

**„Untersuchungen zur Funktion und Regulation der
Rezeptor Tyrosin Phosphatase RPTPλ
bei der Entwicklung des Mittel- und Hinterhirns.“**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Anja Badde
geb. am 11.11.1977 in Münster

Mainz, 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2006

*"From the brain and the brain alone arise
our pleasures, joys, laughter and jests,
as well as our sorrows, pains and griefs."*

Hippocrates

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1.	Abstract / Zusammenfassung	IX
2.	Einleitung	1
2.1.	Organisatoren während der Entwicklung des zentralen Nervensystems von Wirbeltieren.....	2
2.2.	Entstehung und Organisation der Mittel- / Hinterhirnregion.....	3
2.3.	Genexpression am Mittel- / Hinterhirnorganisor.....	4
2.4.	Induktion des Mittel- und Hinterhirns durch die Signalwirkung von Fgf8	6
2.5.	Charakterisierung der Funktion von Wnt1 in der Mittel- / Hinterhirnregion	9
2.6.	Charakterisierung der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen Typ IIb.....	13
2.7.	Zielsetzung und experimentelles Vorgehen.....	17
3.	Material und Methoden	19
3.1.	Material	19
3.1.1.	Geräte.....	19
3.1.2.	Software.....	20
3.1.3.	Chemikalien.....	20
3.1.4.	„Kits“.....	21
3.1.5.	Nährmedien und Antibiotikallösungen für Bakterienkulturen.....	21
3.1.6.	Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	22
3.1.7.	Puffer, Marker und Enzyme für die Molekularbiologie.....	22
3.1.8.	Organismen.....	23
3.1.8.1.	Bakterienstämme.....	23
3.1.8.2.	Zelllinien.....	23
3.1.8.3.	Hühnchen.....	23
3.1.9.	Plasmide, Oligonukleotide und Expressionskonstrukte.....	24
3.1.9.1.	Plasmide.....	24
3.1.9.2.	Generelle Oligonukleotide.....	25
3.1.9.3.	Degenerierte Primer zur Klonierung von <i>cRPTPλ</i>	25
3.1.9.4.	Degenerierte Primer zum Nachweis von <i>cRPTPλ</i> mittels „One-Step RT-PCR“.....	26

3.1.9.5.	Primer zum Nachweis von <i>PCP-2</i> mittels „One-Step RT-PCR“	26
3.1.9.6.	Expressionskonstrukte.....	27
3.1.9.7.	Plasmide zur Herstellung von RNA-Sonden.....	28
3.1.10.	Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen.....	30
3.1.10.1.	Primärantikörper.....	30
3.1.10.2.	Sekundärantikörper.....	30
3.2.	Methoden	30
3.2.1.	Isolierung von Plasmid DNA.....	30
3.2.2.	Isolierung von RNA aus Gewebe.....	31
3.2.3.	Herstellung von cDNA.....	31
3.2.4.	Absorptionsmessungen von Nukleinsäuren.....	31
3.2.5.	Gelelektrophorese von DNA und RNA.....	32
3.2.6.	Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
3.2.7.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	33
3.2.8.	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock.....	33
3.2.9.	Sequenzierung von DNA.....	34
3.2.10.	Restriktionsverdau von DNA.....	34
3.2.11.	Polymerase Kettenreaktion.....	34
3.2.12.	<i>In vitro</i> Transkription zur Synthese von RNA-Proben.....	35
3.2.13.	Markierung von RNA mit Digoxigenin oder Fluoreszin.....	35
3.2.14.	Genexpressionsanalyse.....	36
3.2.15.	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung.....	37
3.2.15.1.	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung an ganzen Embryonen.....	37
3.2.15.2.	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung an Vibratomschnitten.....	40
3.2.16.	Herstellung von sagitalen oder koronalen Gefrierschnitten.....	43
3.2.17.	Antikörperfärbung.....	43
3.2.18.	Herstellung von Vibratomschnitten.....	43
3.2.19.	Mikroelektroporation.....	44
3.2.20.	Implantation von Fgf8-Protein getränkten Acrylkügelchen.....	45
3.2.21.	Virusinjektion.....	46
3.2.22.	Zellkultur	47
3.2.22.1.	Auftauen von Zellen.....	47
3.2.22.2.	Kultur von Zelllinien.....	47
3.2.22.3.	Kryokonservierung von Zellen.....	47

3.2.22.4.	MATra-vermittelte Transfektion.....	48
3.2.23.	RNA Interference	48
3.2.23.1.	Herstellung der RNAi Konstrukte.....	49
3.2.23.2.	Messung der Effektivität von siRNA-Konstrukten.....	50
3.2.23.3.	Quantifizierung der Luziferase-Aktivität.....	51
3.2.24.	Proteinbiochemie	52
3.2.24.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
3.2.24.2.	Western-Blot („Semidry-Blot“)......	54
3.2.24.3.	Immundetektion von Proteinen.....	55
3.2.24.4.	Immunpräzipitation.....	56
4.	Ergebnisse	58
4.1.	Klonierung der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ aus dem Hühnchen.....	58
4.2.	Untersuchungen zur Expression der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (<i>RPTPλ</i>) während der frühen Embryonal- entwicklung des Gehirns beim Hühnchen.....	60
4.3.	Expression von <i>cRPTPλ</i> in Relation zu anderen Markern der Mittel- / Hinterhirngrenze.....	63
4.4.	Expression von <i>cRPTPλ</i> in der sich entwickelnden neuralen Retina.....	65
4.5.	Untersuchungen zur Regulation der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (<i>cRPTPλ</i>) am Mittel- / Hinterhirnorganisationsator	67
4.5.1.	Fehlexpression von <i>CEPU-1</i> induziert keine ektopische Expression von <i>cRPTPλ</i>	67
4.5.2.	Fehlexpression von <i>Wnt1</i> induziert keine ektopische Expression von <i>cRPTPλ</i> oder <i>CEPU-1</i>	68
4.5.3.	Die Expression von <i>Wnt1</i> , <i>cRPTPλ</i> und <i>CEPU-1</i> wird von <i>Fgf8</i> induziert	70
4.5.4.	Die Expression von <i>cRPTPλ</i> wird von <i>Lmx1b</i> induziert.....	73
4.5.5.	Die Expression von <i>cRPTPλ</i> wird durch <i>Engrailed-1</i> unterdrückt.....	74
4.5.6.	Zusammenfassung der Regulation von <i>cRPTPλ</i> am MHO.....	75
4.6.	Funktion der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ am MHO	76
4.6.1.	Überexpression von <i>cRPTPλ</i> führt nicht zu einer Modulation des Expressionsmusters von <i>Fgf8</i>	76

