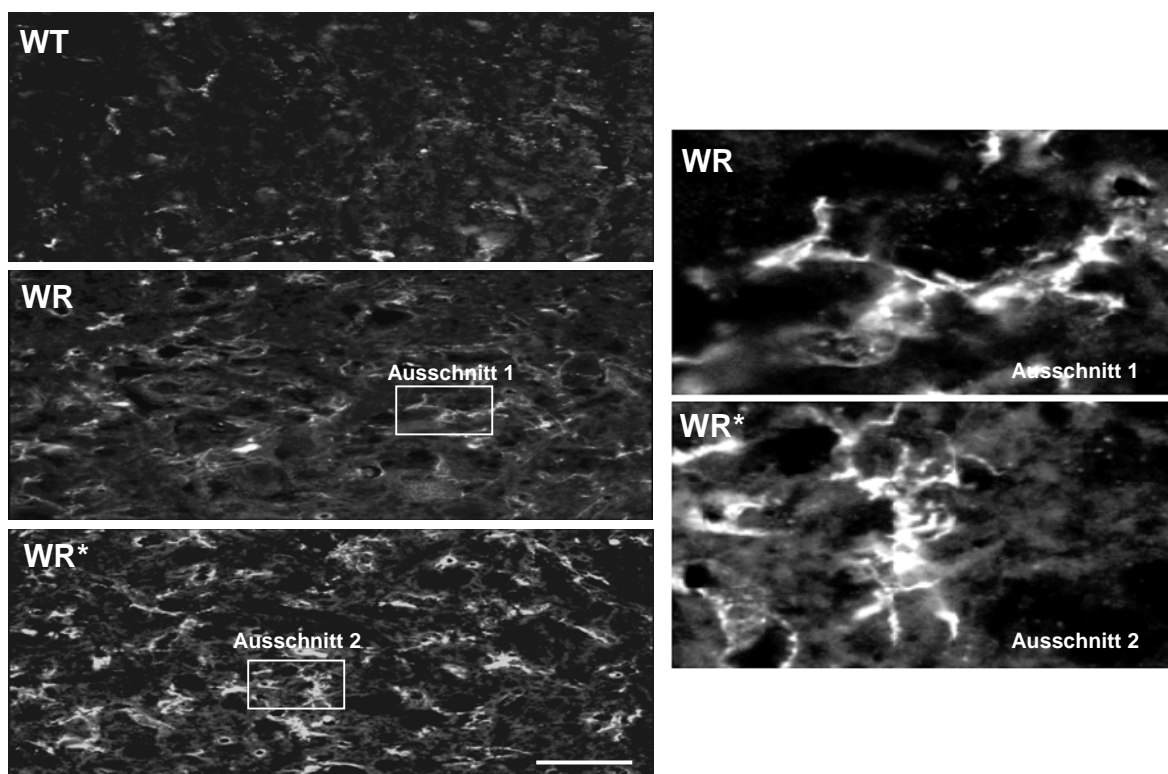


Abb.: 6 Verstärkte Aktivierung der Mikroglia im Hirnstamm von WR*-Tieren

CD45-Antikörperfärbung an Hirnstammschnitten adulter Wildtyp- (WT), Wobbler- (WR) und modifizierter Wobbler- (WR*) Mäuse. Anhand der vergrößerten Bildausschnitte, Ausschnitt 1 = WR, Ausschnitt 2 = WR* wird die sich verändernde Zellmorphologie sichtbar. Maßstab 100µm.

4.1.1.4 Expressionsanalyse des Gens für die α -Untereinheit des Acetyl-Cholin-Rezeptors

Im Skelettmuskel von WR-Tieren konnte von Sedehizade et al. (1997) ein deutlich erhöhter mRNA Level des Gens für die α -Untereinheit des nicotinischen Acetyl-Cholin-Rezeptors als Folge fehlender Innervation festgestellt werden. Eine verstärkte Degeneration der Motoneuronen sollte folglich mit einer weiteren Erhöhung des AChR α Expressionslevels einhergehen.

Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte in drei unabhängigen PCR-Reaktionen in der Muskulatur der Vorder- (Tricepsmuskel) und der Hinterbeine (Gastrocnemius/Soliusmuskels) von WR* Tieren eine signifikante Zunahme der AChR α mRNA nachgewiesen werden (vgl. Abb. 7).

Zur Quantifizierung wurde das Produkt der RT-PCR in einer 20 Zyklen umfassenden Duplex-PCR amplifiziert, anschließend wurden die Ethidiumbromid gefärbten Gele eingescannt und die bandenspezifische Intensität nach Integration mit dem internen Standard gemessen.

Des weiteren wurden fluoreszenzmarkierte Primer (AChR α 1Fi, AChR α 2) in einer 19 Zyklen umfassenden Duplex-PCR eingesetzt und die integrierten Fluoreszenzsignale mittels eines Perkin Elmer Sequenzers gemessen. Als interner Standard wurde das ribosomale Housekeepinggen L7 verwendet (Vullhorst et al., 1998).

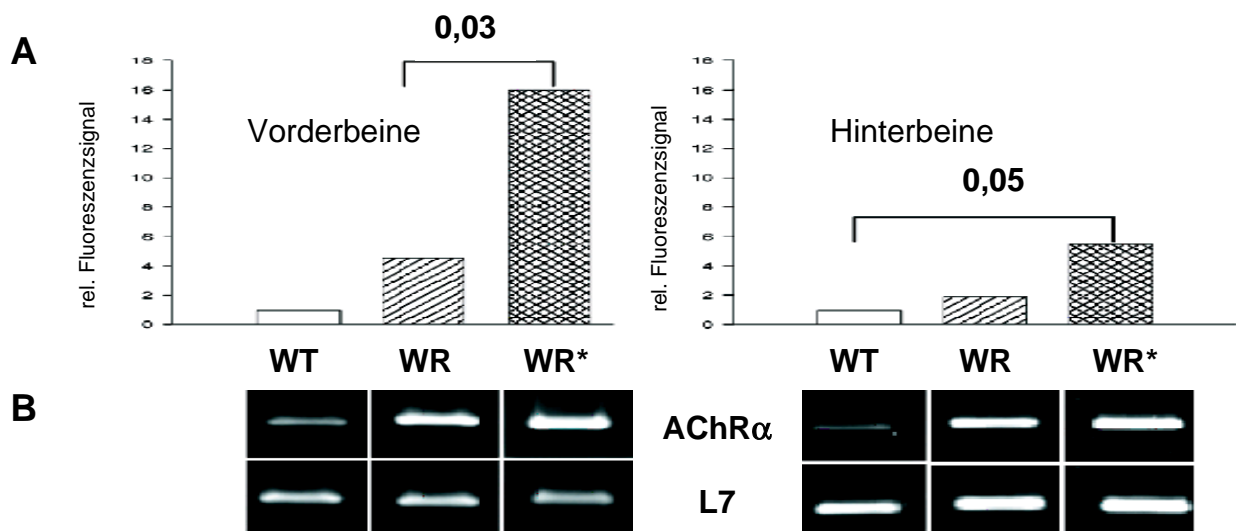


Abb. 7: Expressionslevel des Gens für die α -Untereinheit des Acetyl-Cholin-Rezeptors (vgl. Ulbrich et al., 2002)

A: graphische Darstellung der integrierten Fluoreszenzsignale, die Zahlen oberhalb der

Säulen entsprechen den p Werten (Students Test), B: mit Ethidiumbromid gefärbte Gele der *AChR α* und L7 Amplifikationsprodukte.

4.1.2. Modifier des Testis-Phänotyps

Wie der neurologische Phänotyp unterliegt auch der Testis-Phänotyp (Phänotyp WR^s , Genotyp *wrsprm1*) modifizierenden Einflüssen. Im genetisch homogenen *C57Bl/6J*-Hintergrund sind alle männlichen Tiere steril, es werden ausschließlich defekte Spermien mit nicht funktionsfähigem Akrosom gebildet. In *Bl6/Cast-wr* Hybridmäusen können dagegen morphologisch intakte Wildtyp-Spermien beobachtet werden. Neben den typischen WR -Rundkopfspermien (Heimann et al., 1991) zeigen diese modifizierten Hybride einen variablen Anteil von bis zu 70 % an typischen sichel- bzw. papageienschnabelförmigen Spermien (vgl. Abb. 8) bzw. verschiedene Zwischenstufen der Akrosombildung. Mittels Peanut Agglutinin Färbung bzw. Nisselfärbung an Testis-Gefrierschnitten kann der Anteil von WT-Spermien bei WR^s -Tieren ermittelt bzw. eine Klassifizierung in Subphänotypen vorgenommen werden, um eine in sich homogene Untersuchungsgruppe für die QTL-Kartierung zu bilden.

Um die Mobilität der WR^s -Spermien zu beurteilen wurden die Samenleiter modifizierter Tiere ausgespült und bei 40facher Vergrößerung im Lichtmikroskop analysiert. Eine Einschränkung der Mobilität im Vergleich mit WT-Spermien konnte nicht festgestellt werden, so dass von der Fertilität solcher Spermien ausgegangen werden kann.

Weitere Charakterisierungen wurden in der Diplomarbeit (2002) bzw. werden in der laufenden Dissertation von A. Mussmann vorgenommen. Ein Quantitativer Trait Locus des Testis-Phänotyps konnte bereits auf Chromosom 10 der Maus kartiert werden (A. Mussmann, Diplomarbeit 2002).

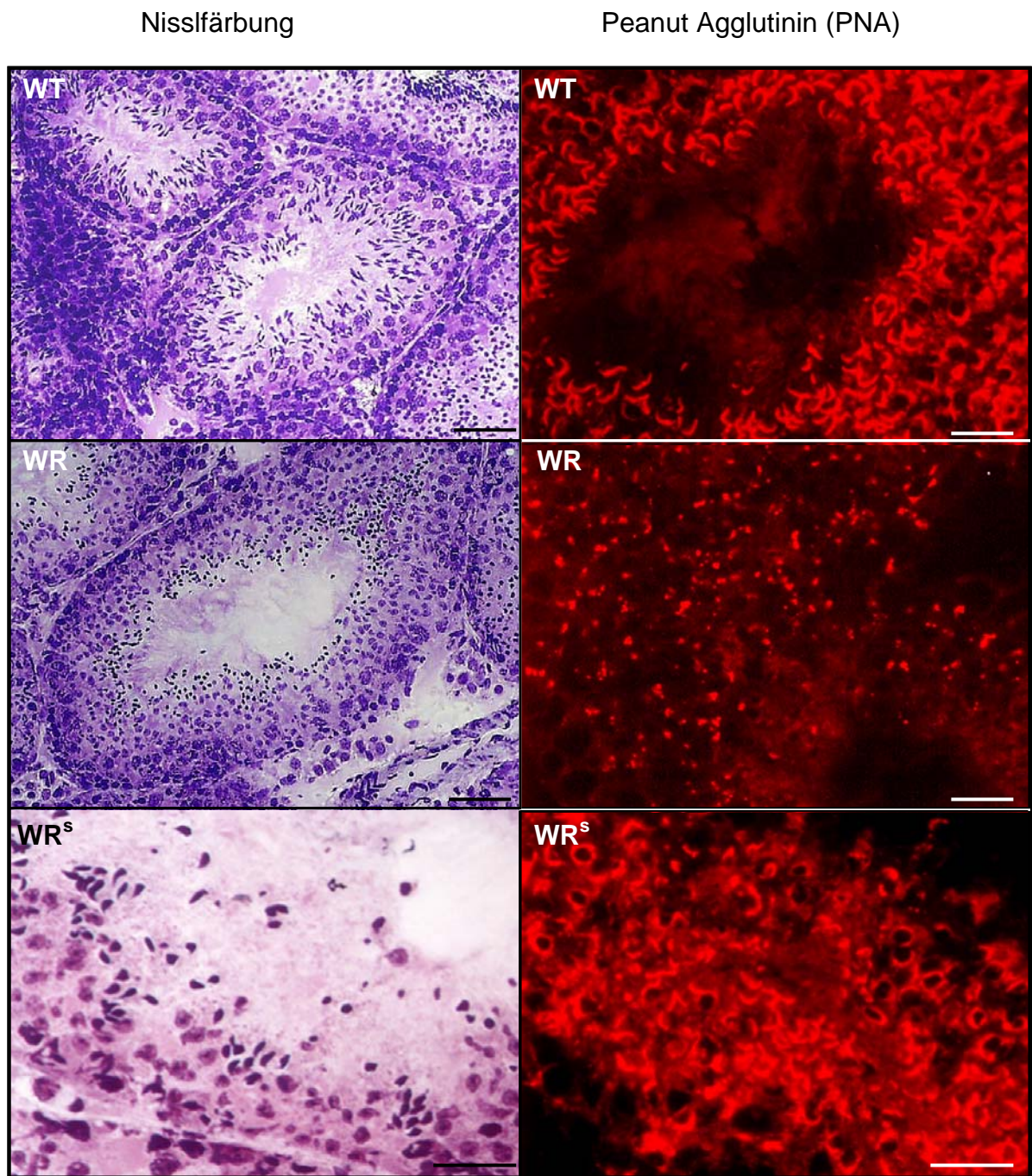


Abb. 8: Modifikation des spermiogenetischen Phänotyps der Wobbler Maus

Abgebildet sind einzelne Hodenkanäle von Gefrierschnitten des Testis von Wildtyp (WT), Wobbler (WR) und spermiogenetisch modifizierten Wobblern (WR^s). Links: Nisslfärbung, rechts: Akrosom spezifische Peanut Agglutinin Ligandenfärbung (PNA), Maßstab 20 µm.

4.2 Kartierung des neuronalen Modifiers

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die von M. Augustin und V. Schmidt bereits begonnene Kartierung des neuronalen Modifiers übernommen und weitergeführt.

Eingesetzt wurde zu diesem Zweck das von Neuhaus und Beier (1998) entwickelte „Interval Haplotype Analysis“ Kartierungsprogramm.

Ausgehend von mindestens zwei polymorphen Mikrosatelliten-Markern (Dietrich et al., 1994) pro Chromosom, wobei einer möglichst nahe am Centromer und einer nahe am Telomer liegen sollte, wurde ein „Whole Genome Scan“ durchgeführt und der Haplotyp jedes WR* Tieres über PCR ermittelt. Überwiegend konnten die von Neuhaus und Beier (1998) angegebenen Mikrosatelliten übernommen werden, ein Teil wurde allerdings selbst ausgewählt.

Insgesamt wurden 18 *Cast/Bl6-wr* F₂ und F₃-Hybride genotypisiert. Die Haplotypen sowie die Bestimmung von χ^2 für die Allel-Verteilung ($\chi^2 (2N-N/2)/N/2$, N = Anzahl der untersuchten Tiere) sind der folgenden Tabelle (vgl. Tab. 3) zu entnehmen. Ein den WR-Phänotyp negativ beeinflussender QTL (*wrmod1*) wurde auf dem Chromosom 14 mit einer Kopplungswahrscheinlichkeit von 83,6% ermittelt. Die relativ hohe Kopplungswahrscheinlichkeit zu Chromosom 13 (71,0 %) und dem Chromosom 17 (61,1 %) könnte auf die Existenz von zwei weiteren QTLs hinweisen.

Marker	Intervall				N	WR* Tiere																	
	n	max p χ^2	exp M χ^2	%max χ^2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
P D1Mit372						B	C	H	C	C	H	H	B	H	B	H	C	H	H	H	A	A	
D D1Mit386	18	36,0	8	22,2%	8	H	H	H	H	C	B	C	H	B	B	B	C	B	B	H	H	H	
P D1Mit386						H	H	H	H	C	B	C	H	B	B	B	C	B	B	H	H	H	
D D1Mit155	18	36,0	12,3	34,0%	4	C	H	H	H	C	H	B	H	B	H	C	B	C	H	B	A	B	
P D2Mit464						H	C	H	C	C	H	H	C	B	H	B	B	H	B	A	A	A	
D D2Mit15	18	36,0	22,0	60,5%	4	C	H	H	H	B	C	B	H	H	C	H	H	H	H	A	A	A	
P D2Mit15						C	H	H	H	B	C	B	H	H	C	H	H	H	H	A	A	A	
D D2Mit504	18	36,0	10,9	30,2%	5	B	C	B	C	H	B	B	H	B	H	C	C	C	H	B	B	H	
P D3Mit204						H	C	B	B		H	B	B	H	B	H	H	H	H	A	B		
D D3Mit147	16	32,0	12,3	38,3%	7	H	C	H	B	C	C	B	C	H	C	H	B	H	A	H	H	H	
P D4Mit98						B	H	C	H	H	C	H	C	H	H	H	C	B	B	A	B	H	
D D4Mit160	18	36,0	16,2	45,0%	5	B	B	B	C	H	C	H	H	B	B	H	H	H	B	B	H	H	
P D5Mit251						H	B	H	C	H	H	B	B	B	H	C	B	H	H	B	H	B	
D D5Mit189	18	36,0	18,2	50,5%	4	H	C	C	H	H	H	C	H	H	H	C	B	H	H	B	H	B	
P D6Mit74						C	C	H	B	H	C	H	B	B	C	H	C	H	B	H	H	B	
D D6Mit110	18	36,0	10,9	30,2%	5	H	B	B	B	H	C	H	B	C	B	H	C	H	B	B	A	H	
P D7Mit55						H	B	C	B	C	H	H	H	C	H	H	C	C	H	H	A	H	
D D7Mit371	17	34,0	12,3	36,0%	4	B	B	H		C	B	H	H	H	C	H	C	B	B	B	B	B	
P D8Mit356						B	B	B	H	B	B	H	B	B	C	B	C	H	B	H	B	A	
D D8Mit200	18	36,0	9,0	25,0%	6	H	H	C	C	H	H	C	H	C	C	H	H	C	H	H	A	H	
P D9Mit66						H	B	H	C	H	H	C	H	H	C	B	C	B	B	A	H	H	
D D9Mit184	18	36,0	16,7	46,3%	6	H	B	H	C	H	H	H	B	C	B	C	B	B	H	H	H	H	
P D10Mit124						C	H	B	B	B	H	B	C	H	H	H	B	C	B	H	H	A	
D D10Mit73	18	36,0	14,2	39,5%	6	H	B	B	C	H	H	C	C	H	B	C	H	H	H	B	H	H	
P D11Mit19						B	B	B	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
D D11Mit100	18	36,0	2,0	5,6%	11	H	C	C	C	H	C	H	B	H	H	H	B	H	B	H	H	B	
P D12Mit136						B	B	B		B	B	H	C	B	B	C	C	H	B	B	H	H	
D D12Mit79	17	34,0	0,5	1,5%	8	B	H	C	H	B	H	H	B	H	H	H	B	H	B	B	B	H	
P D13Mit18						C	C	H	B	H	B	B	C	B	H	C	H	H	H	B	A	H	
D D13Mit77	17	34,0	24,1	71,0%	2	H	H	C		H	C	B	C	C	H	H	H	H	H	H	H	H	
P D14Mit222						C	H	C	C	H	H	H	H	H	C	H	H	H	H	H	B	H	
D D14Mit103	18	36,0	32,0	83,6%	1	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	H	H	C	H	H	A	H	
P D15Mit131						H	B	H	B	H	H	H	C	H	B	B	H	H	B	H	A	B	
D D15Mit96	18	36,0	10,9	30,2%	9	H	H	B	B	H	H	B	H	B	B	H	H	C	B	H	A	B	
P D16Mit165						B	H	H	B	H	H	H	H	H	H	C	B	H	B	H	A	B	
D D16Mit191	18	36,0	16,2	45,0%	6	B	C	C	B	H	H	B	H	B	H	H	C	H	H	B	A	H	
P D17Mit34						H	H	B	H	C	H	C	H	H	C	H	C	H	B	B	H	B	
D D17Mit94	18	36,0	22,2	61,1%	2	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C	B	B	B	B	H	A	
P D18Mit147						C	H	B	H	C	C	H	B	C	C	H	H	B	B	B	A	A	
D D18Mit196	18	36,0	18,2	50,6%	3	C	C	B	H	B	C	H	C	H	C	H	B	C	B	B	A	A	
P D19Mit129						B	H	C	H	H	B	H	H	C	H	H	C	B	H	B	H	B	
D D19Mit1	18	36,0	14,8	40,9%	6	B	B	H	H	H	C	H	H	H	B	C	C	B	H	B	H	A	

Tab. 3: Haplotypen - Schemata der neurologisch schwer betroffenen WR*-Tiere

Die Auswertung der WR*-Haplotypen mit dem „Interval Haplotype Analysis“ Kartierungsprogramm von Neuhaus und Beier (1998) ergab eine signifikante Kopplung zum Chromosom 14 (83,6%, grau unterlegt) und u.U. zum Chromosom 13 (71,0%) und dem Chromosom 17 (61,1%). P = proximal gelegener Mikrosatellitenmarker, D = distal gelegener Mikrosatellitenmarker, B = homozygot *C57Bl/6J*, H = heterozygot *Cast/Bl6*, C = homozygot *Cast/Ei*, N = Zahl der nicht betroffenen Tiere, n = Anzahl der untersuchten Tiere je Marker, 1-18 = WR*-Individuen

4.2.1 Segregationskartierung von Chromosom 14

Mit der Verwendung von verschiedenen Mikrosatellitenmarkern wurde versucht ein möglichst gleichmäßiges und engmaschiges „Netz“ über das komplette Chromosom 14 zu ziehen, um über die entsprechenden Allelverteilungen eine genaue Lokalisierung der *wrmod1* QTLs zu erreichen (vgl. Tab. 4). Gesucht wurden chromosomale Regionen, in denen bei keinem der modifizierten Wobblers ein homozygoter *C57Bl/6J* Allelstatus vorzufinden ist. Wie aus der Tab. 4 ersichtlich wird konnte ein solcher Bereich jedoch nicht eindeutig definiert werden, denn die diagnostizierten Bruchpunkte der Rekombinationsereignisse der Tiere 5 und 16 (grau unterlegt) mit homozygoten *C57Bl/6J* Allelen sind gegenläufig.

M	Mb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>D14Mit179</i>	0,4	C	H	C	C	H	H	H	H	B	C	H	H	H	H	C	B	H	H
<i>D14Mit222</i>	18,9	C	H	C	C	H	H	H	H	H	C	H	H	H	H	C	B	H	H
<i>D14Mit253</i>	19,0	C	H	C	C	H	H	H	H	H	C	H	H	H	H	C	B	H	H
<i>D14Mit45</i>	29,0	C	H	C	C	H	H	H	H	H	C	H	H	H	H	C	B	H	H
<i>D14Mit152</i>	37,4	C	H	C	C	H	H	H	H	C	C	H	H	H	H	C	B	H	H
<i>D14Mit154</i>	48,6	C	H	H	C	H	H	H	H	C	C	H	H	C	H	C	B	H	H
<i>D14Mit37</i>	53,0	C	H	H	C	H	H	H	H	C	C	H	H	C	H	C	B	H	H
<i>D14Mit39</i>	59,2	C	H	H	C	H	H	H	H	C	C	H	H	C	H	C	B	H	H
<i>D14Mit236</i>	60,4	C	H	H	C	H	H	H	H	C	C	H	H	C	H	C	B	H	H
<i>D14Mit68</i>	62,9	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	H	H	C	H	C	B	H	H
<i>D14Mit224</i>	64,7	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	H	H	C	H	C	H	H	H
<i>D14Mit103</i>	72,8	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	C	C	C	C	C	H	C	H
<i>D14Mit263</i>	79,6	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	H	H	H	H	C	H	C	H
<i>D14Mit105</i>	92,6	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	C	C	C	C	C	H	C	H
<i>D14Mit94</i>	95,1	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	C	C	C	H	C	H	C	H
<i>D14Mit197</i>	96,7	C	H	H	C	B	H	H	H	C	C	C	C	C	H	C	H	C	H
<i>D14Mit131</i>	111	C	C	H	C	B	H	H	H	C	C	C	C	C	H	C	H	C	H
<i>D14Mit266</i>	112	C	C	H	C	B	H	H	H	C	C	C	C	C	H	C	H	C	H

Tab. 4: Segregationskartierung Chromosom 14

Dargestellt sind die Allelverteilungen der WR* Tiere für die verwendeten Mikrosatellitenmarker. M = Mikrosatellitenmarker, Mb = relative Position in Megabasen, B = homozygot *C57Bl/6J*, H = heterozygot *Cast/Bl6*, C = homozygot *Cast/Ei*, 1 -18 = WR* Individuen.

Innerhalb der WR^* F_2 $BL6/Cast$ -Hybrid-Zucht zeigen die WR^* Tiere sowohl heterozygote $Cast/Bl6$ als auch homozygote $Cast/Ei$ Allelverteilungen weshalb von einem negativ dominanten Einfluss des *wrmod1* Locus auszugehen ist.

4.2.1.1 Etablierung einer partiell kongenen Mauslinie ($Bl/C^{cast14}-wr$)

Zur Verifizierung der Kartierungsdaten wurde eine partiell kongene Mauslinie ($Bl/C^{cast14}-wr$) etabliert. Selektioniert auf den homozygoten $Cast/Ei$ Allelstatus auf Chromosom 14 mit den Mikrosatellitenmarkern *D14Mit253* (7,5cM), *D14Mit154* (30,6cM), *D14Mit224* (42cM) und *D14Mit94* (50cM) wurden drei Rückkreuzungsgenerationen etabliert. In einem sich nach jedem Backcross anschließenden Intercross ($F_x Ri$) wurden $Bl/C^{cast14}-wr \times Bl/C^{cast14}-wr$ Verpaarungen durchgeführt um homozygote $Bl/C^{cast14}-wr$ Tiere zu züchten. Aus beiden Verpaarungsstrategien, $F_x R^{cast14}$ und $F_x Ri^{cast14}$, konnten sowohl WR , WR^i und WR^* Mäuse generiert werden. Von insgesamt 47 Wobler-Nachkommen zeigten 15 Tiere den intermediären WR^i Phänotyp (drei $F_2 R^{cast14}$, ein $F_2 Ri^{cast14}$, sechs $F_3 R^{cast14}$, vier $F_3 Ri^{cast14}$ und ein $F_4 R^{cast14}$) und sechs Mäuse den schweren WR^* Phänotyp (drei $F_3 Ri^{cast14}$, zwei $F_3 R^{cast14}$, und ein $F_2 R^{cast14}$).

Der Anteil der WR^* -Tiere lag bei 45 % in der partiell kongenen Linie, im Vergleich zu 15% in der konventionellen F_2 -Zucht: ein eindeutiger Hinweis auf die Bedeutung des Modifiers *wrmod1* auf dem Chromosom 14.

Alle sechs schwer betroffenen WR^* -Tiere wurden mit den in der Tabelle 4 angegebenen Mikrosatelliten genotypisiert. Die Haplotypen der kongenen WR^* Tiere sind in der folgenden Tabelle (vgl. Tab. 5) dargestellt.

M	Mb	1	2	3	4	5	6
<i>D14Mit179</i>	0,38	H	H	B	H	H	H
<i>D14Mit222</i>	18,9	H	H	B	H	H	H
<i>D14Mit253</i>	19	H	H	B	H	H	H
<i>D14Mit 45</i>	29	H	H	B	H	H	B
<i>D14Mit152</i>	37,9	H	H	B	H	H	B
<i>D14Mit154</i>	48,6	H	H	B	H	C	B
<i>D14Mit37</i>	53	H	H	H	H	C	B
<i>D14Mit39</i>	59,2	H	H	H	B	C	B
<i>D14Mit236</i>	60,5	H	H	H	B	H	B
<i>D14Mit68</i>	62,9	H	H	H	B	H	B
<i>D14Mit224</i>	64,7	H	H	H	B	H	B
<i>D11Mit03</i>	72,8	H	H	H	B	H	B
<i>D14Mit263</i>	79,6	B	H	H	B	H	B
<i>D14Mit105</i>	92,6	B	H	H	H	H	B
<i>D14Mit94</i>	95,1	B	H	H	B	H	B
<i>D14Mit197</i>	96,3	B	H	B	B	H	B
<i>D14Mit131</i>	111	B	H	B	B	H	B
<i>D14Mit266</i>	112	B	H	B	B	H	B

Tab. 5: Segregationskartierung der kongenen WR* Tiere auf Chromosom 14

Dargestellt sind die Allelverteilungen der WR*-Tiere für die verwendeten Mikrosatellitenmarker. M = Mikrosatellitenmarker, Mb = relative Position in Megabasen, B = homozygot *C57Bl/6J* (grau unterlegt), H = heterozygot *Cast/Bl6*, C = homozygot *Cast/Ei*, 1 - 6 = WR* Individuen

In der partiell kongenen Linie konnten fünf Rekombinationsereignisse auf Chromosom 14 identifiziert werden, die allerdings - wie im Fall der F₂ Segregationskartierung - keine eindeutige QTL-Region flankieren.

Die Rekombinationsereignisse der Tiere 3 und 4 schränken zwar einen möglichen Kandidatengenbereich auf eine 10,6 Mb kleine Region zwischen den Mikrosatelliten *D14Mit154* (48,6Mb) und *D14Mit39* (59,2) ein, die Rekombination des Tieres Nr. 6 ist

allerdings gegenläufig. Unter Umständen wurde dieses Tier falsch klassifiziert, oder es wurden trotz Selektion weitere QTLs in die kongene Linie vererbt. (vgl. 5.1.2).

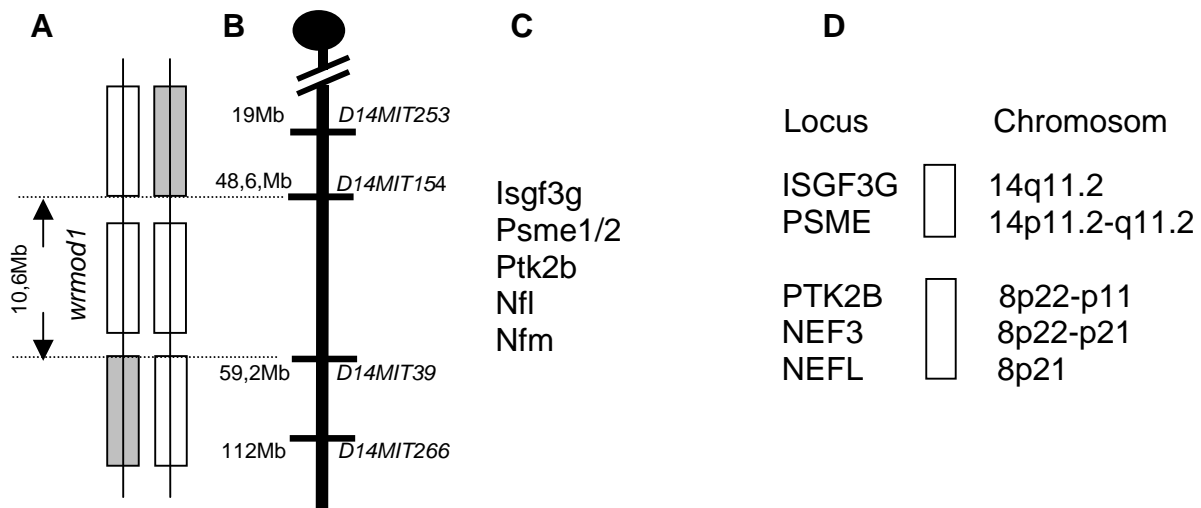


Abb. 9: Lokalisation des neurologischen Modifiers *wrmod1*

A: Haplotypenschema von zwei rekombinanten WR*-Tieren aus der partiell kongenen Linie. Die grauen Balken repräsentieren homozygote *C57Bl/6J*-Allele, die weißen Balken heterozygote *Cast/BL6*-Allele. Die Lokalisation des QTLs *wrmod1* ist durch die Doppelpfeilspitzen angegeben, die Größe in Mb. Innerhalb der kritischen Region wurden ca. 120 Gene annotiert. (Ensembl Mouse Genome Database: www.ensembl.org).

B: Ausschnitt des Maus Chr. 14, mit Angabe von Mikrosatellitenmarkern und deren Position in Megabasen (Ensembl Mouse Genome Database: www.ensembl.org)

C: Auswahl möglicher Positionskandidatengene,

Isgf3g	interferon dep. transkriptfaktor
Psme1/2	proteosom 1 u. 2
Ptk2b	protein tyrosin kinase
Nfl	neurofilament middle chain
Nfm	neurofilament light chain

D: homologe Region auf dem humanen Chromosom 14q und 8q

4.2.2 Segregationskartierung Chromosom 13 und 17

Zu Beginn dieser Arbeit standen 13 modifizierte WR*-Tiere für die Kopplungsanalyse zur Verfügung. Im Verlauf der Dissertation konnten fünf weitere WR* Tiere diagnostiziert werden, deren genotypischen Daten zu unterschiedlichen Zeitpunkten

in die Kopplungsanalyse einfließen und damit zu Veränderungen in der prozentualen Kopplungswahrscheinlichkeit führten (vgl. Tab.6).

Chromosom	N = 13	N = 18
13	69,4 %	71,0%
14	85,2	83,3%
17	71,6%	61,1%

Tab. 6: Kopplungswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit der Anzahl genotypisierter WR*-Tiere

Dargestellt sind nur die Chromosomen 13, 14 und 17 der Maus und die mit dem „Interval Haplotype Analysis“ Programm ermittelten prozentualen Kopplungswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit der Anzahl genotypisierter WR* Tiere.

Die Segregationsanalysen auf Chromosomen 13 und 17 wurden nur mit den am Anfang dieser Arbeit übernommenen 13 WR*-Tieren durchgeführt (vgl. Tab.7 und 8).

Marker	cM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>D13MIT306</i>	3,3	H	C	H	B	H	B	B	C	B	C	C	H	H
<i>D13MIT18</i>	7,7	C	C	H	B	H	B	B	C	H	H	C	H	H
<i>D13MIT19</i>	14,2	C	C	H	H	B	H	B	C	B	H	C	H	H
<i>D13MIT27</i>	29,4	C	C	C	H	B	H	B	C	B	H	C	H	B
<i>D13MIT108</i>	33,9	C	C	C	H	B	H	B	C	B	H	C	H	H
<i>D13MIT77</i>	53,6	H	H	C		H	C	B	C	C	H	H	H	H

Tab. 7: Segregationskartierung Chromosom 13

Dargestellt sind die Allelverteilungen der WR* Tiere für die verwendeten Mikrosatellitenmarker. M = Mikrosatellitenmarker, cM = relative Position in centi Morgan, B = homozygot *C57Bl/6J* (grau hervorgehoben), H = heterozygot *Cast/Bl6*, C = homozygot *Cast/Ei*, 1 -13 = WR* Individuen.

Marker	cM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>D17MIT34</i>	9,8	H	H	B	H	C	H	C	H	H	C	H	C	H
<i>D17MIT66</i>	19,7	H	H	C	H	B	H	H	H	C	B	C	B	H
<i>D17MIT86</i>	27,3	H	H	C	H	B	H	H	H	C	B	C	B	H
<i>D17MIT94</i>	40,4	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C	B	B

Tab. 8: Segregationskartierung Chromosom 17

Dargestellt sind die Allelverteilungen der WR* Tiere für die verwendeten Mikrosatellitenmarker. M = Mikrosatellitenmarker, cM = relative Position in centi Morgan, B = homozygot *C57Bl/6J* (grau hervorgehoben), H = heterozygot *Cast/Bl6*, C = homozygot *Cast/Ei*, 1 -13 = WR* Individuen.

4.3 Neurofilament Akkumulationen im Perikaryon von Neuronen

Alle Gene innerhalb der QTL-Region sind aufgrund ihrer Position Kandidatengene. In diesem Zusammenhang fielen besonders zwei Gene auf, die für die leichten und mittleren Proteinuntereinheiten des Neurofilaments codieren. Neben der neuronenspezifischen Expression existierte eine direkte Verbindung zu neurodegenerativen Erkrankungen, in deren Verlauf häufig abnormale Neurofilament-Ablagerungen beobachtet werden konnten (Hirano, 1996; Lee et al., 1988). Aufgrund dieser Hinweise wurde versucht die Rolle des Neurofilaments im Zusammenhang mit der *wr*-Mutation bzw. einen möglichen modifizierenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu analysieren.

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen die 160 kDa Untereinheit des Neurofilaments (NF-M) durchgeführt, die Detektion erfolgte mit einem Fluorophor konjugierten Zweitantikörper.

Im Hirnstamm und Rückenmark von Wobblern und modifizierten Wobbler-Tieren konnten eindeutig perikale, neuronale Ablagerungen des Neurofilamentproteins NF-M nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Wobblern war die Anzahl der betroffenen Neuronen in den untersuchten Geweben des ZNS bei WR* Mäusen wesentlich erhöht. Besonders in Regionen des *Nucleus vestibularis* des Hirnstamms konnte eine große, in Klustern auftretende Anzahl von Neuronen mit NF-M Ablagerungen identifiziert werden (vgl. Abb. 10 A1-A3). Im WR-Rückenmark konnte mit dieser Methode keine, im WR* Rückenmark nur mit Hilfe des „konfokalen Laser Scanning Mikroskops“ (Modell Leica TCS SP2) vereinzelt abnormale NF-M Ablagerungen in den Motoneuronen der grauen Substanz nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10 B).