4.6.2.	Überexpression von <i>cRPTPλ</i> führt zu einer Modulation des Expressionsmusters von <i>Wnt1</i>	82
4.7.	Unterdrückung der Expression von <i>cRPTPλ</i> durch RNAi	86
4.7.1.	Unterdrückung der Expression von <i>cRPTPλ</i> <i>in vitro</i>	86
4.7.2.	Unterdrückung der Expression von <i>cRPTPλ</i> am MHO führt zu einer diffusen Expression von <i>Wnt1</i>	87
4.8.	Untersuchungen zur Regulation der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ im Mittelhirn	88
4.8.1.	Überexpression von <i>Meis2</i> induziert keine ektoische Expression von <i>cRPTPλ</i>	89
4.8.2.	Überexpression von <i>αβ-Catenin</i> induziert keine ektoische Expression von <i>cRPTPλ</i> oder <i>Wnt1</i>	90
4.8.3.	Fehlexpression von <i>Lmx1b</i> im Mittelhirn induziert keine ektoische Expression von <i>cRPTPλ</i> oder <i>CEPU-1</i>	91
4.8.4.	Fehlexpression von <i>Engrailed-1</i> im Mittelhirn induziert oder hemmt nicht die Expression von <i>cRPTPλ</i>	92
4.8.5.	Fehlexpression von <i>Sonic hedgehog</i> im Mittelhirn unterdrückt die Expression von <i>cRPTPλ</i>	94
4.9.	Funktion von <i>cRPTPλ</i> im Mesenzephalon	95
4.9.1.	Fehlexpression von <i>cRPTPλ</i> führt zu einem verkleinerten Mittelhirn.....	95
4.9.2.	Aufrechterhaltung der Expression von <i>RPTPλ</i> im Mittelhirn führt zu einer abgeschwächten Expression von <i>β-Catenin</i>	98
4.9.3.	Fehlexpression von <i>RPTPλ</i> im Mittelhirn führt zu keiner Modulation der Expressionsmuster von <i>ephrinB1</i> , <i>Otx2</i> oder <i>FgfR1</i>	98
4.9.3.	<i>RPTPλ</i> bindet <i>in vivo</i> an <i>β-Catenin</i>	100
5.	Diskussion	102
5.1.	Expression der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ in der Mittel- / Hinterhirnregion.....	102
5.2.	Expression von <i>cRPTPλ</i> im Auge.....	105
5.3.	Regulation von <i>cRPTPλ</i> am Mittel- / Hinterhirn Organisator.....	107
5.4.	Funktion von <i>cRPTPλ</i> am Mittel- / Hinterhirn Organisator.....	112
5.5.	Regulation von <i>cRPTPλ</i> im Mittelhirn.....	117
5.6.	Funktion von <i>cRPTPλ</i> im Mittelhirn.....	120

6.	Anhang	128
6.1.	Sequenzvergleiche von <i>RPTPλ</i> in verschiedenen Spezies.....	128
6.2.	Expression der Konstrukte von <i>RPTPλ</i>	134
7.	Literaturverzeichnis	136

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AmpR	Ampecillin-Resistenz
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAM	„cell adhesion molecule“ (Zell-Adhäsionsmolekül)
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
E	embryonaler Tag
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
ERK	RAS-extrazellulär signalregulierte Kinase
FITC	Fluoreszin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HH	Entwicklungsstadium nach Hamburger Hamilton
HA	Influenza Hemagglutinin
HPLC	„high pressure liquid chromatography“
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kbp	Kilobasenpaar
l	Liter
LB	Luria Bertani
μ	mikro (10 ⁻⁶)
min.	Minute(n)
MH	Mittel- / Hinterhirn

MHO	Mittel- / Hinterhirnorganisator
MHR	Mittel- / Hinterhirnregion
n	Stichprobenumfang
N-Terminus	Aminoterminus
NBT	Nitro-tetrazoliumblau-chlorid
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
PAGE	Polyacrylamide Gel Elektrophoresis
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	„polymerase chain reaktion“ (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	potentium hydrogenii
PFA	Paraformaldehyd
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase(n)
PTP	Protein-Tyrosin-Posphatase(n)
RCAS	replikationskompetentes Geflügel-Retrovirus mit Spleissakzeptor (“replication-competent, avian leukemia virus (ALV) long terminal repeat (LTR), splice acceptor retrovirus vector”)
rpm	„rotation per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RPTP	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase(n)
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
sek.	Sekunde(n)
siRNA	“small interfering ribonucleic acid”
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)

ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	“volume to volume” (Volumen/Volumen)
WT	Wildtypisch
(w/v)	„weight to volume“ (Gewichtsanteil/Volumen)
(w/w)	„weight to weight“ (Gewicht/Gewicht)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Aminosäuren wurden mit dem international gebräuchlichen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

1. Abstract

The isthmus organizer (IO) is located near the boundary between the developing midbrain and hindbrain, and controls the proliferation and patterning of adjacent brain regions. Here, I describe the spatial and temporal expression of chick receptor-like protein tyrosine phosphatase lambda (*cRPTPλ*, also known as *cRPTPψ*) during development of the IO. *cRPTPλ* is initially expressed throughout the caudal forebrain and midbrain region. Between embryonic day E2 and E3.5, expression of *cRPTPλ* is confined to the ventral midline of the neural tube, the future neural retina and lens, and a sharp ring at the isthmus constriction, overlying the molecular mid-hindbrain boundary (MHO). From embryonic day E3.5, *cRPTPλ* is expressed throughout the whole midbrain.

To begin to understand the function of *cRPTPλ*, the regulation of this molecule was examined. MHO expression of *cRPTPλ* is regulated by the fibroblast growth factor *Fgf8* and the transcription factor *Lmx1b*, but not by the secreted glycoprotein *Wnt1*. The transcription factor *En-1* represses MHO expression of *cRPTPλ*. Expression of *cRPTPλ* in the midbrain is negatively regulated by the secreted protein Sonic hedgehog, whereas *Lmx1b* and *En-1* have no influence on the expression pattern of *cRPTPλ* there.