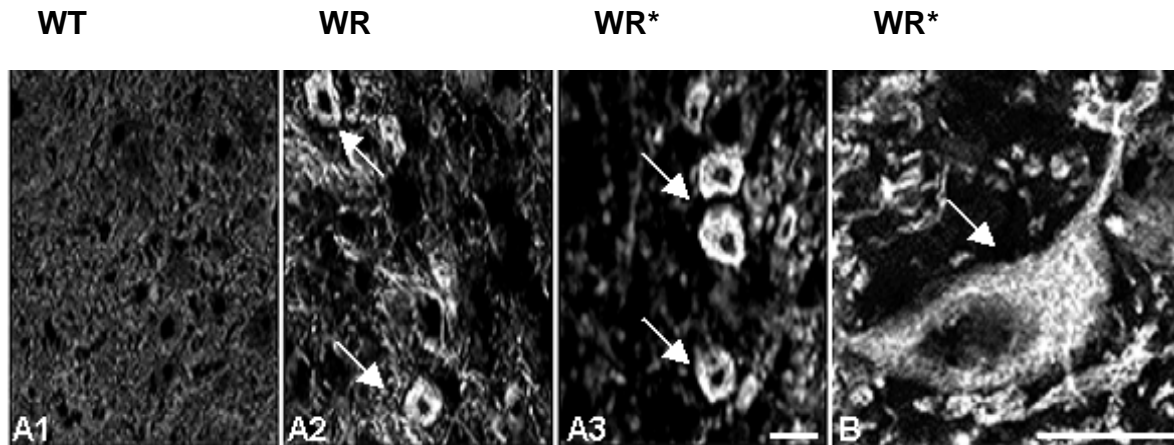


Abb. 10: Neurofilament-Ablagerungen im Perikaryon von Neuronen

A: Ausschnitt von NF-M Antikörperfärbungen aus dem *Nucleus vestibularis* des Hirnstamms von adulten Wildtyp- (A1), Wobbler- (A2) und modifizierten Wobbler-Tieren (A3).

B: Aufnahme eines einzelnen WR* Motoneurons aus der grauen Substanz des cervikalen Rückenmarks. Die weißen Pfeile markieren Neuronen mit abnormalen Neurofilament-Ablagerungen. Maßstab 50 μ m

Im Elektronenmikroskop konnten im cervikalen Rückenmark von 15 Wochen alten WR- und WR*-Tieren eindeutig in langen parallelen Bündeln auftretende Neurofilament-Ablagerungen im Perikaryon von Motoneuronen detektiert werden. Die Anzahl solcher Neurone mit NF-Ablagerungen war im WR* Rückenmark wesentlich größer als im WR Rückenmark, wo lediglich vereinzelt und weniger intensive Ablagerungen beobachtet wurden. In gleichaltrigen homozygoten *Cast/Bl6* Hybriden (+/+) und *Cast/Ei* Wildtyp- (+/+) Mäusen konnten solche Strukturen nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 11).

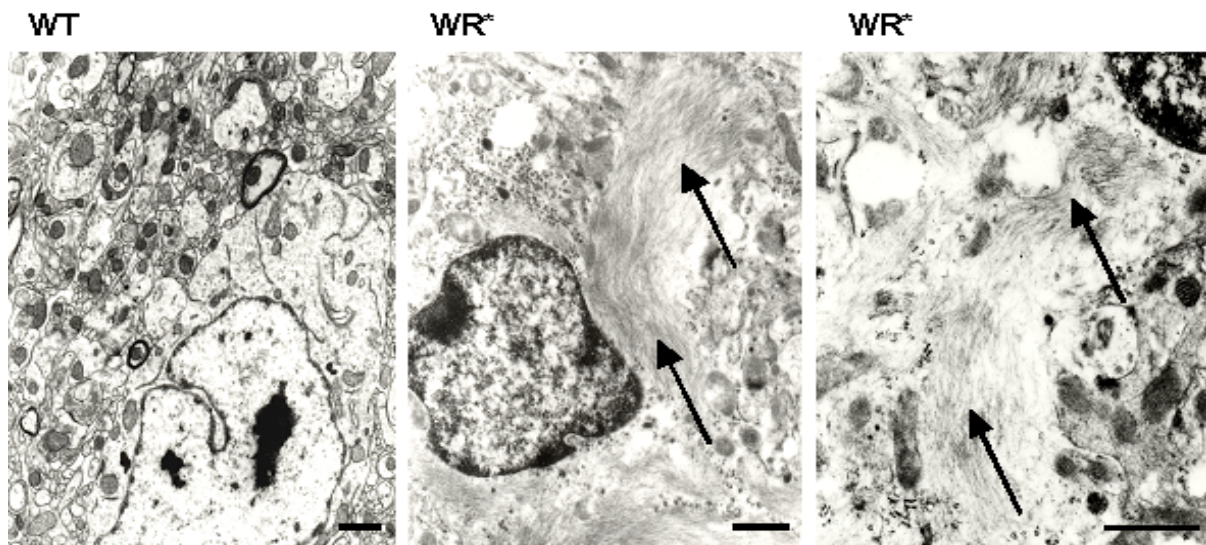


Abb. 11: EM-Aufnahmen von pathologischen NF-M Ablagerungen in Motoneuronen des cervikalen Rückenmarks

Deutlich sind faserig gebündelte NF-M Ablagerungen im Perikaryon einzelner Motoneurone des cervikalen Rückenmarks von modifizierten Wobblern zu erkennen (schwarze Pfeile). WT = *Cast/Ei (+/+)*, WR* *Cast/BL6 (wr/wr)*. Maßstab 1 μ m.

4.4 Degeneration der lumbalen Spinalnerven

Eine besondere Rolle spielen die Neurofilamente bei der Entwicklung bzw. Aufrechterhaltung der Integrität von langen, großkalibrigen Axonen wie sie vorwiegend in Motoneuronen vorkommen. Mutationen im Neurofilament könnten demnach zu neuropathologischen Befunden vor allem in den Spinalnerven führen.

Die Spinalnerven zählen zu den peripheren Nerven und werden durch die Verbindung der dorsalen und ventralen Wurzeln gebildet. Funktionell werden die sensorischen Informationen über die dorsalen Wurzeln dem Rückenmark zugeführt. In den ventralen Wurzeln verlaufen die efferenten motorischen Axone, die die Muskeln innervieren, sowie die Axone des sympathischen und parasymphatischen Nervensystems.

Aus dem fünften lumbalen Rückenmarksegment (L5 Wurzeln) wurden die Spinalnerven präpariert. In den dorsalen Nervenbahnen konnten keinerlei Unterschiede zwischen Wildtyp, Wobbler und modifizierten Wobbler gefunden

werden. Sowohl die Anzahl und die Form als auch die Myelinisierung der sensorischen Axone scheint bei allen drei Phänotypen identisch zu sein (vgl. Abb. 12A).

In den motorischen Axonen der ventralen Nervenbahnen konnte dagegen eine Vielzahl atrophierter Axone in WR- und wesentlich verstärkt in WR*- Nervengewebe detektiert werden. Die betroffenen Axone erschienen kollabiert, einhergehend mit einer Reduktion im Durchmesser, im Grad der Myelinisierung und einer irregulären Form (vgl. Abb. 12B). Die motorischen Axone der Kontrolltiere, homozygote *Cast/Bl6* Hybride und *Cast/Ei* WT Mäusen zeigten dagegen keine veränderten, abnormale Nervenfasern.

Elektronenmikroskopische Detailaufnahmen der motorischen Spinalnerven bestätigten die Beobachtungen am Lichtmikroskop. Die einzelnen Axone der WR und WR* Tiere hoben sich eindeutig von den Wildtypen in Form und Durchmesser ab (vgl. Abb. 12C). Des Weiteren schien die Myelinscheide im WR und WR* -Axonen reduziert zu sein. Für eine genaue Analyse müssten hierfür jedoch die einzelnen Myelinisierungsringe der Axone gezählt, und anschließend statistisch ausgewertet werden.

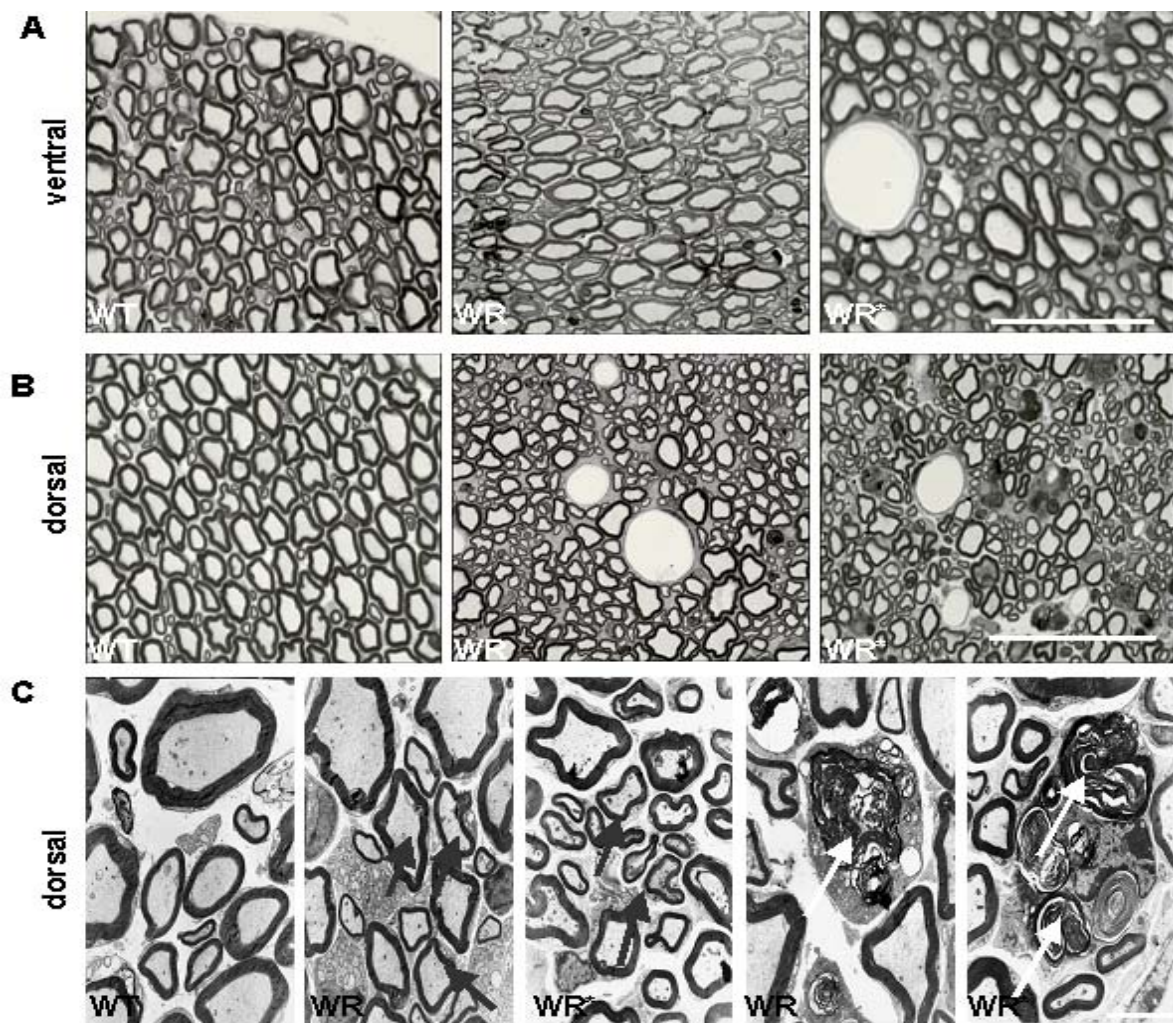


Abb. 12: Degeneration der lumbalen Spinalnerven

Richardson-Blue gefärbte Semidünnschnitte der ventralen, sensorischen (A) und der dorsalen motorischen (B) L5 Spinalnerven von adulten WT (+/+), WR (*wr/wr*) und WR* (*wr/wr*). Maßstab 50µm

C: EM – Aufnahmen der dorsalen Axone von WT, WR und WR* in verschiedenen Vergrößerungen. Die weißen Pfeile deuten auf stark degenerierte, die schwarzen Pfeile auf Axone mit u.U. reduzierter Myelinscheide hin. Maßstab 5µm.

4.5 Analyse der Kandidatengene *Nfl* und *Nfm*

Aufgrund der beobachteten physiologischen Parameter in der WR* Pathologie (NF-Ablagerungen, lumbale Axonopathie der motorischen Spinalnerven) sowie der Kartierungsergebnisse (Positionskandidat für *wrmod1*) wurden die kodierenden Regionen der Neurofilamentgene *Nfl* und *Nfm* sequenziert.

4.5.1 Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse der Gene *Nfl* und *Nfm* wurden die codierenden Regionen mit einer Proof-Reading Polymerase (ThermoZyme™ DNA-Polymerase) amplifiziert, anschließend mittels des PCR-Purification Kits von Qiagen aufgereinigt und sequenziert. Die Rohdaten wurden assembliert und eine vergleichende Sequenzanalyse zwischen den Mausstämmen *M. m. C57Bl/6J* (+/+), *Cast/Ei* (+/+) und WR*-Tieren (*wr/wr*), mit homozygoten *Cast/Ei* Allelstatus am *Nfm* und *Nfl* Locus durchgeführt.

4.5.1.2 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens *Nfl*

Die kodierende Region des Gens *Nfl* (2044bp; Acc. Nr. M13016) wurde in fünf überlappenden Fragmenten amplifiziert. Die Primerkombinationen die zur Amplifikation eingesetzt wurden sowie die Sequenzierprimer sind unter Punkt 3.2.3.10 angegeben.

Die Sequenzalignments zwischen *M. m. C57Bl/6J*, *M. m. Cast/Ei* (+/+) und WR* (*wr/wr*) ergaben eine 100 %ige Sequenzhomologie.

4.5.1.3 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens *Nfm*

Die kodierende Region des Gens *Nfm* (2580bp; Acc. Nr. X05640), wurde in fünf überlappenden Fragmenten amplifiziert. Die Primerkombinationen die zur Amplifikation eingesetzt wurden sowie die Sequenzierprimer sind unter Punkt 3.2.3.10 angegeben.

Die Sequenzalignments zwischen *M. m. Cast/Ei* (+/+) und WR* (*wr/wr*) ergaben eine 100 %ige Sequenzhomologie.

Anders verhielt es sich bei Sequenzalignments zwischen den Mausstämmen *M. m. C57Bl/6J* (+/+) und *Cast/Ei* (+/+). In der kodierenden Region des dritten Exons konnten drei Punktmutationen identifiziert werden, die jeweils zu

Aminosäuresubstitutionen in der carboxyterminalen Domäne des NF-M Proteins führten. Eine A1829→G Punktmutation im AAA Codon führte zu einer Aminosäuresubstitution von Lysin zu Glutaminsäure (K609E). Die zwei weiteren Punktmutationen betrafen einen C1884→G Austausch im CAC Codon, der eine Aminosäuresubstitution von Histidin zu Glutamin (H628Q) zur Folge hatte bzw. eine T2096→C Mutation in einem CTG Codon, die zu einem Aminoaustausch von Lysin zu Prolin (L699P) führte. (vgl. Abb.13).

Alle drei Punktmutationen betrafen die Erkennungssequenz von Restriktionsendonukleasen (*Hinfl*, *AluI* und *SduI*), wodurch sich ein spezifisches Bandenmuster für jede Mutation nach Auftrennung des Spaltungsansatzes durch Gelelektrophorese ergab (vgl. Abb. 13 B1-B3). Für die Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismen-(RFLP) Analyse wurde mit den Primern (NFM 7 und NFM 10.1) ein 878bp großes *Nfm*-PCR-Fragment amplifiziert und anschließend mit dem entsprechendem Restriktionsenzym gespalten. Die Spaltprodukte sind im Folgenden aufgeführt:

A1829→G Punktmutation betrifft eine *Hinfl* – Restriktionsschnittstelle

C57Bl/6J: 377bp, 238bp, 174bp, 72bp, 17bp

Cast/Ei: 377pb, 133bp, 105, 174bp, 72bp, 17bp

C1884→G Punktmutation betrifft eine *SduI* - Restriktionsschnittstelle

C57Bl/6J: 425bp, 191bp, 262bp

Cast/Ei: 616bp, 262bp

T2096→C Punktmutation betrifft eine *AluI* - Restriktionsschnittstelle

C57Bl/6J: 368bp, 103bp, 278bp, 95bp, 34bp

Cast/Ei: 471bp, 278bp, 95bp, 34bp,

Mit Hilfe des *Hinfl* RFLPs konnte der Allelstatus aller 18 modifizierten WR* am *Nfm*-Locus charakterisiert werden. Insgesamt zeigten elf WR* Tiere eine heterozygote *Cast/Bl6*, sechs eine homozygote *Cast/Ei* und ein Tier eine homozygot *Bl6* Allelverteilung am *Nfm*-Locus.

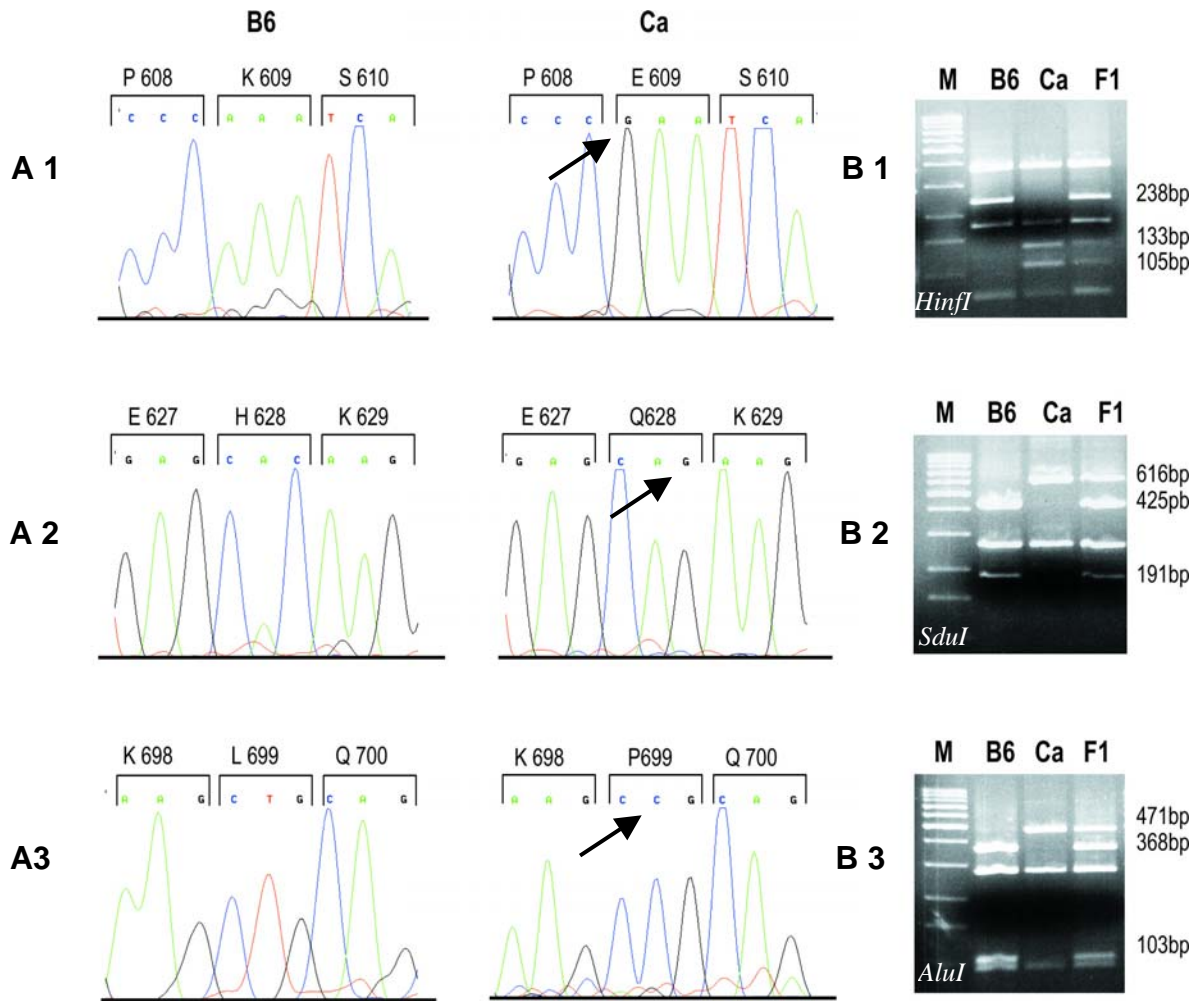


Abb. 13: Punktmutationen im *Nfm* Gen der Mausstämme *Mus musculus* C57Bl/6J und *M. m. castaneus*

A1-A3: Sequenzdatenausschnitt der identifizierten Punktmutationen (schwarze Pfeile), die entsprechenden Codons sind partiell eingefasst bzw. die daraus resultierenden Aminosäuren oberhalb der Einfassung angegeben.