Fgf8 and *Wnt1* are significantly involved in proliferation and patterning of the embryonic midbrain. Functional studies with *RPTPλ* suggest that this protein is part of a negative-feedback mechanism within both signalling pathways. RNAi and overexpression studies at the MHO indicate that *RPTPλ* antagonises the induction of *Wnt1*-expression by *Fgf8*. This antagonism seems to be mediated by an interaction of unknown factors with the juxtamembrane domain of *RPTPλ*. *RPTPλ*, however, has no influence on the expression pattern of *Fgf8* itself, nor on several other factors which are regulated by *Fgf8*. Furthermore, artificially prolonged expression of *cRPTPλ* in the mesencephalon between embryonic day E2 and E3.5 leads to midbrain malformation. *RPTPλ* interacts *in vivo* with β -catenin, a central protein of the canonical Wnt-pathway. Through this interaction, *RPTPλ* may modulate the Wnt-signal, which promotes proliferation in the mesencephalon. Thus, *RPTPλ* may function as a negative modulator for the canonical Wnt-pathway in the midbrain.

1. Zusammenfassung

Der isthmische Organisator liegt an der Grenze zwischen dem sich entwickelnden Mittel- und Hinterhirn und kontrolliert Wachstum und Musterbildung dieser beiden Hirnregionen. In der vorliegenden Arbeit wird die räumliche und zeitliche Expression der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase lambda aus dem Huhn ($cRPTP\lambda$, auch als $cRPTP\psi$ bekannt) während der Entwicklung dieser Struktur beschrieben. Nach einer anfänglich weitläufigen Expression im kaudalen Vorderhirn und in der Mittelhirnregion, beschränkt sich die Expression von $cRPTP\lambda$ zwischen dem embryonalen Tag E2 und E3.5 auf die ventrale Mittellinie des Neuralrohrs, den Bereich der späteren neuralen Retina und Linse und auf einen schmalen Ring anterior der isthmischen Einschnürung, welcher der molekularen Mittel- / Hinterhirngrenze (MHO) entspricht. Ab dem embryonalen Tag E3.5 wird $RPTP\lambda$ dann auch im gesamten Mittelhirn gebildet.

Um Hinweise auf die Funktion von $cRPTP\lambda$ zu bekommen, wurde die Regulation dieses Moleküls untersucht. Die Expression von $cRPTP\lambda$ am MHO wird von dem Fibroblasten Wachstumsfaktor $Fgf8$ und dem Transkriptionsfaktor $Lmx1b$, nicht aber von dem sezernierten Glykoprotein $Wnt1$ induziert. Der Transkriptionsfaktor $En-1$ unterdrückt die Expression von $cRPTP\lambda$ am MHO. $cRPTP\lambda$ -Expression im Mittelhirn wird negativ durch das sezernierte Protein Sonic Hedgehog reguliert, während $Lmx1b$ und $En-1$ dort keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von $cRPTP\lambda$ haben.

$Fgf8$ und $Wnt1$ sind maßgeblich an der Regulation von Wachstum und Musterbildung des embryonalen Mittelhirns beteiligt. Funktionelle Studien zu $RPTP\lambda$ deuten darauf hin, dass dieses Protein als negativer Rückkopplungsmechanismus beider Signalwege wirken kann. RNAi- und Überexpressionsstudien am MHO lieferten Hinweise darauf, dass $RPTP\lambda$ der Induktion der $Wnt1$ -Expression durch $Fgf8$ entgegenwirkt. Dies scheint durch Interaktion noch unbekannter Faktoren mit der Juxtamembrandomäne von $RPTP\lambda$ vermittelt zu werden. Auf das Expressionsmuster von $Fgf8$ selbst, oder einer Reihe anderer Faktoren, die ebenfalls von $Fgf8$ reguliert werden, hat $RPTP\lambda$ allerdings keinen Einfluss. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine „künstliche“ Aufrechterhaltung der Expression von $cRPTP\lambda$ im Mittelhirn zwischen dem embryonalen Tag E2 und E3.5 zu einem stark verkleinerten Mesenzephalon führt. $RPTP\lambda$ bindet *in vivo* an β -Catenin, ein zentrales Protein des kanonischen Wnt-Signalweges, und moduliert dadurch vermutlich das Wnt-Signal, welches seinerseits Proliferation im Mesenzephalon fördert. Durch diesen Mechanismus könnte $cRPTP\lambda$ als „Bremse“ des kanonischen Wnt-Signalweges im Mittelhirn wirken.

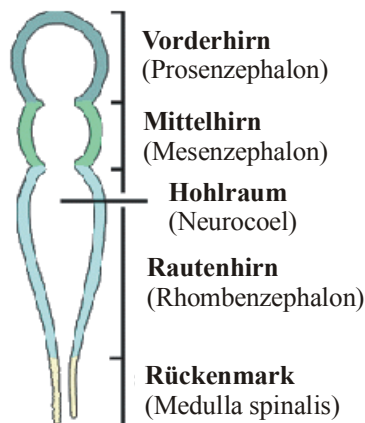
2. Einleitung

Wenn Du staunen willst, so versetzt Dich dieser Prozeß in wahres Erstaunen. Du startest mit einer einzigen Zelle, welche durch die Verbindung von Spermium und Eizelle entsteht. Diese eine Zelle teilt sich in zwei, dann vier, dann acht und so weiter. Und in einem bestimmten Stadium entsteht eine einzige Zelle, aus welcher sich das menschliche Gehirn entwickelt. Die reine Existenz solch einer Zelle sollte zu den großen Verwunderungen dieser Welt gezählt werden (Lewis Thomas, 1979).

Während der Individualentwicklung eines Lebewesens, der Ontogenese, durchläuft der Embryo aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien. Die Embryonalentwicklung von der befruchteten Eizelle über die Gastrulation, während der sich die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm bilden, hin zu einem reifen, reproduktionsfähigen Organismus ist äußerst komplex. Bei Wirbeltieren bildet das Gehirn zusammen mit dem Rückenmark das Zentralnervensystem (ZNS). In ihm sind die Sinneszentren und übergeordnete Schaltzentren (Koordinations- und Assoziationszentren) zusammengefasst. Es ist für die Ausbildung komplizierter Handlungsabläufe, für die Fähigkeit des Gedächtnisses und für die Ausprägung von Intelligenz verantwortlich. Die verschiedenen Regionen des ZNS entstehen während der frühen Embryonalentwicklung aus der Grundstruktur des Neuralrohres, das seinerseits aus einer Verdickung des Ektoderms, der Neuralplatte, entsteht. Vorder- und Hinterhirn sind in segmentale Untereinheiten gegliedert (Neuomere), das Mittelhirn hingegen nicht.

Das eigentliche Gehirn entsteht aus drei primären Gehirnbläschen, denen die zentralen Sinnesorgane zugeordnet sind. Das Prosenzephalon segmentiert im Laufe der Entwicklung in das Endhirn (Telencephalon) und das Zwischenhirn (Diencephalon). Aus letzterem stülpen sich lateral die Augenbläschen aus. Das zweite Bläschen entspricht dem späteren Mittelhirn (Mesencephalon), in dem sich die Vierhügelplatte entwickelt. In den oberen Vierhügeln wird optische Information und in den unteren Hör- und Gleichgewichtsinformation verarbeitet. Das dritte Gehirnbläschen ist das Rautenhirn (Rhombencephalon). Das Rhombencephalon gliedert sich in das Hinterhirn (Metencephalon, Rhombomere 1) und das Nachhirn (Myelencephalon, Rhombomere 2-7). Das Myelencephalon bildet den Übergang vom Gehirn zum Rückenmark (Medulla spinalis) (Abb. 1). Hier liegen die wichtigsten vegetativen Schaltzentren, das Atem- und das Kreislaufzentrum. Aus dem Metencephalon geht später das Kleinhirn (Cerebellum) hervor.

3 Primärvesikel (HH10)



5 Sekundärvesikel (HH11-12)

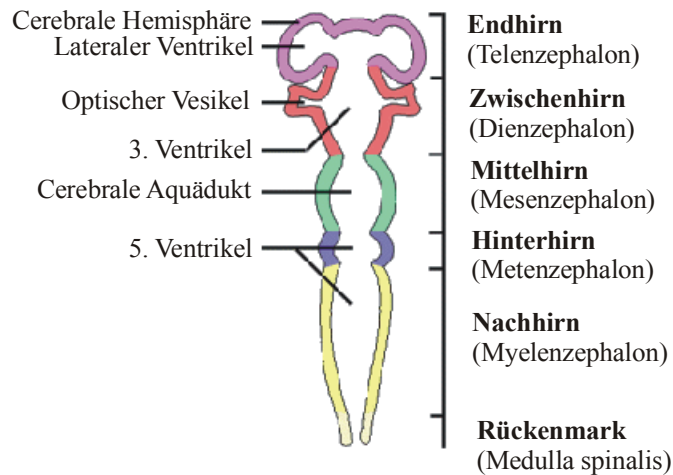


Abb. 1: Schematische Darstellung der frühen Entwicklung des Gehirns. Ausgehend von drei primären Gehirnbläschen segmentiert sich während der Entwicklung das Vorderhirn in End- und Zwischenhirn und das Rautenhirn in Hinter- und Nachhirn, während das Mittelhirn unsegmentiert bleibt. (Modifiziert nach Moore *et al.*, 1993.)

2.1. Organisatoren während der Entwicklung des zentralen Nervensystems von Wirbeltieren

Zellen senden Signale aus, die ihre Interaktion untereinander vermitteln. So können sich Organe mit definierter räumlicher Anordnung parallel zueinander entwickeln. Dass hierbei auch Zellverbände, sogenannte Organisatoren, das Entwicklungsschicksal angrenzender Zellgruppen bestimmen können, wurde erstmals 1924 von Hans Spemann und Hilde Mangold beschrieben. Sie transplantierten die dorsale Urmundlippe eines Amphibienembryos während der frühen Gastrulation an die Stelle eines Empfängerembryos, aus der sich später die Bauchhaut gebildet hätte. Dieses Explantat induzierte im benachbarten Gewebe die Bildung einer zweiten Körperachse. Somit ist die primäre neurale Induktion und fundamentale anterior-posteriore oder dorso-ventrale Regionalisierung des frühen Neuralrohres auf die Aktivität dieses „primären Organisators“ zurückzuführen (Spemann & Mangold, 1924).

Auch während der frühen Entwicklung des zentralen Nervensystems spielen Organisatoren eine bedeutende Rolle. „Sekundäre Organisatoren“ regulieren schon früh die Identität und regionale Polarität von angrenzenden Bereichen des Neuroepithels (Ruiz i Altaba, 1998). Sie besitzen die Fähigkeit, entwicklungsrelevante Informationen mittels sezernierter Proteine an benachbarte Zellen weiterzugeben und dadurch deren Entwicklung und Differenzierung zu beeinflussen. Bislang wurden zwei Organisatoren innerhalb der embryonalen Neuralplatte

identifiziert. So beeinflusst zum einen der als anteriore Neuralfurche (*anterior neural ridge*) bezeichnete Organisator die Entwicklung der vorderen Neuralplatte, während der Mittel- / Hinterhirnorganisator (*isthmical organizer*, MHO) zum anderen maßgeblich an der Entwicklung der Mittel- / Hinterhirnregion (MHR) beteiligt ist (Echevarría *et al.*, 2003).

2.2. Entstehung und Organisation der Mittel- / Hinterhirnregion

Der MHO wurde durch Transplantationsexperimente an Vogelembryonen im 10-Somiten-Stadium entdeckt. Gewebe aus der Einschnürung zwischen Mittel- und Hinterhirn (MH), dem sogenannten Isthmus, wurde in die kaudale Vorderhirnregion transplantiert. Dadurch änderte das Empfängergewebe sein Schicksal und entwickelte Gewebe mit Mittelhirncharakter, dessen Polarität invertiert war (Nakamura *et al.*, 1988; Martínez *et al.*, 1990). Wurde der Isthmus jedoch in die Hinterhirn-Anlage transplantiert, so induzierten die gleichen Zellen die Bildung eines zweiten Kleinhirns (Martínez *et al.*, 1995) (Abb. 2).