A1: A1829→G Punktmutation im AAA Codon

A2: C1884→G Punktmutation im CAC Codon

A3: T2096→C Punktmutation im CTG Codon

B1-B3: Auftrennung der jeweiligen Spaltprodukte im Ethidiumbromid gefärbten Gel.

B1: *HinfI* Spaltprodukte

B2: *SduI* Spaltprodukte

B3: *AluI* Spaltprodukte

M = Marker (100pb-Leiter), B6 = *M. m. C57Bl/6J* (+/+), Ca = *M. m. Cast/Ei* (+/+), F₁ = *Cast/Bl6*-Hybride

4.5.1.3.1 Spezies übergreifende Aminosäuresequenzanalyse des NF-M Proteins

Um den Grad der Konservierung der substituierten Aminosäuren zu überprüfen, wurde eine Spezies übergreifende Aminosäuresequenzanalyse der carboxy-terminalen NF-M Domäne bei verschiedenen Mausstämmen, Ratte, Mensch und Rind durchgeführt (vgl. Abb.14). Die Aminosäure Lysin an Position 609 ist in allen untersuchten Spezies konserviert.

Der H628Q Austausch betrifft eher eine gering konservierte Aminosäure, zudem ist hier das castaneus *Nfm*-Allel mit der Aminosäure Q628 zumindest in Nagern konserviert. Die dritte identifizierte Aminosäuresubstitution L699P ist ebenfalls *C57Bl/6J* spezifisch und bei allen analysierten Spezies hoch konserviert (vgl. Abb.14).

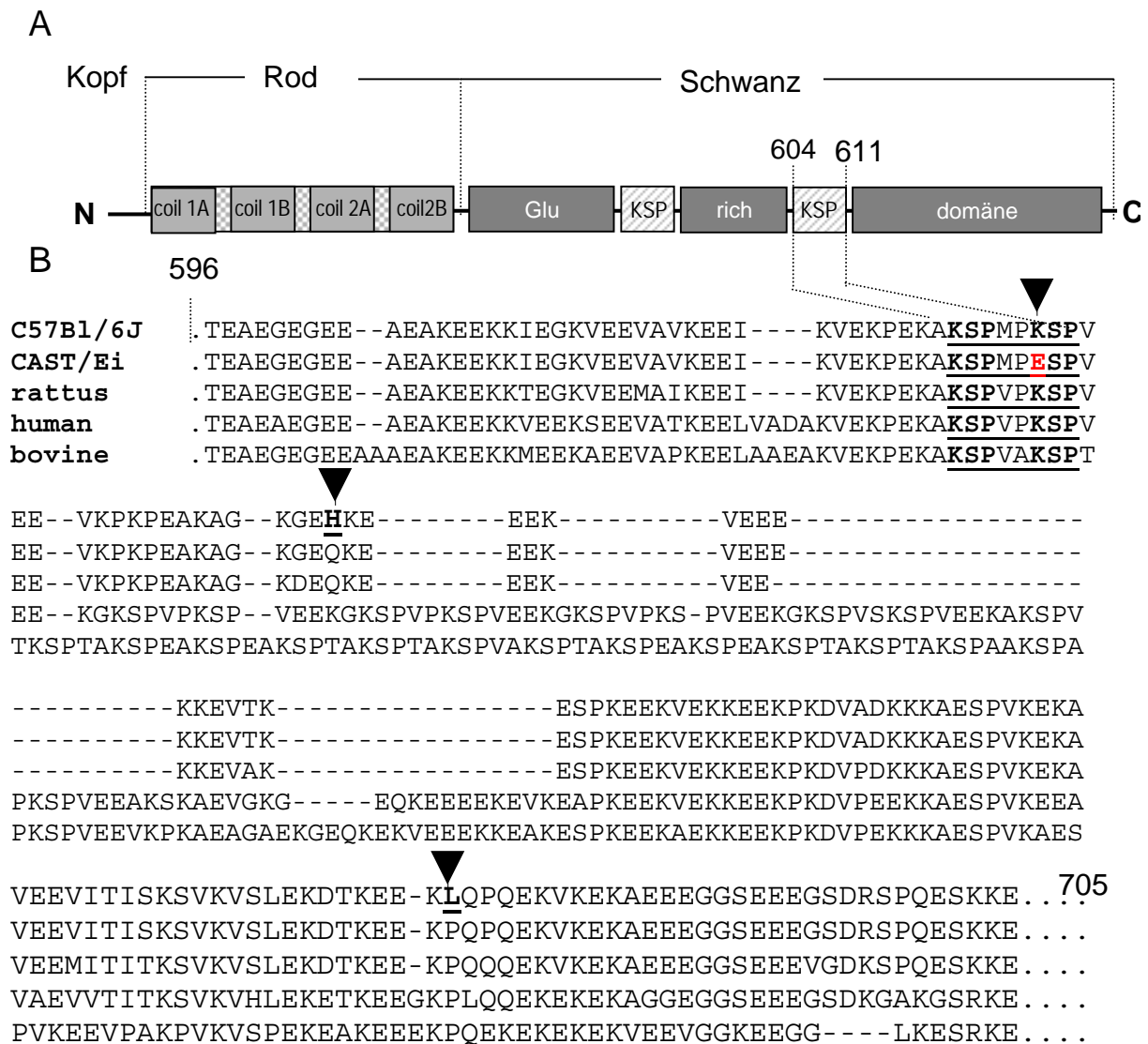


Abb. 14: Spezies übergreifende Aminosäuresequenzanalyse der carboxyterminalen NF-M Domäne

A: Schematische Darstellung des NF-M-Proteins. Die Zahlen oberhalb des Schemas geben die Aminosäureposition des betroffenen KSP-Klusters an.

Partielles Aminosäurealignment der terminalen NF-M Domäne der Mausstämmen *C57Bl/6J*, *Cast/Ei*, sowie der Spezies Ratte, Mensch und Rind. Die Polymorphismen sind mit einer Pfeilspitze markiert und unterstrichen. Das mutierte geklusterte KSP-Motiv ist ebenfalls unterstrichen

Zusätzlich wurden die Maustämme *M. m. laboratorius* NZB, AKR, Balbc, Sv129, CD1 und *Mus spretus* mit den entsprechenden RFLPs (vgl. Abb. 13) analysiert. Auch hier zeigte sich, dass bei allen untersuchten Mausstämmen die Aminosäure Lysin an Position 609 hoch konserviert vorliegt.

Für die identifizierten Polymorphismen ergaben sich die im Folgenden aufgelisteten *Nfm*-Allelverteilungen (vgl. Abb. 15):

K609: *M. m. laboratorius* C57Bl/6J, *M.m.l.* NZB, *M.m.l.* AKR, *M.m.l.* BalbC, *M.m.l.* Sv129, *M.m.l.* CD1, *Mus spretus* SEG

E609: *M. m. castaneus*

H628: *M. m. laboratorius* C57Bl/6J, *M.m.l.* Sv129

Q628: *M. m. castaneus*, *M. m. laboratorius* NZB, *M.m.l.* AKR, *M.m.l.* BalbC *M.m.l.*, CD1, *Mus spretus* SEG

L699: *M. m. laboratorius* C57Bl/6J, *M. m. l.* Sv129

P699: *M. m. castaneus*, *M. m. laboratorius* NZB, *M.m.l.* AKR, *M.m.l.* BalbC, *M.m.l.* CD1, *Mus spretus* SEG

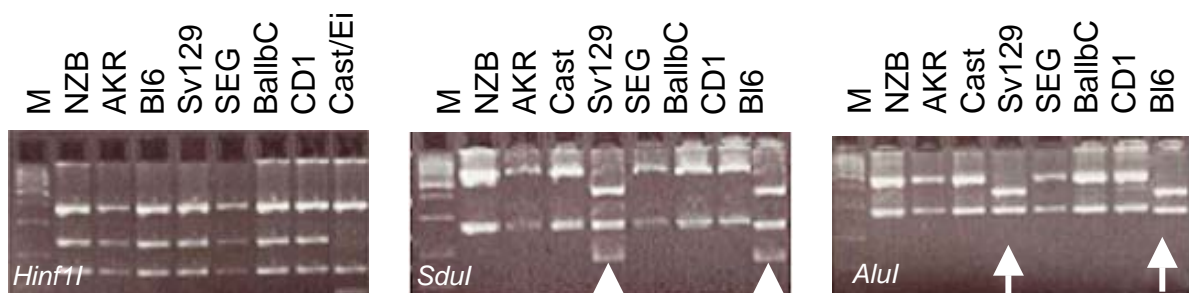


Abb. 15: Restriktionsspaltungen des NFM 7 / NFM 10.1 PCR-Produktes

Spezifisches Restriktionsmuster nach Auftrennung des Spaltungsansatzes durch Gelelektrophorese und anschließender Ethidiumbromidfärbung. M = Marker (100bp-Leiter), (NZB, AKR, C57Bl/6J = Bl6, Cast/Ei, Sv129, SEG = Spretus, Balbc, CD1) = verwendete

Mausstämme. Die weißen Pfeilspitzen markieren jeweils das Restriktionsmuster des Mausstammes *Sv129* das dem des *C57Bl/6J*-Stammes entspricht .

Neben den beschriebenen Nukleotid-Variationen konnte im zweiten Intron des *Nfm*-Gens eine 57bp große *Cast/Ei* spezifische Deletion identifiziert werden (vgl. Abb. 16). Deletiert ist eine 19bp (AAC TGC ATG CCT GCC GCG C) umfassende dreifache Sequenzwiederholung. Zum Nachweis wurde ein 676 bp großes genomisches Fragment mit den Primer NFM 12/ NFM Int D1 amplifiziert.

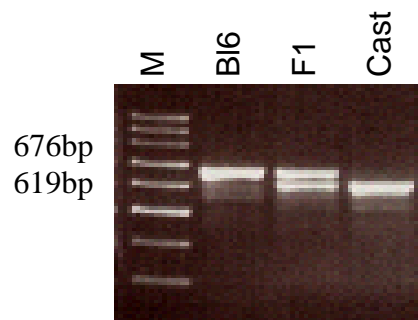


Abb. 16: Castaneus spezifische Deletion im zweiten Intron des Nfm-Gens.

Die amplifizierten Fragmentgrößen sind in Basenpaaren angegeben. M = Marker (100bp-Leiter), Bl6 = homozygot *C57Bl/6J*, F1 = heterozygot *CAST/Bl6*, Cast = homozygot *Cast/Ei*.

Die entsprechende genomische *C57Bl/6J* Sequenz mit Exon / Intron Grenzen ist im Folgenden wiedergegeben. Die verwendeten Primer sind unterstrichen, die castaneus spezifische Deletion ist kursiv und dick hervorgehoben.

Exon 2 (125 bp)

.....GGGGAACCAAGTGGGAAATGGCTCGTCATTTGCGAGAATACCAGGAT
CTCCTTAACGTCAAGATGGCCCTGGACATCGAGATCGCCGCGTACAG

Intron 2 (1436 bp)

gtacaggatctctgcagacttgggtccagaccctacaggcactgcagaggctgctgccaac
agccttcccacttaaaccaaagctggcctagtgagacaggctcagagccctgactcccc
agctcagttacgaacagaatcctaagtattacagatacagggttaccacactacttcagc
tttaaagagtgactacggagaagatcggggaggagggtggaactgggggagggaaccaa
atatattgtatgaaaaagcccaaatatgcaccaaagaatagtacttttgagttgctgggg
gcgtagcaataggtttaaatttttgtttcaagcgtctgtatgtctgacaagcagatgaag
ttttcatttttagtatttcacatctgatggttctcttttataaaagccaaggacaacaccag
gtcatgcttctcttctcttctgttacagcttactgttgccatcctctggctgagactag
atataggcacactagaatatagggtgcacttactttaagttctatggataatata~~**catgcat**~~

tcaatctggatagaaatgtaaatttaatatatatttatctacatatgtaaagtgtgatac
 cctcatalctagatctagacaagcgtgtatgtataaaaacatatagaactagacatatag
 gcaaatataggtttgatctctttatctgtaaactggttctatctagggtctcctgagtaat
 gctgtctttctgttggccagactcaaagcatacagctcttgaggaggcagtcacttctg
 taaggctgttacagcaagaataagctgcactgtcttttaagggaaaccaaacgactgtac
 caagagacattctgtcactgaacaaattataatttgcttcacctatattcgtatgtagct
 ataatttaaatcatcaacattctgacttatgctcaatagttttaatttaaatgaaaca
 ttttatttgcttttaaaactcatagaaatcttggaattcaaagatgagggaggacacc
 gtttgggggacaaagtgggttggccactagagaccattttagcacattcatactacacct
 acagc **aactgcatgctgcccgcgc aactgcatgctgcccgcgc aactgcatgctg
 cgcgc** aactgcatgctgcccgcagagatgcatttactgactgggtgtggtagttgtct
actgggagtggctaggcactacagcagaggactgtctggcactcttgagaatctgcccc
 Aggatatgataaacatggtgatgaaatggcagtaagcactcactgcctggtagaaagag
 TAtttccttacgtgggttctatttattcaaaagtgccactacattaagcttgtggtaatg
 aagattagaagaccaaacaagtctttcttgatgtctcatcctctttgggttctctccttag

Exon 3 (1348 bp)

GAAACTCCTAGAGGGGAAGAGACCAGATTTAGCACATTTTCAGGAAGCATCACCGGGCC
 TCTGTAC.....

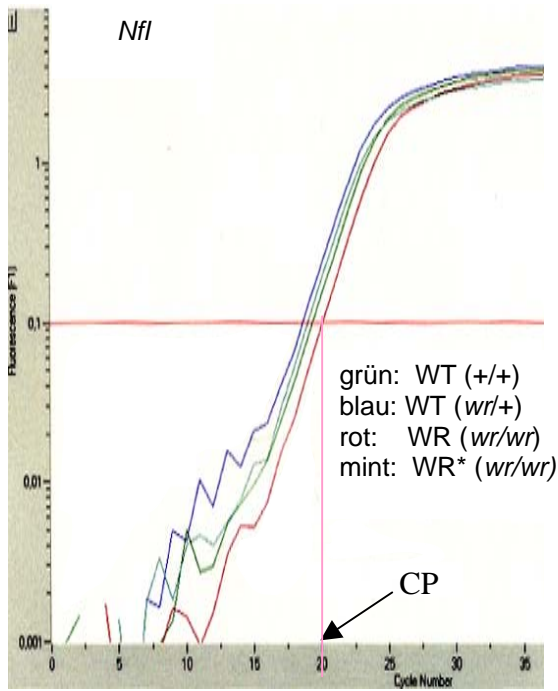
4.5.2 Expressionanalyse der Gene *Nfl* und *Nfm*

Die Expressionsanalysen der Gene *Nfm* und *Nfl* wurden an den ZNS-Geweben Großhirn, Kleinhirn/Hirnstamm und Rückenmark von Wildtyp, Wobbler und modifiziertem Wobbler mittels Real Time RT-PCR im light cycler (Roche, Idaho Technologies) durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils die gepoolten Proben von mindestens zwei, in den allermeisten Fällen jedoch von drei Tieren. Als interner Standard wurde das Housekeepinggen *Hprt* (Hypoxanthin Phosphorybosyltransferase) verwendet (Pernas-Alonso et al., 1996).

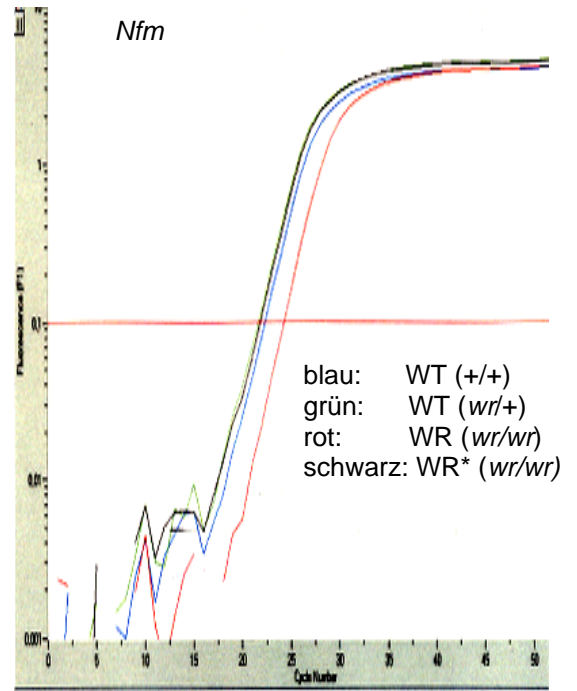
Zur relativen Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens mit dem des Referenzgens verglichen.

Ausgewertet wurden die crossing points (CP) bei einer definierten Fluoreszenzsignalschwelle (threshold level), bei der sich die PCR in der exponentiellen Amplifikationsphase befand. Im Anschluss an die letzte Elongationsphase wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung der spezifischen Produkte durchgeführt.