Die Ergebnisse der beidseitigen Ablation von Teilen bzw. des gesamten Isthmus stehen mit der Rolle für diese Struktur im Einklang. Eine komplette Entfernung des Isthmus führte zu einem Verlust des gesamten Mittel- und Hinterhirns (Wurst & Bally-Cuif, 2001). Somit scheint der Isthmus für die Entwicklung des MH nicht nur ausreichend, sondern auch erforderlich zu sein. Doch nicht nur bei Vögeln ist der Isthmus für die Musterbildung des Neuralrohrs nötig, sondern bei allen Vertebraten, wie gleiche Versuche an Mäusen und Zebrafischen zeigten (Miyagawa *et al.*, 1996; Camus *et al.*, 2000).

Weitere Transplantationsexperimente an Vogelembryonen zeigten, dass seitenverkehrtes Gewebe aus dem rostralen Mittelhirn seine Polarität nach der neuen Umgebung ausrichtet (Wurst & Bally-Cuif, 2001; Liu & Joyner, 2001b). Somit konnte gezeigt werden, dass der MHO auch die Etablierung einer rostro-kaudalen Polarität im MH kontrolliert.

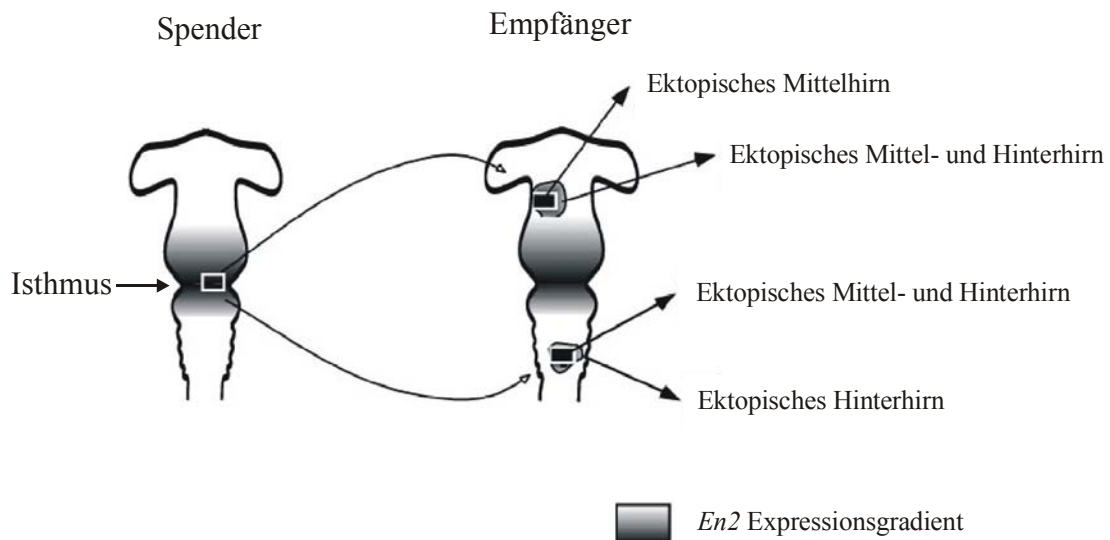


Abb. 2: Transplantation des Mittel- / Hinterhirnorganisators im Hühnchen induziert ein ektopisches Mittelhirn in angrenzenden Gehirnregionen. Transplantation von Gewebe des MHB induziert eine ektopische Expression von Mittel- / Hinterhirnmarkern, wie z.B. *En-2*, und eine ektopische Mittel- / Hinterhirnentwicklung. (Modifizierte schematische Darstellung nach Liu & Joyner, 2001b.)

Zusammengefasst zeigt dies die organisatorische und Wachstum fördernde Funktion des MHO und die Fähigkeit des Hinterhirns anders auf die Signale des Isthmus zu reagieren, als das posteriore Vorder- und Mittelhirn, was auf die Bedeutung zusätzlicher regionaler Besonderheiten hindeutet.

2.3. Genexpression am Mittel- / Hinterhirnorganisator

Parallel zu der oben beschriebenen Vesikelbildung bei der Entwicklung des Gehirns, entstehen entlang der anterior – posterioren Achse Bereiche differentiell exprimierter Gene. Die Transkriptionsfaktoren *orthodenticle homologue 2 (Otx2)* und *gastrulation brain homeobox 2 (Gbx2)* aus der Familie der Homeodomänenproteine sind die ersten Proteine, die regionenspezifisch synthetisiert werden. Während der Gastrulation und frühen Neurolation wird *Otx2* anterior und *Gbx2* posterior des Isthmus exprimiert. Die Position des MHO wird durch die Grenze der Expressionsdomänen von *Otx2* und *Gbx2* bestimmt (Broccoli *et al.*, 1999; Millet *et al.*, 1999; Joyner *et al.*, 2000; Garda *et al.*, 2001). Darauffolgend werden im 1-Somiten-Stadium die Gene, die für die Transkriptionsfaktoren *paired box 2 (Pax-2)*, *engrailed-1 (En-1)* sowie für das sezernierte Glykoprotein *Wnt1* kodieren, an der Mittel- / Hinterhirngrenze induziert. Im 3-5 Somiten-Stadium werden auch die Transkriptionsfaktoren *paired box 5 (Pax-5)*, *engrailed 2 (En-2)* und der sezernierte Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8 (*Fgf8*) exprimiert. Die *Wnt1*-Expressionsgrenze liegt anterior des Isthmus, während *En-1/-2*, *Pax-2/-5* über den Isthmus beidseitig hinaus exprimiert werden. Die *Fgf8*-Expression

beschränkt sich auf den Bereich posterior des Isthmus und überlappt mit dem anterioren Bereich der *Gbx2* Expression (Abb. 3).

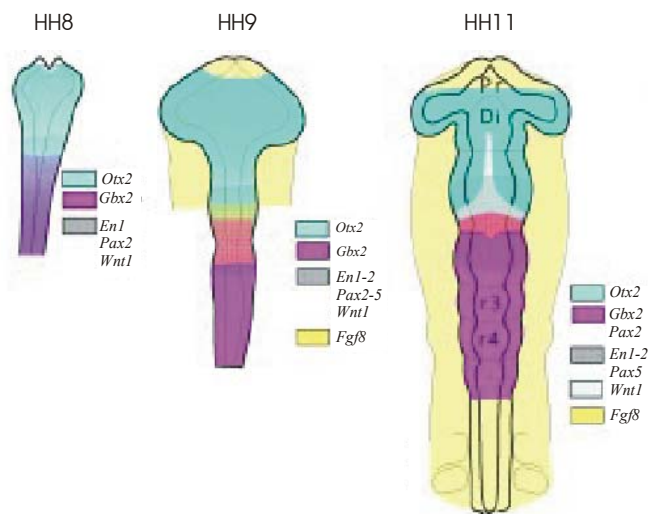


Abb. 3: Schematische Darstellung der dynamischen Genexpressionsmuster am Mittel- / Hinterhirnorganisator. Darstellung des räumlichen und zeitlichen Genexpressionsmusters zur Etablierung des MHO in drei verschiedenen Entwicklungsstadien. Verschiedene Farben symbolisieren die Expression unterschiedlicher Gene. Änderungen der farblichen Kennzeichnung stehen für eine Überlappung der *Gbx2* / *Fgf8* / *En1-2* Expressionsdomänen. (Modifiziert nach Martínez, 2001)

Diese Faktoren sind allesamt für die normale Entwicklung der Mittel- / Hinterhirngrenze essentiell, wie durch gezielte Geninaktivierungen gezeigt werden konnte.

Mausembryonen, die eine homozygote Mutation für *Otx2* tragen, fehlt das gesamte Mittelhirn, während das Hinterhirn vergrößert ist (Acampora *et al.*, 1997; Suda *et al.*, 1997; Rhinn *et al.*, 1999). Inaktivierung beider *Gbx2*-Allele führt zu einer kaudalen Expansion des Mittelhirns und einem Verlust des Kleinhirns sowie der Rhombomeren 1-3 (Wassarman *et al.*, 1997). Einhergehend mit der Erweiterung des Mittelhirns sind auch die Expressionsdomänen von *Otx2*, *Wnt1* und *Fgf8* kaudal verschoben (Millet *et al.*, 1999).

En-1 Mutanten weisen eine stark reduzierte oder vollständig fehlende MHR auf und sterben kurz nach der Geburt (Wurst *et al.*, 1994). *En-2* Mutanten weisen nur leichte Veränderungen der Kleinhirnschichtung auf (Millen *et al.*, 1994). Experimente an Doppelmutanten haben jedoch gezeigt, dass sich *En-1* und *En-2* scheinbar auch in ihrer Funktion ergänzen (Liu & Joyner, 2001a).

Pax2^{-/-} Mäuse weisen von subtilen morphologischen Veränderungen bis hin zu einem völligen Verlust des hinteren Mittel- und Kleinhirns verschiedene Phänotypen auf (Schwarz *et al.*, 1997). *Pax5*^{-/-} Mäuse zeigen morphologische Veränderungen im dorsalen Mittelhirn und im vorderen Kleinhirn. In *Pax2* und *Pax5* Doppelmutanten ist der Phänotyp ausgeprägter, als in einzelnen *Pax2* oder *Pax5* Mutanten, was auf eine redundante Funktion dieser Gene hinweist (Urbanek *et al.*, 1997).

Die bei *Wnt1*^{-/-} Mäusen beobachteten Entwicklungsstörungen sind variabel und bestehen im Wesentlichen aus einer Verkleinerung oder dem kompletten Verlust der MHR und des

Kleinhirns (McMahon *et al.*, 1990). Durch ektopische Expression von *En-1* in der normalen *Wnt1*-Expressionsdomäne von *Wnt1*^{-/-} Mäusen konnte jedoch die normale Entwicklung der MHR teilweise wiederhergestellt werden (Danielian *et al.*, 1996). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass *Wnt1* für die Aufrechterhaltung der *En-1*-Expression verantwortlich ist, oder dass beide Gene die gleichen, oder in ihrer Funktion ähnliche Zielgene regulieren. Zudem sind in Mäusen mit einer hypomorphen *Wnt1* Mutation die Expressionsdomänen von Mittel- und Hinterhirn spezifischen Markergenen weniger scharf abgegrenzt, als in wildtypischen Tieren. Dies legt eine Bedeutung von *Wnt1* für die Ausbildung der Mittel- / Hinterhirngrenze nahe (Bally-Cuif *et al.*, 1995).

Fgf8^{-/-} Mäuse weisen einen Gastrulationsdefekt auf, doch an Mäusen mit hypomorphen *Fgf8*-Allelen konnte gezeigt werden, dass *Fgf8* für die normale Entwicklung des Mittel- und Hinterhirns essentiell ist (Meyers *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999).

Es ist bemerkenswert, dass vollständig bzw. teilweise fehlendes *Wnt1* oder *Fgf8*, also Gene, die nur auf einer Seite des Isthmus exprimiert werden, zu einer Abnahme von Mittel- und Hinterhirnstrukturen führen. Dies deutet darauf hin, dass diese Gene die Aufrechterhaltung oder Aktivität des MHO kontrollieren könnten (Thomas *et al.*, 1991; McMahon *et al.*, 1992; Reifers *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1998).

Neben den Geninaktivierungen besteht in Überexpressionsexperimenten eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung von Genfunktionen. Wenn *Otx2* durch Überexpression mittels Elektroporation über die normale Expressionsgrenze hinaus exprimiert wurde, so verschob sich die Expression von *Gbx2* kaudal, während sich im umgekehrten Falle nach Überexpression von *Gbx2* die Expressionsgrenze von *Otx2* rostral verschob (Katahira *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass die kaudale Grenze der *Otx2*-Expression für die Positionierung des MHO entscheidend ist (Broccoli, 1999; Millet *et al.*, 1999).

2.4. Induktion des Mittel- und Hinterhirns durch die Signalwirkung von Fgf8

Das sezernierte Protein *Fgf8* spielt eine besondere Rolle bei der Mittel- / Hinterhirnentwicklung (Crossley & Martin, 1995). *Fgf8* getränkte Acrylkügelchen, die in die laterale Wand des embryonalen Vorderhirns implantiert werden, können beim Hühnchen die Aktivität des MHO nachahmen und Gewebe mit Mittelhirncharakter induzieren (Crossley *et al.*, 1996a; Shamim *et al.*, 1999). Wenn sie in das Mesen- oder Dienzephalon implantiert werden, entwickelt sich Gewebe mit Hinterhirncharakter (Martínez *et al.*, 1999).