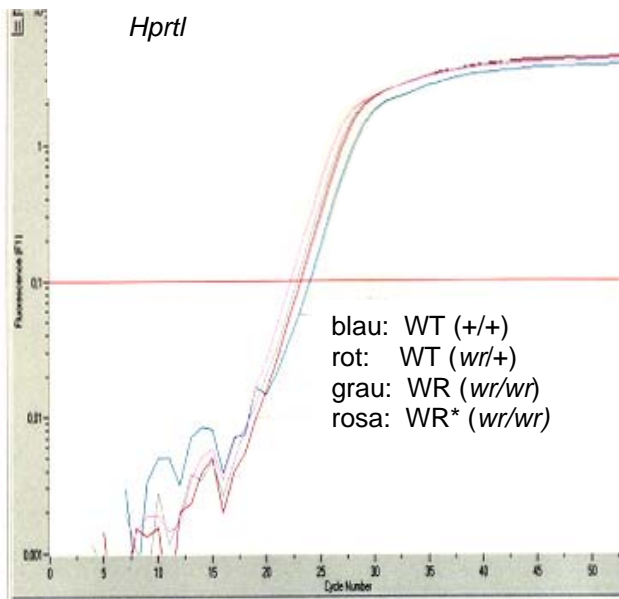
A



B



C



D1**CP-Werte GH**

	WT (+/+)	WT (wr/+)	WR (wr/wr)	WR* (wr/wr)
Nfl	20,41	20,77	21,21	21,97
Nfm	23,72	24,34	23,25	24,8
Hprt	21,48	22,48	21,63	22,26
<hr/>				
<i>Nfl/Hprt</i>	0,95	0,92	0,98	0,98
<i>Nfm/Hprt</i>	1,10	1,08	1,07	1,11

D2**CP-Werte KH/HS**

	WT (+/+)	WT (wr/+)	WR (wr/wr)	WR* (wr/wr)
Nfl	22,12	22,53	22,59	22,16
Nfm	24,34	25,88	25,75	24,12
Hprt	25,41	27,45	25,64	24,75
<hr/>				
<i>Nfl/Hprt</i>	0,87	0,82	0,88	0,89
<i>Nfm/Hprt</i>	0,95	0,94	1	0,97

D3**CP-Werte RM**

	WT (+/+)	WT (wr/+)	WR (wr/wr)	WR* (wr/wr)
Nfl	19,39	18,62	20,11	19,04
Nfm	22,31	21,66	24,25	21,81
Hprt	24,03	23,06	22,85	22,25
<hr/>				
<i>Nfl/Hprt</i>	1,24	1,24	1,14	1,12
<i>Nfm/Hprt</i>	1,08	1,07	0,9	1,02

Abb. 17: Real Time Expressionsanalyse der Gene *Nfl* und *Nfm* in verschiedenen neuronalen Geweben

A-C: Graphischen Darstellung des Fluoreszenzsignals während der Real Time PCR der Gene *Nfl*, *Nfm*, *Hprt*, in Rückenmarksgewebe von homozygoten WT (+/+), heterozygoten WT (wr/+), WR (wr/wr) und WR* (wr/wr) Tieren. Der threshold level ist durch die rote Basislinie gekennzeichnet, der entsprechende crossing point (CP) markiert.

D1-D3: Tabellen der crossing points bei definiertem threshold level innerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase, im unteren Teil der Tabelle sind die jeweiligen Quotienten angegeben.

D1: CP-Werte des Großhirns, D2: CP-Werte des Kleinhirns und Hirnstammes, D3; CP-Werte des Rückenmarks

GH = Großhirn, KL/HS = Kleinhirn/Hirnstamm, RM = Rückenmark

In keinem Fall konnten signifikante Unterschiede in der Expression von WT, WR und WR* in den analysierten neuronalen Geweben gefunden werden. Der Übersicht wegen wurden exemplarisch nur die Originalgraphen der Expressionsanalyse der Gene *Nfl*, *Nfm* und des Housekeeping Gens *Hprt* im Rückenmark dargestellt (vgl. Abb. 17).

4.6 Kreuzung von F₁ Cast/Bl6-Hybriden mit C57Bl6-mdf

Mit dieser Kreuzungsstrategie sollte über die Phänotypisierung der homozygoten *C57Bl6-mdf* Nachkommen geklärt werden, ob der castaneus spezifische *wrmod1* locus eine Modifizierung von vergleichbaren aber genetisch anders determinierten motorischen Systemerkrankungen ermöglicht.

Da zur Zeit noch keine *mdf*-Diagnostik zur Verfügung steht, musste der Allelstatus durch aufwändige Rückkreuzungen ermittelt werden, um anschließend heterozygote (*mdf/+*) Tiere mit F₁ *Cast/Bl6* -Hybriden zu verpaaren. Alle Nachkommen wurden mit verschiedenen Mikrosatellitenmarkern (*D14Mit253*, *D14Mit154*, *D14Mit224*, *D14Mit94*) bzw. dem castaneus spezifischen *Nfm*-Deletions Polymorphismus auf den QTL hin analysiert (vgl. Abb. 16). Mit entsprechend durchgeführten Intercross-Kreuzungen wurden homozygote *mdf*-Mäuse generiert die für den QTL *wrmod1* homozygot castaneus waren. Bei keinem dieser zur Zeit ca. 1 Jahr alten Tiere (N = 5) konnte ein den neurologischen Phänotyp modifizierender Einfluss beobachtet werden.

5. Diskussion

5.1 Modifizierter neurologischer Phänotyp der *wobbler* Maus

Innerhalb der reinen *C57Bl/6J-wr*-Zucht konnte aufgrund des genetisch homogenen Hintergrundes keine Variation in der Ausprägung des *wobbler*-Phänotyps beobachtet werden. Dies betrifft sowohl den „Onset“, also den Zeitpunkt der sich im Phänotyp manifestierenden neurologischen Symptome als auch den klinischen Verlauf der Erkrankung.

Bei den für die Kartierung des *wr*-Locus durchgeführten Intraspezies Kreuzungen zwischen den Mausstämmen *Mus musculus C57Bl/6J-wr* X *M. m. castaneus* konnte bei ca. ¼ der Wobbler Nachzucht eine extreme Verstärkung des neurologischen Phänotyps beobachtet werden. Dieser Einfluss kann nur auf die vom Kreuzungspartner *Cast/Ei* eingebrachten modifizierenden Allele zurückgeführt werden. Da die betroffenen Wobbler nicht einheitlich sondern unterschiedlich stark modifiziert waren, war es für weitere Charakterisierungen und vor allem für die QTL Kartierung notwendig eine in sich homogene Untersuchungsgruppe zu bilden. Hierfür wurden die Tiere mit gleicher klinischer Symptomatik visuell typisiert und in Subphänotypen zusammengefasst.

Hauptkriterium war das zeitliche Auftreten der Atrophie der Hinterextremitäten, die im homogenen *C57Bl/6J* Hintergrund frühestens ab dem achten Lebensmonat, in der Regel jedoch erst im finalen Stadium der spinalen Muskelatrophie (SMA) auftritt. Bei den sehr stark betroffenen Wobbler-Tieren (WR*) konnten bereits um den Tag 40 p.n. erste Anzeichen einer Hinterbeinatrophy beobachtet werden, die in den folgenden sechs Lebenswochen zu einer vollständigen Paralyse der Hinterbeine führte. Nur Tiere aus dieser Gruppe wurden für weitere Untersuchungen eingesetzt. Eine Variation im Onset der Erkrankung sowie signifikante Schwankungen im Schweregrad der Atrophie der Vorderextremitäten konnten in keinem Fall beobachtet werden.

5.1.1 Phänotypisierung der WR*-Tiere

Als Folge der Muskelatrophie blieben die schwer betroffenen WR*-Tiere bezüglich ihres Körpergewichts gegenüber unmodifizierten Wobblern zurück. Aufgrund starker individueller Schwankungen wurde dieser Parameter zur Klassifizierung allerdings nicht genutzt.

Der progressivere neurologische WR*-Krankheitsverlauf korreliert eindeutig mit einer verstärkten Degeneration der Motoneuronen im Rückenmark. Ebenfalls kann die frühzeitige Atrophie der Hinterextremitäten durch die sich bis ins lumbale Rückenmark ausdehnende Neuronendegeneration erklärt werden. Als Folge der Neuronendegeneration konnte bereits von Rathke-Hartlieb et al. (1999) eine verstärkte Astrogliose und eine reaktive Mikroglia in der *wobbler* Maus nachgewiesen werden. Deren Ausmaß korreliert mit der Anzahl absterbender Neuronen in der WR*-Maus.

Indirekt kann die progressive Degeneration der Motoneuronen bzw. die dadurch bedingte Atrophie der Extremitäten über das Expressionsprofil des Acetylcholin-Rezeptor-Gens (*AChR*) geführt werden. Nicotinische Acetylcholinrezeptoren nehmen bei der Informationsübertragung zwischen motorischen Nerven und Muskeln eine zentrale Rolle ein. Als Folge einer fehlenden Innervierung kommt es zu einer Reaktivierung der Expression der Rezeptoruntereinheiten (Sehehizade et al., 1997). In der Extremitätenmuskulatur von WR*-Tieren konnte sowohl in den Vorderbeinen (triceps-Muskel) als auch in den Hinterbeinen (Gastrocnemius/Soleus-Muskel) eine signifikant verstärkte Reaktivierung der Expression des Transmitter-induzierten Ionenkanals nachgewiesen werden.

Die immunhistologischen und molekularbiologischen Befunde belegen eindeutig eine verstärkte neurologische Pathologie des WR-Phänotyps und damit die Existenz modifizierender Gene der *wr*-Mutation. Die Identifizierung solcher „Modifizier“ Gene, bzw. ihrer Pathomechanismen könnte einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der Ätiologie und Pathogenese neurologischer Erkrankungen leisten.

5.1.2 QTL-Kartierung

Ca. 15% der gesamten Wobbler-Nachzucht entsprach dem o.a. WR*-Phänotyp. Zur QTL-Kartierung wurde basierend auf den Daten von 18 genotypisierten WR*-Tieren eine genomweite Kopplungsanalyse mit dem „Interval Haplotype Analysis“ Programm von Neuhaus und Beier (1998) durchgeführt. Ein den WR-Phänotyp negativ modifizierender QTL (*wrmod1*) konnte auf dem Chromosom 14 der Maus mit einer Kopplungswahrscheinlichkeit von 83,3% ermittelt werden. Innerhalb des QTLs zeigten die betroffenen WR*Tieren sowohl heterozygote (*Cast/BL6*) als auch

homozygote *CAST/Ei* Allelverteilungen und lieferten somit den Beleg für einen dominant vererbten *wrmod1* Locus.

Aufgrund der Heterogenität der neurologischen Phänotypen kann auch von der Existenz weiterer Ko-Modifizierer ausgegangen werden, die vermutlich in Kombination miteinander bzw. mit unterschiedlichen Effektstärken den WR-Phänotyp beeinflussen. Die Kopplungen zu Chromosom 13 (71,0%) und Chromosom 17 (61,1%) unterstützen diese Vermutung.

Mit einer sich anschließenden Feinkartierung des Chromosoms 14 mit 18 polymorphen Mikrosatellitenmarkern, polymorph zwischen *C57Bl/6J* und *Cast/Ei* bzw. mit der Auswertung von zwei Rekombinationsereignissen innerhalb der kongenen QTL-Zucht konnte die Region auf einen Bereich von 10,6 Mb eingeschränkt werden.

Die gegensätzlichen Rekombinationsereignisse der WR* Tiere 5 und 16 in der F₂-Segregationskartierung hängen vermutlich damit zusammen, dass die auf anderen Chromosomen lokalisierten QTLs mit vergleichbaren Effektstärken sehr ähnliche Phänotypen hervorbringen und somit keine eindeutige Genotyp – Phänotyp Korrelation zulassen. Ebenso können QTLs mit unterschiedlichen Effektstärken durch ihr additives Zusammenwirken einen Schwellenwert überschreiten und zur Manifestation des beobachteten Phänotyps führen. Unter Umständen existieren auch im C57Bl/6J-Hintergrund genetische Faktoren die mit den QTLs mehr oder weniger stark interagieren und irreführende Kartierungsergebnisse zur Folge haben.

Die nicht eindeutigen Kartierungsergebnisse innerhalb der kongenen Linie (gegenläufiges Rekombinationsereignis des Tieres Nr. 6) könnten auch auf einer falschen Klassifizierung beruhen. Alle WR*-Tiere wurden ausschließlich über den Onset der Hinterbeinatrophy bzw. der vollständigen Paralyse derselbigen innerhalb der ersten zehn Lebenswochen in Subphänotypen zusammengefasst. Tiere, die eigentlich der intermediären Gruppe angehören, könnten durch unentdeckte Infektionskrankheiten, ungenügende Mausepflege oder aber unzureichende Versorgung in ihrer Gesamtverfassung so beeinträchtigt worden sein, dass es zu einer falschen Diagnose und somit auch zu einer falschen Typisierung kam. Diese Annahme ist in sofern berechtigt, da die verwendeten Tiere aus einer konventionellen Mausehaltung stammen und somit keine Hygieneüberwachung bzw. eine mikrobiologische Standardisierung im Sinne einer SPF-Haltung durchgeführt wurde.

Des Weiteren wurden nur drei Rückkreuzungen durchgeführt, wodurch der genomische castaneus-Anteil im *C57Bl/6J* Hintergrund um 87,5 % reduziert wurde. Mit den restlichen 12,5% könnten rein zufällig und nicht selektiv weitere QTLs in die kongene Linie transferiert worden sein und so zu konträren Kartierungsergebnissen geführt haben.

Zudem kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass auf dem Chromosom 14 zwei für die *wr*-Mutation spezifische QTLs kartieren.

Die inkomplette Penetranz spiegelt sich nicht nur in der zwar signifikanten aber doch nicht absoluten Kopplung zwischen *wrmod1* und *Cast/Ei*-Allelen wieder. Bei völlig „normalen“ Wobblern ohne verstärkte neurologische Symptomatik konnten am *wrmod1* Locus castaneus Allele nachgewiesen werden. Ebenso zeigten reinerbige castaneus Wildtypen keinerlei neurologische Symptomatik wie z.B. akkumulierte Neurofilamente im Perikaryon oder eine axonale Atrophie.

5.1.2.1 Kandidatengenbereich *wrmod1*

Innerhalb des 10,6 Mb großen *wrmod1* kritischen Intervalls, flankiert von den proximalen Mikrosatelliten *D14Mit154* und dem distalen Mikrosatellitenmarker *D14Mit39*, stellten anfangs alle dort lokalisierten Gene (www.ensembl.de) aufgrund ihrer Position potentielle Kandidatengene dar.

Obwohl keine generelle Aussage über Gene gemacht werden kann, die ursächlich für motorische Systemerkrankungen verantwortlich sind (vgl. Tab. 2) wurde versucht all jene Gene herauszufiltern, die in der Entwicklung, Funktion und Aufrechterhaltung von Neuronen eine Rolle spielen.

Aus den ca. 120 Kandidatengenen konnten in diesem ersten Schritt die Gene Clustrin (*Clu*), cathepsin B (*Ctsb*) und die Neurofilamente leichte (*Nfl*) und mittlere (*Nfm*) Kette bestimmt werden.

In einer zweiten Annäherung wurde daraufhin eine breit angelegte Literaturrecherche durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die bereits im Kontext mit neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben wurden.

In diesem Zusammenhang fielen wiederum die Gene für die leichten und mittleren Proteinuntereinheiten des Neurofilaments auf. Neben der neuronenspezifischen Expression existierte eine direkte Verbindung zu neurodegenerativen Erkrankungen, in deren Verlauf häufig abnormale Neurofilamentablagerungen beobachtet werden konnten. Zeitgleich mit dem Abschluss der QTL-Kartierung wurde von Pernas-Alonso

et al., (2001) eine Überexpression von Neurofilament im zentralen Nervensystem von WR-Tieren nachgewiesen. Aufgrund dieser Hinweise wurde versucht die Rolle des Neurofilaments im Zusammenhang mit der *wr*-Mutation bzw. einen möglichen modifizierenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf herauszuarbeiten.

5.1.2.2 Kandidatengen Neurofilament mittlere Kette (*Nfm*)

Neurofilament Proteine (Nf-P) gehören der Gruppe der Intermediärfilamente an und sind zusammen mit den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten an der Bildung des Zytoskeletts beteiligt. Neben der stabilisierenden, gestaltgebenden Funktion bilden Neurofilamente ein Gerüst zur Organisation von Mitochondrien und Mikrotubuli (Hirokawa, 1991). Eine besondere Rolle spielen die Neurofilamente bei der Entwicklung bzw. Aufrechterhaltung der Integrität von langen, großkalibrigen Axonen wie sie vorwiegend in Motoneuronen vorkommen. Hier nehmen die Neurofilamente bei der Ausbildung des Cytoskeletts eine raumfüllende Funktion ein. Der Durchmesser der Nerven wird indirekt über Phosphorylierungen der glutaminreichen Schwanz-Domäne reguliert indem über die Abstoßung der negativ geladenen Phosphatgruppen der Abstand der Filamente beeinflusst wird.

Strukturell sind sie in den großkalibrigen Axonen in Längsrichtung orientiert und kommen dort ca. drei- bis zehnmal so häufig wie Mikrotubuli vor. Mengenmäßig bilden sie ca. 13% des gesamten bzw. 54% des unlöslichen Proteins und sind somit die am häufigsten vorhandenen fibrillären Komponenten des Axons (Grant and Pant, 2000). In der Zelle liegen die Nf-P meist vollständig polymerisiert in 10 nm Fasern vor.

Entsprechend ihres Molekulargewichtes werden die Neurofilamente in eine leichte (*Nfl* ~ 68kD), eine mittlere (*Nfm* ~ 160kD) und eine schwere Untereinheit (*Nfh* ~ 200kD) eingeteilt (Shaw, 1998). Allen Intermediärfilamenten gemeinsam ist eine zentrale rod-Domäne, bestehend aus zwei helikalen Untereinheiten (coiled-coil), die jeweils von einer nicht helikalen aminoterminalen head-domäne und einer carboxyterminalen tail-domäne flankiert werden (Kandel et al., 1995).

Die Polymerisation über Dimere zu Protomeren bis hin zu den endgültigen Intermediärfilamenten wird durch die Phosphorylierung bestimmter Epitope der aminoterminalen head-Domäne reguliert (Julien und Mushynski, 1998; Pant et al., 2000). Eine Assemblierung in 10 nm Filamenten setzt jedoch die Anwesenheit der NF-L- Untereinheit voraus. Interessanterweise sind Neurofilamente für die neuronale

Entwicklung aber nicht zwingend erforderlich. *Nfl* „knock-out“ Mäuse bildeten zwar Axone mit signifikant reduziertem Durchmesser und eine teilweise auftretende Axonopathie aus, wiesen sonst allerdings ein weitgehend intaktes Nervensystem auf (Zhu et al., 1997). Vermutlich können andere Filamentsysteme den Ausfall der Neurofilamente kompensieren, da neben der Überexpression von *Nfm* und *Nfh* ebenfalls eine Zunahme an axonalen Mikrotubuli nachgewiesen wurde.

Des Weiteren können über spezielle Proteine, die zu einer Quervernetzung der Neurofilamente mit anderen Filamentsystemen führen, Verbindungen aufgebaut werden (Houseweart et al., 1999). Eine Verknüpfung der Neurofilamente mit Aktin und Mikrotubuli kann z.B. über die neuronale Isoform des multifunktionellen „bullous pemphigoid antigen“ (BPAG) erfolgen. Inwieweit die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der beteiligten Filamentsysteme dadurch moduliert werden ist bisher nicht bekannt.