Otx2 und *Gbx2* induzieren zwar die Expression von *Fgf8* nicht, jedoch legen sie dessen exakte Positionierung am MHO fest (Hildago-Sánchez *et al.*, 1999; Irving & Mason, 1999; Li & Joyner, 2001; Martinez-Barbera *et al.*, 2001). Für die Positionierung der Expressionsdomäne von *Fgf8* am Isthmus scheint jedoch auch eine Interaktion des Transkriptionsfaktors LIM-Homeobox 1b (*Lmx1b*) mit *Wnt1* und auch *Fgf8* selbst eine große Rolle zu spielen (Adams *et al.*, 2000; Matsunaga *et al.*, 2002). *Lmx1b* hemmt die Expression von *Fgf8* Zell-autonom, in den benachbarten Zellen hingegen induziert es *Fgf8*. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass *Lmx1b* die *Wnt1*-Expression induziert, welches wiederum *Fgf8*-Expression induziert. Da *Gbx2* die *Lmx1b*- und *Wnt1*-Expression hemmt, wird *Fgf8* an der Grenze von *Otx2* und *Gbx2* exprimiert (Matsunaga *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass *Pax-2* Expression von *Fgf8* induzieren kann, jedoch wird diese Aktivität im Mittelhirn wiederum durch den Transkriptions-Repressor *Grg4*, welcher zur *Gro/Grg/TLE* Familie gehört, inhibiert, so dass die Expressionsdomäne von *Fgf8* genau am Isthmus positioniert wird (Ye *et al.*, 2001) (Abb. 4).

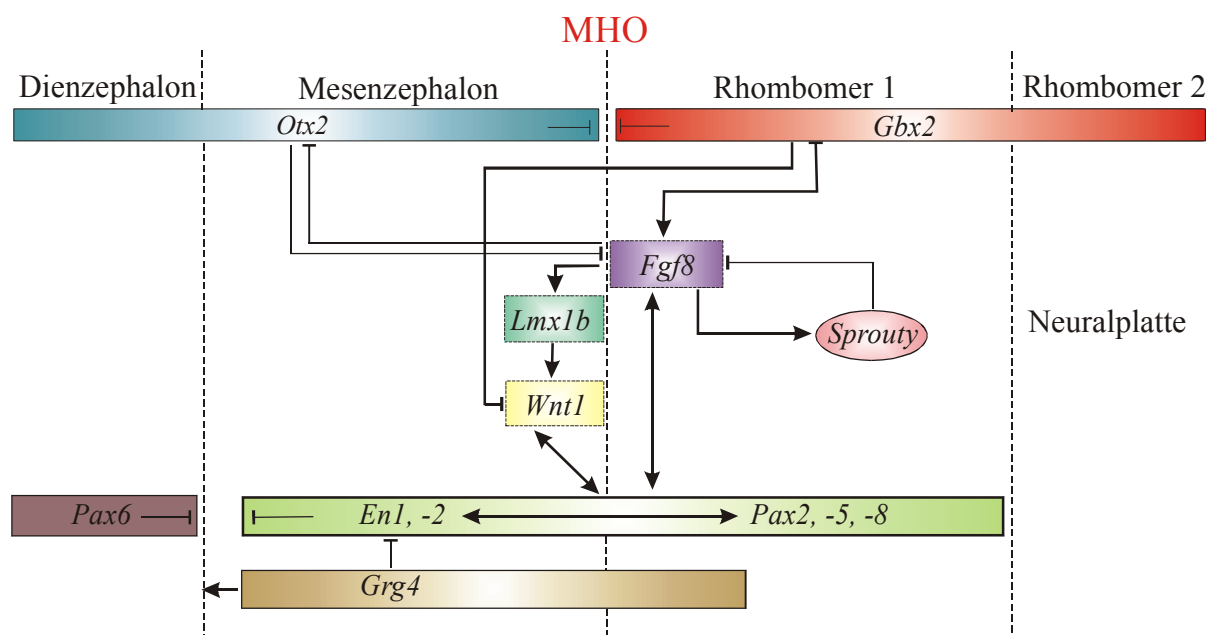


Abb. 4: Genexpressionsmuster in der Neuralplatte während der frühen Somitogenese. *Gbx2* hält die Expression von *Fgf8* aufrecht, während *Otx2* und *Gbx2*/*Fgf8* sich gegenseitig hemmen, um eine stark abgegrenzte Expression zu gewährleisten. Die Expressionsbereiche von *Fgf8*, *Wnt1*, *En1,-2* und *Pax2,-5,-8* sind voneinander abhängig und etablieren einen Kreislauf mit positiver Rückkopplung, der für die Aufrechterhaltung der Mittel- /Hinterhirn-Identität entscheidend ist. *Sprouty* und *Grg4* hingegen fungieren als negative Rückkoppler. (Modifiziert nach Wurst & Bally-Cuif, 2001.)

In der Region des Isthmus werden beim Hühnchen zwei verschiedene Isoformen von *Fgf8*, *Fgf8a* und *Fgf8b*, exprimiert (Sato *et al.*, 2001). Diese Isoformen werden durch alternatives Spleißen generiert (Crossley & Martin, 1995; McArthur *et al.*, 1995). Transgenetische Mäuse,

die *Fgf8a* im Mesenzephalon überexprimieren, zeigen ein übermäßig großes Dien- und Mesenzephalon. Mäuse hingegen, die *Fgf8b* überexprimieren, weisen eine verstärkte Induktion der MHO-Marker *Gbx2* und *Fgf8* und eine Unterdrückung von *Otx2* im Dien- und Mesenzephalon auf. Ein ähnliches Ergebnis erzielte man auch durch Überexpression von *Fgf8a* mittels Elektroporation in den Gehirnvesikeln des Hühnchens. Dies resultierte darin, dass sich die Anlage des zukünftigen Dienzephalons zum Mesenzephalon entwickelte. Es war jedoch auffallend, dass sich nach Überexpression von *Fgf8b* die Alarplatte des Mesenzephalons zum Cerebellum transformierte (Sato *et al.*, 2001). Obwohl sich die Effekte nach Überexpression gleicher Konzentrationen von *Fgf8a* und *Fgf8b* so stark unterscheiden, führte eine Überexpression einer hundertfach-kleineren Konzentration von *Fgf8b* zu ähnlichen morphologischen und molekularen Veränderungen, wie nach Überexpression von *Fgf8a*. Dies läßt vermuten, dass die unterschiedliche Aktivität von *Fgf8a* und *Fgf8b* in der Differenz der Stärke des Signals begründet liegt (Sato *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Überexpressionsdaten der Fgf-Rezeptoren (FgfR), die zu ähnlichen molekularen Veränderungen führen, wie nach *Fgf8b*-Überexpression (Liu *et al.*, 2003).