5.1.2.2.1 Neurofilament - Aggregation versus Phosphorylierung

Im Hirnstamm (*nucleus vestibularis*) von *WR**-Tieren konnten NF-Akkumulationen im Perikaryon von Neuronen und vereinzelt in Motoneuronen des Rückenmarks immunhistochemisch nachgewiesen werden. Sporadisch traten diese auch im *WR*-Hirnstamm, jedoch kaum im Rückenmark auf. Eine genaue Quantifizierung der NF-positiven Neuronen in den entsprechenden neuronalen Geweben konnte nicht durchgeführt werden, da nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung stand. Die pathologisch abnormen Ablagerungen von Neurofilamenten sind im Zusammenhang mit der *wr*-Mutation sicherlich sekundärer Natur führen aber zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung von Funktion und Morphologie der Motoneuronen.

Nf-Akkumulationen treten häufig als charakteristisches Merkmal humaner neurodegenerativer Erkrankungen auf. Bei der Amyotrophen Lateral Sklerose können z.B. NF-Ablagerungen im Perikaryon und in proximalen Axonen der spinalen Motoneurone nachgewiesen werden (Hirano, 1996). Bei Morbus Parkinson treten Neurofilament immunreaktive Lewy-Körper auf (Galvin et al., 1997) und bei Morbus Alzheimer Neurofilament-positive neurofibrilläre „tangles“ (Lee et al., 1988). Im Kontext der Erkrankungen sind die Ursachen der Neurofilamentablagerungen bisher nicht eindeutig interpretierbar, nachweislich führten aber eine Dysregulation der Expression (vgl. 5.1.2.2.4) sowie verschiedene Mutationen (vgl.5.1.2.2.5) in den Nf-Untereinheiten zu abnormen Ablagerungen.

Interessanterweise liegen die akkumulierten Neurofilamente bei neurodegenerativen Erkrankungen hyperphosphoryliert vor (Miller et al., 2001). Ganz im Gegensatz zur physiologischen Phosphorylierung, die im Perikaryon und in den proximalen Axonen gering ist, in distalen Regionen des Axons dagegen stark zunimmt. Gleichfalls korreliert der Transport der Neurofilamente in bzw. durch die großkalibrigen Axone zur Bildung des Cytoskeletts das wiederum funktionell in den allgemeinen Stofftransport der Axone eingebunden ist mit dem Grad der Phosphorylierung ihrer glutaminreichen terminalen Domäne (Jung et al., 1999; 2000; Yabe et al., 2001). Demzufolge könnte eine aberrante Phosphorylierung entsprechender Aminosäurereste der carboxyterminalen tail-Domäne die Akkumulationen begünstigen oder auslösen. Für den immunhistochemischen Nachweis der NF-Ablagerungen im ZNS der WR*-Tiere wurde allerdings ein vom Phosphorylierungszustand unabhängiger NF-M-Antikörper verwendet, so dass hier keine Aussage über eine mögliche Hyperphosphorylierung der akkumulierten Neurofilamente getroffen werden kann.

5.1.2.2 Neurofilament spezifische Phosphorylierungsmotive

Überwiegend werden in der tail Domäne Serinreste in Lys-Ser-Pro (KSP) Motiven phosphoryliert, die in NF-M Proteinen geklustert und in NF-H Proteinen mit über 50fachen Wiederholungen in sogenannten Multiphosphorylierungssites vorkommen (Elhanany et al., 1994; Betts et al., 1997; Pant and Veeranna, 1995). Die Aminosäuresubstitution Lysin / Glutaminsäure im Codon 609 des *castaneus Nfm*-Allels führt zu einer Veränderung des KSP-Motivs in ein ESP-Motiv innerhalb eines solchen Klusters [(KSPMPKSP≠KSPMPESP) vgl. Abb. 14] Die Aminosäuresubstitution betrifft zwar nicht den zu phosphorylierenden Serinrest, doch wird durch die Veränderung des KSP-Motivs womöglich ein neues Target für eine völlig andere Kinase mit physiologisch anderer Bedeutung generiert. Denkbar sind auch differenzierte Affinitäten der Kinasen zu den Motiven. Hierdurch könnte das Neurofilament Protein im pathologischen Kontext verändert bzw. fehlgesteuert werden, sodass es nicht mehr in die großkalibrigen Axone transportiert wird, sondern in der Nervenzelle in unlöslicher Form akkumuliert wird. Die besonders ausgeprägte lumbale Axonopathie der ventralen WR*-Nervenbahnen unterstützt die Theorie eines gestörten Transportes. Des weiteren scheinen KSP abhängige Phosphorylierungen die Nf-Untereinheiten vor proteolytischen Abbau zu schützen, da dephosphorylierte

Untereinheiten sehr schnell von Calpain, einer Calcium aktivierten Protease abgebaut werden (Goldstein et al., 1987; Pant 1988).

5.1.2.2.3 KSP-Motiv spezifische Kinasen

Bisher wurden u.a. die folgenden KSP-Motiv spezifischen Kinasen beschrieben: Mitogen-aktivierte Kinase (MAP Kinase) und Mitglieder der Stress-aktivierenden Kinasen (SAPK1), die Glycogen-Synthase Kinase-3 (GSK3) und die neuronale Cyclin abhängige Kinase (cdk5) (Pant und Grant, 2000). Inwieweit diese Kinasen in die abnormale Phosphorylierung des Neurofilaments involviert sind ist bisher nicht geklärt. In der Alzheimer Pathologie sind allerdings genau diese Proteinkinasen in die abnormale Phosphorylierung des Tau Protein verstrickt, das im hyperphosphorylierten Zustand seine Bindung an Mikrotubuli verliert und in der Nervenzelle unlösliche Aggregate in Form von Neurofibrillen bildet. Das Tau Protein zählt zu den Mikrotubuli assoziierten Proteinen und fungiert als Abstandhalter zwischen den Mikrotubuli, an denen die Motorproteine Kinesin und Dynein ihre Transportfunktion entfalten.

Ebenfalls konnten in der carboxyterminalen Domäne von Neurofilamenten weitere Phosphorylierungssites wie Valin-Serin-Prolin- (VSP) Lysin-Serin-Asparaginsäure- (KSD) und interessanterweise auch hochkonservierte Glutaminsäure-Serin-Prolin- (ESP) Motive identifiziert werden (Betts et al., 1997; Xu et al., 1992), über deren Kinase-Spezifität bzw. Affinität allerdings kaum Daten vorliegen.

Die hohe Konservierung der KSP-Motive zwischen den verschiedenen Mausstämmen, wie auch zwischen Maus, Ratte, Rind und Mensch bestärkt die Annahme, dass es sich um fundamentale Regulationseinheiten mit entsprechend großer physiologischer Relevanz handelt.

5.1.2.4. Transgene Mausmodelle

Wie an verschiedenen transgenen Mausmodellen gezeigt werden konnte, führt auch eine Deregulation der Neurofilament-Expression zu neuropathologischen Befunden. Eine Veränderung im Expressionsniveau des *Nfl* Gens bewirkt eine Schwellung des Perikaryons und der Axone. Phänotypisch kommt es zur Ausprägung einer schweren Muskelatrophie (Xu et al., 1993; Lee et al., 1994). Eine ähnliche, aber abgeschwächte neuronale Symptomatik entwickelten Mäuse mit einer erhöhten Expression des Gens für die schwere NF-M-Untereinheit (Cote et al., 1993). Collard et al. (1995) beschrieben zudem eine distale Atrophie der Axone bedingt durch einen gestörten axonalen Transport bei der Überexpression von mutierten *Nfl*.

Zusammenfassend zeigen alle Untersuchungsergebnisse an transgenen Mausmodelle mit veränderter Neurofilament Expression eine eindeutige Störung der Integrität der Motoneurone.

Die lumbale Axonopathie der ventralen Nervenbahnen der WR*-Tiere ist nach meinen Untersuchungen allerdings nicht durch eine Überexpression der *Nfl*- bzw. *Nfm*-Gene bedingt. Die durchgeführten Quantifizierungen mit dem light cycler-System konnte die von Rernas-Alonso et al. (2001) publizierte Überexpression von *Nfm* in Wobbler-Gewebe (Hirnstamm und Rückenmark) nicht bestätigen. Es ist deshalb anzunehmen, dass die beobachteten NF-Ablagerungen nicht durch eine Überexpression verursacht werden.

5.1.2.5 Risikogen Neurofilament ?

Bei weniger als 1% von 1300 untersuchten Patienten mit sporadischer, seltener mit familiärer ALS konnten Deletionen oder Insertionen in den KSP-Multiphosphorylierungsmotiven des NF-H Proteins an den Positionen 528, 790 (Figlewicz et al., 1994), 655, 663, 743 (Al-Chalabi et al., 1999), und 714 (Tomkins et al., 1998) identifiziert werden. Diese vereinzelt auftretenden Mutationen sind sicherlich nicht ursächlich für das Krankheitsbild der ALS verantwortlich, stellen aber möglicherweise Risikofaktoren dar, zumindest bei der sporadisch auftretenden Form der ALS. Mutationen in dem *Nfl*-Gen scheinen dagegen primär für die Entstehung von Motoneuronen Erkrankungen verantwortlich zu sein. Eine A998→C Punktmutation im CAG Codon 333 des ersten Exons führt zu einer Aminosäuresubstitution von Glutamin zu Prolin (Mersyanova et al., 2000) und

phänotypisch zur Ausprägung einer neuen Variante der Charot-Marie-Tooth (CMT) Typ 2 Erkrankung. In kürzlich durchgeführten Studien konnten zahlreiche weitere NF-L Mutationen bei CMT-Patienten identifiziert werden, die mit einem frühen Onset und einer verstärkten Pathogenese einhergehen (De Jonghe et al., 2001; Jordanova et al., 2003). Des Weiteren konnte bei einem Parkinson-Patienten mit besonders schweren Krankheitsbild eine Mutation in der NF-M Untereinheit (Gly336Ser) diagnostiziert werden (Lavedan et al., 2002).

Diese Untersuchungen belegen eindeutig, dass Mutationen in den verschiedenen Neurofilament-Untereinheiten für neurodegenerative Erkrankungen prädisponieren, diese modifizieren oder aber auch ursächlich für diese verantwortlich sein können. Neben den bereits diskutierten Aminosäureaustausch im KSP-Motiv konnten zwei weitere in der carboxyterminalen Domäne des castaneus *Nfm*-Gens identifiziert werden: Eine Mutation führt zum Aminosäureaustausch von Glutamin zu Histidin an Position 628, eine weitere zur Substitution von Leucin zu Prolin an Position 699. Der H628Q Austausch führt zwar zu einer Veränderung der Netto-Ladung des Proteins, der geringe Grad der Konservierung des Glutamins an dieser Position (nur in Nagern) deutet aber - wenn überhaupt - nur auf eine geringe funktionelle Relevanz hin. Die Substitution der hoch konservierten Aminosäure Prolin (in Säugern) zu Leucin tritt *C57Bl/6J*-stammspezifisch auf. Die Substitution ist insofern interessant, da Prolin durch die Versteifung der sonst beweglichen Bindung zur benachbarten Aminosäure einen "Wendeknick" bewirkt. Da allerdings der *C57Bl/6J*-Mausstamm das nicht konservierte Allel trägt, kann davon ausgegangen werden, dass das castaneus-Allel nicht für die Verstärkung des neurologischen Phänotyps verantwortlich ist. Unter Umständen könnte dem Bl6-Allel eine protektive Funktion zukommen.

5.1.3 Spezifität des *wr*-QTLs

Im Hinblick auf die physiologische und auch pharmakologische Relevanz sollte die Spezifität des *wrmod1* Locus untersucht werden bzw. der Frage nachgegangen werden, ob auch eine Modifizierung von pathologisch vergleichbaren, aber genetisch unterschiedlich determinierten motorischen Systemerkrankungen möglich ist. Hierfür wurde eine für die Fragestellung geeignete Mauslinie generiert. Als Donorstamm dienten F₁ *Cast/Bl6*-Hybride, als Akzeptorstamm wurde der hauseigene *C57Bl/6J-mdf* Mausstamm verwendet.

Die *mdf*-Mutation (muscle deficient) trat 1974 spontan im Inzuchtstamm *C57Bl/6J* auf (Womack et al., 1980) und zeigt einen autosomal rezessiven Erbgang. Kartiert wurde die *mdf*-Mutation auf dem Chromosom 19 der Maus (Sweet, 1983). Phänotypisch zeigen die betroffenen Tiere nach fünf bis sechs Wochen einen watschelnden Gang (waddling gait) der Hinterextremitäten mit gelegentlichem Tremor. Die Mutation ist durch eine progressive Motoneuronendegeneration (Blot et al., 1995) und einer intensiven Degeneration der Typ 1 und Typ 2 Muskelfasern charakterisiert. Die Lebenserwartung homozygoter Tiere (*mdf/mdf*) ist normal, allerdings sind die männlichen Tiere steril bzw. die Weibchen nur eingeschränkt fertil.

Da zur Zeit noch keine Diagnostik zur Verfügung steht, mußte der *mdf*-Allelstatus durch aufwändige Rückkreuzungen ermittelt werden, um anschließend heterozygote (*mdf/+*) Tiere mit F_1 *Cast/Bl6*-Hybriden zu verpaaren. Alle Nachkommen wurden mit verschiedenen Mikrosatellitenmarkern (*D14Mit253*, *D14Mit 154*, *D14Mit 224*, *D14Mit 94*) bzw. dem Deletions-Polymorphismus (vgl. Abb. 16) auf den QTL hin analysiert. Durch entsprechend durchgeführte Intercross-Kreuzungen wurden homozygote *mdf*-Mäuse generiert, die entweder heterozygote oder homozygote castaneus Allelverteilungen bezogen auf Chromosom 14 bzw. den QTL zeigten. Bei keinem dieser zur Zeit ca. 1 Jahr alten Tiere ($n=5$) konnte bis heute ein den neurologischen Phänotyp modifizierender Einfluss beobachtet werden. Mit diesen Ergebnissen kann allerdings zur Zeit noch nicht eine mögliche Interaktion zwischen der *mdf*-Mutation und *wrmod1* ausgeschlossen werden. Eine geringe QTL-Effektstärke könnte in Verbindung mit der *mdf*-Mutation entweder phänotypisch nicht in Erscheinung treten oder sich erst in einem späteren Lebensalter manifestieren. Zudem sollte neben der aus Zeitgründen vorgenommenen visuellen Phänotypisierung immer eine detaillierte Analyse der verschiedensten histologischen und biochemischen Parameter erfolgen. Auch könnte ein auf Microarray basierendes spezifisches Expressionsprofil erstellt werden um nach differenziell exprimierten Genen zu suchen.

5.1.4 Weitere QTLs der *wr*-Mutation

Mit dem Kartierungsprogramm (Interval-Haplotype-Analysis) von Neuhaus und Beier (1998) konnten zwei weitere *wr*-abhängige QTLs auf den Chromosomen 13 und 17 kartiert werden. Basierend auf der Genotypisierung von 18 *WR**-Tieren konnte eine chromosomale Kopplungswahrscheinlichkeit von 71,0% auf Chr.13 und 61,1% auf

Chr.17 ermittelt werden. Eine sich anschließende Segregationskartierung mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern ergab zwar keine eindeutige Regionen mit ausschließlich homozygoten *Cast/Ei*- oder heterozygoten *Cast/Bl6*-Allelen, was letztendlich auch aufgrund des polygenen Vererbungsmodus nicht zu erwarten war. Distal vom Mikrosatelliten *D13Mit108* auf Chromosom 13, bzw. proximal vom Mikrosatelliten *D17Mit66* auf Chromosom 17 konnten allerdings nur bei einem von dreizehn Tieren homozygote *C57Bl/6J*-Allele gefunden werden. Zur Verifizierung der QTL-Kartierung bzw. um die Fehlerquelle falsch positiv detektierter QTLs zu minimieren sollten alle weiterhin auftretenden WR*-Phänotypen in einer für das verwendete Intervall-Programm erforderlichen genomweiten Kopplungsanalyse genotypisiert werden. Des weiteren könnten die QTLs in einer kongenen Mauslinie überprüft werden, indem sie separat oder in verschiedenen Kombinationen mit *wrmod1* eingekreuzt werden. Eine sich anschließende genaue Phänotypisierung der WR-Nachkommen könnte Hinweise auf die Effektstärken oder die Abhängigkeiten zueinander geben.

Auf dem Chromosom 13 konnten bereits zwei QTLs für neurodegenerative Erkrankungen kartiert werden (*nmd*-Mutation, Cox et al., 1998; ALS mouse model, Kunst et al., 2000), wodurch die Annahme eines hier lokalisierten *wr*-QTLs genährt wird bzw. es auch durchaus denkbar wäre, dass einer dieser QTLs einen modifizierenden Einfluss auf den *wobbler* Phänotyp ausübt.

5.1.4.1 Intermediäre WR-Phänotypen

In die Gruppe der intermediären Wobbler wurden alle Tiere eingeteilt, bei denen die Atrophie der Hinterbeine zu einem Zeitpunkt auftrat, der zwischen dem der WR* und dem der „normalen“ WR-Tiere lag. Des weiteren konnte bei keinem dieser Mäuse eine vollständige Paralyse der Hinterextremitäten wie bei den WR*-Tieren beobachtet werden. Innerhalb des Zeitrahmens der vorliegenden Arbeit wurden den intermediären Wobblern (n=44) lediglich Gewebeproben entnommen, um zumindest die Voraussetzung für weitere Analysen bzw. QTL-Kartierungen zu ermöglichen.

5.1.5 Kongene Zuchtstrategie

In einer speziellen Kreuzungsstrategie konnten die Kartierungsdaten verifiziert werden. Durch die Etablierung der kongenen Mauslinie konnte der Anteil der negativ

modifizierten WR*-Phänotypen von 15% auf 45% gesteigert werden. Auch in dieser Wobbler-Nachzucht konnte wieder eine Heterogenität der WR-Phänotypen beobachtet werden, obwohl der castaneus Hintergrund mit jeder Rückkreuzung um 50% reduziert wird. Bei drei durchgeführten Rückkreuzungen sind an der Ausprägung des Phänotyps nur noch ca. 12,5% castaneus Allele beteiligt. Unter Umständen finden hier Interaktionen zwischen dem *wrmod1* Locus und protektiven Genen aus dem *C57Bl/6J* Hintergrund statt, die zur unvollständigen Penetranz führen.

5.1.6 Differenzielle Genexpressionsanalyse

Mit der Analyse der differentiellen Genexpression können krankheitsrelevante und auch QTL abhängige Gene der Wobbler Krankheit aufgespürt werden. Ein Vergleich der mRNAs aus den betroffenen Geweben wie Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark zwischen WT- und WR*-Tieren kann wichtige Anhaltspunkte über differentiell exprimierte cDNAs liefern und damit direkte Einblicke in die pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung geben.

In Zusammenarbeit mit der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München) wurde eine Bio-Chip-Analyse zur differentiellen Genexpression im Rückenmarksgewebe durchgeführt. Um individuelle Schwankungen in der Genexpression so weit wie möglich zu minimieren, wurden jeweils Gewebeproben von fünf adulten Wildtypen und modifizierten Wobbler-Tieren gepoolt und die aufgereinigten mRNAs zur Hybridisierung in der Microarray-Technik eingesetzt. Mit Hilfe dieser Technik können in einem einzigen Durchlauf alle differentiell exprimierten Gene herausgefiltert werden, deren „counterparts“ auf dem Microarray repräsentiert sind und somit die aktuelle Genaktivität zum Zeitpunkt der Gewebspräparation ermittelt werden. Der von der Arbeitsgruppe um J. Becker hergestellte und verwendete Microarray (2003) repräsentiert ca. 20.000 Mausgene und enthält somit ca. 75% des codierenden Mausgenoms. Insgesamt konnten dreizehn differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden, von denen allerdings keines auf den mit WR* gekoppelten Chromosomen 13, 14 und 17 lokalisiert ist. Inwieweit diese Gruppe primär mit der *wr*-Mutation bzw. mit dem *wrmod1* Locus assoziiert ist oder falsch positive Signale darstellen hängt im Wesentlichen von der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse ab.

5.2 Modifizierende Gene der WR-Spermatogenese

Analog zur Identifizierung des neuronalen *wrmod1* Locus der *wobbler* Maus sollte neben der weiteren Charakterisierung des WR^s Phänotyps die Analyse möglicher Kandidatengene stehen. Der bereits von A. Mussmann (Diplomarbeit, 2002) kartierte *wrsprm* QTL erstreckt sich über eine Region von ca. 20 cM und wird distal vom Mikrosatelliten *D10Mit118* flankiert. Innerhalb dieser Region konnten über Datenbankrecherchen fünf testisspezifische Gene ermittelt werden, bei denen allerdings keine differenzielle Genexpression zwischen WT und WR^s nachgewiesen werden konnte (pers. Mitteilung A. Mussmann, laufende Dissertation, 2003). In diesem Zusammenhang ist es zwingend erforderlich den Kandidatengenintervall zu verringern. Hierzu sollte die kongene Zuchtstrategie intensiviert und nach Rekombinationsereignisse innerhalb des Intervalls gescreent werden.

Des Weiteren sollte die Funktionalität der modifizierten Spermien mittels in vitro Fertilisation (IVF) eindeutig nachgewiesen werden. Hierfür sollten Spendertiere mit dem höchsten prozentualen Anteil an morphologisch intakten Spermien genutzt werden. Zudem sollten die aus der IVF erhaltenen Zweizellstadien in entsprechende Leihmütter transferiert werden, um über die Nachkommen den direkten Fertilitätsnachweis zu führen.

Die identifizierten WR* und WR^s-Tiere treten völlig unabhängig voneinander auf. Im Laufe dieser Arbeit konnten sowohl Tiere mit ausschließlich veränderter neurologischer Symptomatik bzw. solche mit modifizierter Spermio-genese beobachtet werden, als auch solche bei denen beide Defekte modifiziert waren.

5.3. Ausblick

Vordringliches Ziel sich anschließender Arbeiten sollte es sein, einen zweifelsfreien Nachweis darüber zu führen, in welcher Art und Weise das mutierte castaneus *Nfm*-Allel in die Pathogenese der *wr*-Mutation involviert ist. Eine genaue Analyse des Phosphorylierungsmusters mit diagnostischen Antikörpern gegen Epitope des mutierten KSP-Motivs wären hierfür sicherlich hilfreich. Ebenso eine vorherige Säulen-chromatographische Aufreinigung der NF-M-Proteine.

Eine hypothetisch angenommene Translokationsstörung der NF-M Untereinheit in die distalen Bereiche der Axone könnte sich in einer Reduktion der motorischen Axonkaliber im *C57Bl/6J-mdf* -Hintergrund zeigen ohne dabei einen Phänotyp

hervorzurufen. Eine Analyse der Durchmesser der lumbalen Axone der motorischen Nervenfasern ist bereits in Planung. Des Weiteren sollte der Einfluss aberranter Phosphorylierungen der Neurofilamente auf deren assoziierte Proteine bzw. auf deren modulierende Eigenschaften untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte in diesem Zusammenhang auf die Motorproteine des Mikrotubuli-Dynein-Kinesin-Systems gelegt werden. Diese Translokationsproteine sind maßgeblich am Aufbau motiler Strukturen beteiligt. Hierfür würden sich entweder radioaktiv markierte oder NF-M/GFP-Fusionsproteine anbieten, deren axonaler Transport in Zellkulturen analysiert werden könnte.

Das es sich bei dem Modifier *wrmod1* tatsächlich um das castaneus *Nfm*-Allel handelt, kann nur in ein „knock-in“ Experiment zweifelsfrei nachgewiesen werden. Hierzu müsste das castaneus *Nfm*-Allel über embryonale Stammzellen in den C57Bl/6J-*wr* Hintergrund transferiert und die transgenen WR-Nachkommen auf den WR*-Phänotyp untersucht werden.

Zur Überprüfung der Spezifität sollte durch entsprechende Verpaarungsstrategien der *wrmod1* Locus selektiv in andere neurodegenerative Mausmutanten eingebracht werden. Ergeben sich hieraus Anhaltspunkte auf weitere modifizierende Einflüsse, könnten sich vielleicht therapeutische Ansätze entwickeln, die auch für die Behandlung von humanen spinalen Muskelatrophien von großem Interesse wären.

Zudem sollten die Kartierungen der QTLs *wrmod 2* (Chr.13) und *wrmod 3* (Chr. 17) weiter vorangetrieben werden. Entsprechendes gilt für die Kartierung von möglichen QTLs der intermediären WR-Phänotypen bzw. deren exakte Charakterisierung.

6. Literaturverzeichnis

Abdalla, JA., Casley, WL., Cousin, HK., Hudson, AJ., Murphy, EG., Cornelis, FC., Hashimoto, L., Ebers, GC. (1992) Linkage of Thomsen disease to the T-cell receptor beta (TCRB) locus on Chromosome 7q35. *Am. J. Hum. Genet.* 257:579-584

Adams, MD., Celniker, SE., Holt, RA., Evans, CA., Gocayne, JD., Amanatides, PG., Scherer, SE., et al. (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster* *Science* 287: 2185-2195

AL-Chalabi, A., Andersen, PM., Nilsson, P., Chioza, B., Andersson, JL., Russ, C., Shaw, CE., Powell, JF., Leigh, PN. (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 8, 157-64.

Andrews, JM., Gardner, MB., Wolfgram, FJ., Ellison, GW., Porter, DD., Brandkamp, WW. (1974) Studies on a murine form of spontaneous lower motoneuron degeneration - the wobbler (*wr*) mouse. *Am. J. Pathol.* 76: 63-78

Antonarakis, SE., McKusick, VA., (2000) Omim passes the 1`000-disease-gene mark. *Nature Genet.* 25: 119

Anunciado, RV., Ohno, T., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Nishimura, M., Namikawa, T. (2000) Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis. *Exp. Anim.* 49: 217-24

Augustin, M., Heimann, P., Rathke, S., Jockusch, H. (1997) Spinal muscular atrophy gene *wobbler* of the mouse: Evidence from chimeric spinal cord and testis for cell-autonomous function. *Dev. Dyn.* 209: 286-295

Bachus, R., Claus, A., Meyer, T., Riepe, M., Lodolph, AC. (1997) Molekularbiologische Befunde der amyotrophen Lateralsklerose. *Nervenarzt* 68: 785-791

Balling, R. (2002) Vortrag: Tanz der Genome. Weimar Conference of Genetics. Weimar

Balling, R., Brown, S.D.M., Hrabe`de Angelis, M., Justice, M., Nadeau, J., Peters, J. (2000) Great times for mouse gene genetic: Getting ready for large scale ENU-mutagenesis. *Mamm. Genome* 11: 471

Beck, JA., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Epping, JT., Festing, MFW., Fischer, MC. (2000) Genealogies of the mouse inbred strains. *Nature Genet.* 24: 23-25

- Belkamp, JK., Hitzemann, R., Crabbe, JC., Phillips, TJ., Buck, KJ., Williams, RW. (2001) QTL analysis and genomewide mutagenesis in mice: complementary genetic approaches to the dissection of complex traits. *Behav. Genet.* 31: 5-15
- Betts, JC., Blackstock, WP., Ward, MA., Anderton, BH. (1997) Identifikation of phosphorylation sites on neurofilament proteins by nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 272: 12922-12927
- Blot, S., Poirier, C., Dreyfus, P. (1995) The mouse mutation muscle deficient (mdf) is characterized by a progressive motoneuron disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54: 812-825
- BMBF -Bundesministerium für Bildung und Forschung- (2001) Die Humangenomforschung in Deutschland. Stand, Perspektiven, Visionen. Bonn
- Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, HR. et al. (2001) Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J. Clin. Invest.* 108: 1705-1715
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J. et al. (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genet.* 22: 231-238
- Chagnon, YC., Perusse, L., Weisnagel, SJ., Rankinen, T., Bouchard, C. (2000) The human obesity gene map: The 1999 update. *Obes. Res.* 8: 89-117
- Chambers, DM., Peters, J., Abbott, CM. (1998). The lethal mutation of the mouse wasted (wst) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform of translation elongation factor 1alpha, encoded by the Eef1a2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 4463-8.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-9
- Collard, JF., Cote, F., Julien, JP. (1995) Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 375: 61-64
- Collins, FS. (1992) Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nature Genet.* 1: 3-6
- Collins, FS. (1995) Positional cloning moves from positional to traditional. *Nature Genet.* 9: 347-350

Cote, F., Collard, JF., Julien, JP. (1993) Progressive neuropathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73: 35-46

Cox, GA., Mahaffey, CL., Frankel, WN. (1998) Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele. *Neuron* 21: 1327-1337

Darvasi, A. (1998) Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat. Genet.* 18: 19-24

de Jonghe, P., Mersivanova, I., Nelis, E., del Favero, J., Martin, JJ., van Broeckhoven, C., Evgrafov, O., Timmerman, V. (2001) Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Ann. Neurol.* 49: 245-9

de Knijff, P., van den Maagdenberg, AMJM., Frants, RR., Havekes, LM. (1994) Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum. Mutat.* 4: 178-194

de Sanctis, GT., Merchant, M., Beier, DR., Dredge, RD., Grobholz, JK., Martin, TR., Lander, ES., Drazen, JM. (1995) Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57Bl/6J mice. *Nature Genet.* 11: 150-154

DHGP -Deutsches Humangenomprojekt- (2002) Von der Grundlagenforschung zur Anwendung in der modernen Medizin. Berlin

Dietrich, WF., Miller, J., Stehen, R., Merchant, MA., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, MJ., Ingalls, KA., O'Connor, TJ., *et al.* (1996) A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380: 149-152

Dietrich, WF., Miller, JC., Stehen, RG., Merchant, MA., Damron, D., Nahf, R., Gross, A., Joyce, Dc., Wessel, M., Dredge, RD., *et al.* (1994) A genetic map of the mouse with 4.006 simple sequence length polymorphisms. *Nat. Genet.* 7: 220-245

Doerge, RW. (2002) Multifactorial Genetics: Mapping and analysis of quantitative trait loci in Experimental populations. *Nature Reviews Genetics* 3: 43-52

Duchen, LW. and Strich, SJ. (1968) An hereditary motor neuron disease with progressive denervation of muscle in the mouse: The mutant „wobbler“. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 31: 535-542

Elhanany, E., Jaffe, H., Link, WT., Sheely, DM., Gainer, H., Pant, HC. (1994) Identification of endogenously phosphorylated KSP sites in the high-molecular-weight rat neurofilament protein. *J. Neurochem.* 63: 2324-2335

Falconer, DS. (1956) Wobbler (wr). *Mouse News Letters* 15: 22

Festing, MFW. (1994) Inbred strains of mice. *Mouse Genome* 92: 373-495

Figlewicz, DA., Krizus, A., Martinoli, MG., Meininger, V., Dib, M., Rouleau, GA., Julien, JP. (1994) Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 3: 1757-1761

Flint, J. and Mott, R. (2001) Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nature Reviews Genetics* 2: 437-445

Forssmann, WG., Ito, S., Weihe, E. (1977). An improved perfusion fixation method for the testis. *Anat. Rec.* 188: 307-314

Frankel, WN. (1995) Taking stock of complex trait genetic in mice. *Trends Genet.* 11: 471-477

Fuchs, S. (2002) Mutationsanalyse von Kandidatengenen für die neurologische Mutation *wobbler* der Maus, Dissertation Universität Bielefeld

Galvin, JE., Lee, VM., Baba, M., Mann, DM., Dickson, DW., Yamaguchi, H., Schmidt, ML., Iwatsubo, T., Trojanowski, JQ. (1997) Monoclonal antibodies to purified cortical Lewy bodies recognise the mid-size neurofilament subunit. *Ann. Neurol.* 42: 595-603

Goffeau, A., Barrell, BG., Bussey, H., Davis, RW., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, JD., Jacq, C., Johnston, M., Louis, EJ., Mewes, HW., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, SG. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 25: 563-567

Goldstein, ME., Cooper, HS., Bruce, J., Carden, MJ., Lee, VM., Schlaepper, WW. (1987) Phosphorylation of neurofilament proteins and chromatolysis following transection of rat sciatic nerve. *J. Neurosci.* 7: 1586-1594

Grant, P. and Pant, HC. (2000) Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytology* 29: 843-872

Green, SL. und Tolwani, RJ. (1999). Animal models for motor neuron disease. *Lab. Anim. Sci.* 49: 480-7

Grisel, EJ. (2000) Quantitative Trait Locus Analysis. *Alcohol Research & Health.* 24: 3169-3174

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (2002) Vom Schlüssel zur Funktion: Genforschung in der GSF. Neuherberg

Hafezparast, M., Ahmad-Annuar, A., Wood, NW., Tabrizi, SJ., Fisher, MC. (2002) Mouse models for neurological disease. *Lancet. Neurology*. 1: 215-224

Hamilton, BA., Smith, DJ., Mueller, KL., Kerrebrock, AW., Bronson, RT., van Berkel, V., Daly, MJ., Kruglyak, L., Reeve, MP., Nemhauser, TL., Rubin, EM., Lander, ES (1997) The vibrator mutation causes neurodegeneration via reduced expression of P1TP alpha: positional complementation cloning and extragenic suppression. *Neuron* 18: 711-722

Heimann, P., Laage, S., Jockusch, H. (1991) Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse, wobbler (WR). *Differentiation* 47: 77-83

Henry, MT., Cave, S., Rendall, J., O'Connor, CM., Morgan, K. et al. (2001) An alpha1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 9: 273-278

Hillebrandt, HH., Bock, S., Lammert, F. (2001) Polygene Erkrankungen: Einsatz von Inzuchtstämmen für die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene. *Dtsch. Med. Wochenschrift* 126: 17-19

Hillebrandt, S., Streffer, C., Montagutelli, X., Balling, R. (1998) A locus for radiation induced gastroschisis on mouse chromosome 7. *Mamm. Genome* 9: 995-997

Hirano, A. (1996) Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* 47 (Suppl 2): 63-66

Hirokawa, N. (1991) The neural cytoskeleton. Wiley-Liss & Sons, New York, 5-72

Holtzman, NA. (2001) Putting the search for genes in perspective. *International Journal of Health Services* 31: 445-461

Houseweart, MK., Cleveland, DW. (1999) Cytoskeletal linkers: new MAPs for old destinations. *Curr. Biol.* 9: 864-6

Hull, J., Vervaart, P., Grimwood, K., Phelan, P. (1997) Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* 52: 557-560

Jockusch, H. (1990) Molecular aspects of myotonia: the ADR mouse as a model. *J. Neurol. Sci.* 98 (Supl.), 9

Jordanova, A., de Jonghe, P., Boerkoel, CF., Takashima, H., de Vriendt, E., Ceuterick, C., Martin, JJ., Butler, IJ., Mancias, P., Papasozomenos, SCh., Terespolsky, D., Potocki, L., Brown, CW., Shy, M., Rita, DA., Tournev, I., Kremensky, I., Lupski, JR., Timmerman, V. (2003) Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 126: 590-7

Julien, JP. and Mushynski, WE. (1998) Neurofilaments in health and disease. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 61: 1-23

Jung, C., Yabe, JT. and Shea, TB. (2000) C-terminal phosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit correlates with decreased neurofilament axonal transport velocity. *Brain Res.* 856: 12-19

Jung, CW. und Shea, TB. (1999) Regulation of neurofilament axonal transport by phosphorylation in optic axons in situ. *Cell Motil. Cytoskel.* 42: 230-240

Justice, MJ., Jenkins, NA., Copeland, NG. (1992) Rekombinant inbred mouse strains: models for disease study. *Trends Biotechnol.* 10: 120-126

Kandel, ER., Schwartz, JH., Jessell, TM. (1995) Neurowissenschaften, eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Kao, CH., Zeng, ZB., and Teasdale, RD. (1999) Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216

Kaupmann, K., Simon-Chazottes, D., Guenet, JL. und Jockusch, H. (1992). Wobbler, a mutation affecting motoneuron survival and gonadal functions in the mouse, maps to proximal chromosome 11. *Genomics* 13: 39-43

Kim, KS., Larson, N., Short, T., Plastow, G., Rotschild, MF., (2000) A missence variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mamm. Genome* 11: 131-135

Klopp, N. (2002) The KORA cohort as control population for genetic studies in the NGFN. Vortrag: Weimar Conference of Genetics, Weimar

Korthaus, D. (1996). Feinkartierung des Gens *Mor2* für die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase auf Chromosom 11 der Maus in der Nähe des *wobbler*-Gens und eines Homologons MDH1 auf dem humanen Chromosom 2p. Diplomarbeit Universität Bielefeld

Korthaus, D., Wedemeyer, N., Wiegand, C., and Jockusch, H. (1996). The gene for cytoplasmic malate dehydrogenase, *Mor2*, is closely linked to the wobbler spinal muscular atrophy gene (*wr*). *Mamm. Genome* 7: 250

- Kunst, CB., Messer, L., Gordon, J., Haines, J. and Patterson, D. (2000) Genetic mapping of a mouse modifier gene that can prevent ALS onset. *Genomics* 70: 181-9
- Kutzner, M., Fischer, EP., Riedel, G. (2001) Neues vom Genom des Menschen. Genetik aktuell, Köln
- Laage, S., Zobel, G., Jockusch, H. (1988) Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal atrophy, wobbler. *Dev. Neurosci.* 10: 190-198
- Lammert, F., Wang, DQ-H., Paigen, B., Carey, MC. (1999) Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: integrated activities of hepatic lipid regulatory enzymes *J. Lipid Research* 40: 2080-2090
- Lander, ES., Linton, LM., Birren, B., Nussbaum, C., Zody, MC., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Lander, ES. and Schork, NJ. (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2048
- Lautenschläger, N., Kurz, A., Müller, U. (1999) Erbliche Ursachen und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit. *Nervenarzt* 70: 195-205
- Lavedan, C., Buchholtz, S., Nussbaum, RL., Albin, RL., Polymeropoulos, MH. (2002) A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci. Lett.* 322: 57-61
- Lee, VM-Y., Otvos, L., Schmidt, ML., Trojanowski, JQ. (1988) Alzheimer disease tangles share immunological similarities with multi-phosphorylation repeats in the two large neurofilament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 7384-7388.
- Lee, MK., Marszalek, JR., Cleveland, DW. (1994) Expression of a mutant neurofilament subunit causes massive selective motor neuron death and ALS-like motor neuron disease. *Neuron* 13: 975-988
- Leestma, JE., Sepsenwol, S. (1980) Sperm axoneme alterations in the wobbler mouse. *J. Reprod. Fertil.* 58: 267-270

Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-65

Lengeling, A. (1997). Klonierung und Charakterisierung neuer Kandidatengene für die pleiotrope Mutation *wobbler* der Maus, Dissertation Universität Bielefeld

Lincoln, S., Daly, M., Lander, ES. (1992) Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/QTL. Whitehead Inst. Tech. Rep. <http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software>

Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo. J.* 15: 3555-3565

Ludolph, AC. (1999) Motoneuronenerkrankungen. In: Berlit, P. (ed) Klinische Neurologie. Springer, Berlin, Heidelberg, 542-562

Lyons, PA., Armitage, N., Argentina, F., Denny, P., Hill, NJ., et al. (2000) Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, *Idd3*, to a 780-kb region of mouse chromosome 3: identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping. *Genome Res.* 10: 446-453

Manley, KF., Olson, JM. (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm. Genome* 10: 327-334

Martin, N., Jaubert, J., Gounon, P., Salido, E., Haase, G., Szatanik, M., Guenet, JL. (2002) A missense mutation in *Tbce* causes progressive motor neuronopathy in mice. *Nat Genet.* 32: 443-7

McNicholl, JM., Downer, MV., Aidoo, M., et al, (2000) Public health assessment of genetic susceptibility to infectious diseases: Malaria, Tuberculosis and HIV, in: Khoury, MJ., Burke, W., Thompson, EJ. (eds.) Genetics and Public Health in the 21st Century. Oxford University Press

Mersiyanova, IV., Perepelov, AV., Polyakov, AV., Sitnikov, VF., Dadali, EL., Oparin, RB., Petrin, AN. and Evgrafov, OV. (2000) A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 37-46.

Messer, A., Flaherty, L. (1986) Autosomal dominance in a late-onset motor neuron disease in the mouse. *J. Neurogenet.* 3 :345-55

Miller, CCJ., Ackerley, S., Brownlees, J., Grierson, AJ., Jacobsen, NJO., Thornhill, P. (2001) Axonal transport of neurofilament in normal and disease states. *Cell Mol. Life Science* 59: 323-330

Moore, KJ. and Nagle, DL. (2000) Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. *Annu. Rev. Genet.* 34: 653-686

Mott, R., Talbot, C., Turri, M., Collins, AC., Flint, JA. (2002) A new method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animals stocks. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97: 12649-12654

Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562

Mu, JL., Naggert, JK., Svenson, KL., Collin, GB., Kim, JH., McFarland, C., Nishina, PM., Levine, DM., Williams, KJ., Paigen, B. (1999) Quantitative trait loci analysis for the differences in susceptibility to atherosclerosis and diabetes between inbred Mouse strains C57BL/6J and C57BLKS/J. *J. Lipid Res.* 40: 1328-1335

Munsat, TL. and Davies, KE. (1992) International SMA Consortium meeting (26-28 June, 1992, Bonn, Germany. *Neuromuscul. Disord.* 2: 423-428

Mußmann, A. (2002) Kartierung und Charakterisierung eines Modifier Locus für den Spermotogenesedefekt der *wobbler* Maus, Diplomarbeit Universität Bielefeld

Murken, J., Cleve, H. (1996) Humangenetik. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Myers, EW., Sutton, GG., Delcher, AL., Dew, IM., Fasulo, DP., Flanigan, MF., Kravitz, SA., Mobarry, CM., Reinert, KHJ., Remington, KA., Anson, EL., Bolanos, RA., Chou, HH., Jordan, CM., Halpern, AL., Lonardi, S., Beasley, EM., Brandon, RC., Chen, L., Dunn, PJ., Lai, Z., Liang, Y., Nusskern, DR., Zhan, M., Zhang, Q., Zheng, X., Rubin, GM., Adams MD., Venter, JC. (2000) A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. *Science* 287: 2196-2204

Nadeau, JH., Frankel, WN., (2000) The road from phenotypic variation to gene discovery: mutagenesis versus QTLs. *Nature Genetics* 25: 381-384

Nadeau, JH., Singer, JB., Matin, A., Landers, ES., (2000) Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat. Genet.* 24: 221-5

Neuhaus, JM. and Beier, DR. (1998) Efficient localization of mutations by interval haplotype analysis. *Mamm. Genome* 9: 150-154

O'Brien, S.J., Nelson, G.W., Winkler, C.A., et al, (2000) Polygenic and multifactorial disease gene association in man: lessons learned from AIDS. *Ann. Rev. Genet.* 34: 563-591

Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P.Y., Frengen, E., Mammoser, A.G., Catanese, J.J., Hayashizaki, Y., de Jong, P.J. (2000). Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res.* 10: 116-28

Paigen, K. and Eppig, J.T. (2000) A mouse phenome projekt. *Mamm. Genome* 11: 715-717

Pant, H.C. (1988) Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem. J.* 256: 665-668

Pant, H.C. and Veeranna (1995) Neurofilament phosphorylation. *Biochem. Cell Biol.* 73: 575-592

Pant, H.C., Veeranna, and Grant, P. (2000) Regulation of axonal neurofilament phosphorylation. *Curr. Topics Cell Regul.* 36: 133-150

Pearn, J. (1978) Incidence, prevalence and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J. Med. Genet.* 10: 260-265

Pellizzoni, L., Kataoka, N., Charroux, B., Dreyfuss, G. (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95: 615-24

Pernas-Alonso, R., Schaffner, A.E., Perrone-Capano, C., Orlando, A., Morelli, F., Hansen, C.T., Barker, J.L., Esposito, B., Cacucci, F., di Porzio, U. (1996) Early upregulation of medium neurofilament gene expression in developing spinal cord of the wobbler mouse mutant. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38:267-75.

Pernas-Alonso, R., Perrone-Capano, C., Volpicelli, F., di Porzio, U. (2001) Regionalized neurofilament accumulation and motoneuron degeneration are linked phenotypes in wobbler neuromuscular disease. *Neurobiol. Dis.* 8: 581-9

Pioro, E.P. and Mitsumoto, H. (1995). Animal models of ALS. *Clin. Neurosci.* 3: 375-85

Plomin, R., Defries, J., McClearn, G.E., McGuffin, P. (2001). Behavioral genetics (4th ed.). New York: Freeman

Plomin, R., Owen, M.J., McGuffin, P. (1994) The genetic basis of complex human behaviors. *Science* 264: 1733-1739

Rathke-Hartlieb, S., Schmidt, VC., Schmitt-John, T., Bartsch, JW. (1999) Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *NeuroReport* 10: 3411-3416

Resch, K., Jockusch, H., Schmitt-John, T. (2001) Assignment of homologous genes, *Peli1/PELI1* and *Peli2/PELI2*, for the Pelle adaptor protein Pellino to mouse chromosomes 11 and 14 and human chromosomes 2p13.3 and 14q21, respectively, by physical and radiation hybrid mapping. *Cytogenetics Cell Genet.* 92:172-174

Resch, K., Korthaus, D., Wedemeyer, N., Lengeling, A., Thiel, C., Ronsiek, M., Baer, K., Jockusch, H., Schmitt-John, T. (1998) Homology between human Chr 2p13 and the *wobbler* critical region on mouse Chr 11: Comparative high resolution mapping of STS and EST loci on YAC/BAC contigs. *Mamm. Genome* 9: 893-898

Roman, B., Torres, AM., Rubiales, D., Cubero, JI., Satovic, Z. (2002) Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (*Orobanche crenata* Forsk) resistance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Genome* 45: 1057-63

Rosen, DR., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, DA., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D. et al., (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62

Rothschild, MF., Messer, L., Day, A., Wales, R., Short, T., Southwood, O., Plastow (2000) Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mamm. Genome* 11: 75-77

Rowland, LP. (1994) Amyotrophic lateral sclerosis: theory and therapies. *Ann Neurol.* 35: 129-130

Rubin, GM., Yandell, MD., Wortman, JR., George L. Miklos, G., Nelson, CR., Hariharan, IK., Fortini, ME., Li, PW., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, JM., Henikoff, S., Skupski, MP., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, MS., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, SE., Chervitz, SA., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, RF., Gelbart, WM., George, RA., Goldstein, LSB.; Gong, F., Guan, P., Harris, NL., Hay, BA., Hoskins, RA., Li, J., Li, Z., Hynes, RO., Jones, SJM., Kuehl, PM., Lemaitre, B., Littleton, JT., Morrison, DK., Mungall, C., O'Farrell, PH., Pickeral, OK., Shue, C., Vosshall, LB., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, XH., Zhong, F., Zhong, W., Gibbs, R., Venter, JC., Adams, MD., Lewis, S. (2000) Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science* 287: 2204-2215

Saiki, RK., Gelfand, DH., Stoffel, S., Scharf, SJ., Higuchi, R., Horn, GT., Mullis, KB., Erlich, HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, KB., Horn, GT., Erlich, HA., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-4
- Sambrook, J., Russell, DW. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schmidt, VC. (1997) Ausschluß des Gens *Cct4*, das die delta-Untereinheit des cytosolischen TCP-1 enthaltenden Chaperonin-Komplexes (CCT) kodiert, für die Mutation *wobbler* der Maus und weitere Eingrenzung des Kandidatengenbereichs auf dem proximalen Chromosom 11. Diplomarbeit Universität Bielefeld
- Schmitt-John, T., Schmidt, VC., Augustin, M., Korthaus, D., Jockusch, H. (1999) A new genetical strategy for the positional cloning of mouse disease genes. *Bioforum* 22: 86-90
- Schneider, J., Weitzel, H. (1995) *Pränatale Diagnostik und Therapie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Schork, NJ., Fallin, D., Lanchbury, S. (2000) Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin. Genet.* 58: 250-264
- Sedehizade, F., Klocke, R., Jockusch, H. (1997) Expression of nerve-regulated genes in muscles of mouse mutants affected by spinal muscular atrophies and muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 20: 186-194
- Shaw, G. (1998) *Neurofilaments*, Springer Berlin
- Silver, LM. (1995) *Mouse Genetics*. Oxford University Press
- Strachan, T., Read, AP. (1996) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Sweet, HO.(1983) Muscle deficient (mdf) mouse. *Mouse News Lett.*68: 72
- Symula, DJ., Frazer, KA., Ueda, Y., Deneff, P., Stevens, ME., et al. (1999) Functional screening of an asthma QTL in YAC transgenic mice. *Nat. Gen.* 23: 241-244
- Talbot, CJ., Nicod, A., Cherny, SS., Fulker, DW., Collins, AC., Flint, F. (1999) High-resolution mapping of quantitative trait loci in outbred mice. *Nature Genet.* 21: 305-308

- The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282: 2012-2018
- The International SNP Map Working Group (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928 – 933
- Tomkins, J., Usher, P., Slade, JY., Ince, PG., Curtis, A., Bushby, K., Shaw, PJ. (1998) Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *NeuroReport* 9: 3967-3970
- Toojinda, T., Siangliw, M., Tragoonrung, S., Vanavichit, A. (2003) Molecular Genetics of Submergence Tolerance in Rice: QTL Analysis of Key Traits. *Ann. Bot. (Lond)* 91: 243-253
- Ulbrich, M. (2000) Kartierung von Rekombinations-Bruchpunkten in der *wobbler* kritischen Region auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus. Diplomarbeit Universität Bielefeld
- Ulbrich, M., Schmidt, VC., Ronsiek, M., Mussmann, A., Bartsch, JW., Augustin, M., Jockusch, H., Schmitt-John, T. (2002) Genetic modifiers that aggravate the neurological phenotype of the wobbler mouse. *NeuroReport* 13: 535-539
- van Wezel, T., Ruivenkamp, CA., Stassen, AP., Moen, CJ., Demant, P. (1999) Four new colon cancer susceptibility loci, *Sccl6* to *Sccl9* in the mouse. *Cancer Res.* 59: 4216-4218
- Venter, JC., Adams, MD., Myers, EW., Li, PW., Mural, RJ., Sutton, GG., Smith, HO., Yandell, M., et al. The Sequence of the Human Genome (2001) *Science* 291: 1304-1351
- Vullhorst, D., Klocke, R., Bartsch, JW., Jockusch, H. (1998) Expression of the potassium channel KV3.4 in mouse skeletal muscle parallels fiber type maturation and depends on excitation pattern. *FEBS Lett.* 421: 259-262.
- Wade, CM., Kulbokas III, EJ., Kirby, AW., Zody, MC., Millikin, JC., Lander, ES., Lindblad-Toh, K., Daly, MJ. (2002) The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* 420: 574-578
- Wedemeyer, N., Lengeling, A., Ronsiek, M., Korthaus, D., Baer, K., Wuttke, M. Jockusch, H. (1996) YAC contigs of the *Rab1* and *wobbler* (*wr*) spinal muscular atrophy gene region on proximal mouse chromosome 11 and of the homologous region on human chromosome 2p. *Genomics* 32: 447-454

Weisgraber, KH., Rall, SC., Jr., Mahley, RW. (1981) Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J. Biol. Chem.* 256: 9077-9083

Williams, RW., Gu, J., Qi, S., Lu, L. (2001) The genetic structure of recombinant inbred mice: High resolution consensus maps for complex trait analysis. *Genome Biology* 2: preprint 0007.1-0007.44

Womack, JE., MacPike, A., Meier, H (1980) Muscle deficient, a new mutation in the mouse. *J. Hered.* 71:68

Xu, Z., Cork, LC., Griffin, JW., Cleveland, DW. (1993) Increased expression of neurofilament subunits NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73: 23-33

Xu, ZS., Liu, WS., Willard, MB. (1992) Identification of six phosphorylation sites in the COOH-terminal tail region of the rat neurofilament protein M. *J. Biol. Chem.* 267: 4467-4471

Yabe, JS., Chylinski, T., Wang, FS., Pimenta, A., Kattar, SD., Linsley, MD., et al. (2001) Neurofilament consist of distinct populations that can be distinguished by C-terminal phosphorylation, bundling and axonal transport rates in axonal neuritis. *J. Neurosci.* 21: 2195-2205

Zhu, Q., Couillard-Despre's, S., Julien, J. (1997) Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp. Neurology* 148: 299-316

7. Anhang

7.1 Publikationen

7.1.1 Genetic modifiers that aggravate the neurological phenotype of the wobbler mouse

NeuroReport, 2002, 13: 535-539

7.1.2 Comparative transcription map of the wobbler critical region on mouse chromosome 11 and homologous region on human chromosome 2p13-14

BMC Genetics 2002, 3: 14

Die Publikationen dürfen aus urheberrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht werden, können aber unter den folgenden Internetadressen abgerufen werden.

<http://www.lwwonline.com/article.asp?ISSN=0959-4965&VOL=13&ISS=4&PAGE=535>

<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/3/14>

7.2 verwendete Abkürzungen

Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
cer	cervikal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktosid
IVF	in vitro Fertilisation
Kb	Kilobasen
lum	lumbal
Mb	Megabasen
<i>Mit</i>	Massachusetts Institute of Technology
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nf	Neurofilament
Nf-P	Neurofilament Protein
o. a.	oben angegeben
o. g.	oben genannte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotation per minute
RT	reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Enzymeinheiten)
u.U.	unter Umständen
WR	Wobbler Phänotyp
WR*	stark modifizierter neurologischer Wobbler Phänotyp
WR ⁱ	intermediär modifizierter neurologischer Wobbler Phänotyp
WR ^s	in der Spermatogene modifizierter Wobbler Phänotyp
WT	Wildtyp Phänotyp
ZNS	zentrales Nervensystem

7.3 Bezugsquellen für Chemikalien

GIBCO BRL, Gaithersburg: Agarose Ultra Pure, Kanamycin, Sucrose

JT BAKER, Holland: Ethanol, Salzsäure, Wasserstoffperoxid

MERCK, Darmstadt: di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumacetat

ROTH, Karlsruhe: Phenol, EDTA, NaCl

SERVA; Heidelberg: Borsäure, Agar Agar, Lauroylsarcosine Na-Salt, Citrat,
Pepton Yeast Extract

SIGMA, Steinheim: D-Glucose, Isoamylalkohol, Glycerol, Isopropanol, Mineralöl,
β-Mercaptoethanol, Tris, BSA, Ampicillin, DTE

7.4 Bezugsquellen für Materialien und Geräte

ABIMED, Langenfeld: automatische Pipetten

BIOMETRA: Trio-Thermoblick (Thermocycler), F10-VC (temperierbares
Wasserbad)

EPPENDORF, Göttingen: Thermomixer 5436, Zentrifuge 5414, Photometer

HEREAUS CHRIST, Osterode: Biofuge A

HETTICH, Tuttligen: Rotanta/S (Tischzentrifuge)

JANKE & KUNKEL, Staufen i. Br.: Vibrofix (Vortex), Ikamag RET (Magnetrührer
mit Heizplatte)

SATRORIUS: 1403MP, universal (Feinwaagen)

SAVANT INSTRUMENTS INC.: Speed Vac Concentrator

TECHNE: Thermocycler Progene und Genius

Hiermit versichere ich, das ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie der Universität Bielefeld im Rahmen des DFG-Einzelprojektes SCHM 1276/1 angefertigt. Betreut wurde meine Arbeit von Prof. Dr. Harald Jockusch und PD Dr. Thomas Schmitt-John, für deren Unterstützung und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes ich mich ganz besonders bedanken möchte.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. J. Graw (GSF, München) für seine Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Für die vielen anregenden Gedanken die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen bedanke ich mich bei PD Dr. Jörg Walter Bartsch, gleiches gilt für Dr. Peter Heimann, der bei auftretenden Problemen stets mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Herrn Dr. David Baier möchte ich für die Bereitstellung und Handhabung des „Interval Haplotype Analysis“ Programms danken.

Dem gesamten W7-Team des Lehrstuhls danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft und die vielen kleinen und großen Tipps und Anregungen. Insbesondere die von diesem Team und den Betreuern geschaffene Arbeitsatmosphäre ermöglichte ein unbeschwertes und dennoch wissenschaftliches Arbeiten. An dieser Stelle möchte ich euch, Melanie, Sandra, Sylvana, Renate, Christiane, Marion, Anke, Uwe, Thomas, Daniela, Ralf, Carsten, Robert, Jana, Cora, Timo, Sonja, Christiane und Fokka nochmals danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie Anke und Flixli für deren Unterstützung und Geduld, aber vor allem für den glücklichen Umstand mit diesen beiden Menschen durchs Leben gehen zu dürfen.