FgfRI ist der einzige Fgf8-Rezeptor, der am MHO exprimiert wird (Walshe & Mason, 2000). Eine Inaktivierung dieses Rezeptors am MHO führte in der Maus zu einem Verlust des posterioren Mittelhirns und des anterioren Hinterhirns (Trokovic *et al.*, 2003).

Am MHO werden auch *Fgf17* und *Fgf18* exprimiert. Deren Expressionsdomäne ist jedoch breiter als die von *Fgf8* und schließt auch Bereiche des Mittel- und Hinterhirns ein (Maruoka *et al.*, 1998; Ohuchi *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Fgf8 die Expression von *Fgf17* und *Fgf18* reguliert (Liu *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2003). Überexpression von *Fgf17/18* im Hühnchen mittels Elektroporation induzierte ähnlich wie *Fgf8a*, nicht aber wie *Fgf8b*, eine Expansion des Mittelhirns (Liu *et al.*, 2003). Wenn die Expression von *Fgf17* in Maus-Mutanten ausgeschaltet wurde, so resultierte dies in einer Verkleinerung des Mittelhirns (Xu *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2004). Die *Fgf18* Mutanten zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp im Mittel- oder Hinterhirn (Liu *et al.*, 2003; Ohbayashi *et al.*, 2002). Nach diesen Ergebnissen zu urteilen wirkt also Fgf8 möglicherweise bei der Entwicklung des Mittel- / Hinterhirns mit *Fgf17* und *Fgf18* zusammen.

In vielen molekularen Signalwegen wird das durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) vermittelte Signal durch den Signalweg der RAS-extrazellulär signalregulierten Kinase (ERK) übertragen, um eine zelluläre Antwort, wie z.B. Proliferation und Differenzierung, zu induzieren (Rommel & Hafen, 1998). ERK wird durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten aktiviert, welche einander angrenzend in der TYE-Sequenz vorliegen (diphosphoryliertes ERK, dpERK) und kann mit Hilfe des anti-dpERK Antikörpers nachgewiesen werden (Gabay *et al.*, 1997; Christen & Slack 1999; Shinya *et al.*, 2001; Corson *et al.*, 2003). Im Stadium Hamburger Hamilton (HH) 8 im Hühnchen konnte vermehrt aktiviertes ERK im Isthmus und Rhombomer 1 detektiert werden, wo auch *Fgf8* mRNA exprimiert ist (Hamburger & Hamilton, 1992; Sato & Nakamura, 2004). Dies weist darauf hin, dass der Ras-ERK Signalweg bei der *Fgf8* Signalübertragung im Isthmus involviert ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Art von Signalübertragung hauptsächlich bei der Entwicklung des Hinterhirns eine Bedeutung zukommt, nicht jedoch im Mittelhirn. Dies liegt möglicher Weise darin begründet, dass die Expression von *Fgf8* im Mittel nicht ausreicht, um den Ras-ERK Signalweg zu aktivieren (Sato *et al.*, 2004).

2.5. Charakterisierung der Funktion von *Wnt1* in der Mittel- / Hinterhirnregion

Das Glykoprotein *Wnt1* wurde als erstes Gen der *Wnt*-Genfamilie entdeckt und zunächst 1982 unter dem Namen „*int1*“ mit dem Maus-Brusttumovirus (MMTV) in Zusammenhang gebracht (Nusse & Varmus, 1982). Nachdem eine Homologie von *int1* mit dem *wingless* (*wg*) Gen in *Drosophila* nachgewiesen werden konnten, wurde das Gen der „*Wnt*“-Genfamilie zugeordnet und in *Wnt1* umbenannt. Mittlerweile wurden 19 verschiedene *Wnt* Gene in Säugetieren charakterisiert, dessen Funktionen sehr divers und von ihrem zellulären und entwicklungspezifischen Kontext abhängig sind. So regulieren Wnts z.B. die Musterbildung des ZNS, Zellmigration, Proliferation und Apoptose (Nusse *et al.*, 1992; Miller, 2002). Alle *Wnt*-Gene kodieren für Proteine mit einer Signalsequenz und einem nahezu unveränderlichen Muster von 23 Cysteinen. Wnt-Proteine werden von Zellen sezerniert und vermitteln durch die Interaktion mit einem 7-Helix-G-Protein-gekoppelten Rezeptor aus der Frizzled Familie oder den Lipoprotein-Rezeptoren 5 und 6 (LRP-5/6) die weitere Spezifikation oder Differenzierung einer Zelle (Wodarz & Nusse, 1998). Nachdem ein Wnt-Protein an seinen Rezeptor gebunden hat, kann der Wnt/Ca²⁺ Signaltransduktionsweg, der Wnt/PCP („Planar Cell Polarity“) Signalweg, oder der sogenannte kanonische Signaltransduktionsweg aktiviert werden.

Der Wnt/Ca²⁺ Signaltransduktionsweg führt ausgehend von der Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins über die Aktivierung der Phospholipase-C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Calcium-Ionen und der Aktivierung der Calcium/Calmodulin-regulierten Kinase II. Bislang ist über die Wirkung dieses Signaltransduktionsweges relativ wenig bekannt. Es konnte jedoch im Krallenfrosch *Xenopus laevis* gezeigt werden, dass der Wnt/Ca²⁺-Signalweg antagonistisch zum kanonischen Wnt-Signalweg wirkt (Torres *et al.*, 1996; Slusarski *et al.*, 1997; Kuhl *et al.*, 2000).

Bei dem Wnt/PCP Signalweg führt eine Aktivierung der Proteinkinase JNK („Jun N-terminal kinase“) zu einer morphologischen Veränderung der Zellen, die dann eine ausgeprägt polare Organisation annehmen. Solche Zellen beteiligen sich an morphogenetischen Bewegungen, die letztlich dem Embryo seine Form geben (Wallingford *et al.*, 2002).

Im kanonischen Wnt-Signalweg führt eine Interaktion von Wnt mit dem Frizzled-Rezeptor (FZD) und Korezeptoren der LRP-Familie zu einer Aktivierung von Dishevelled (Dsh), woraufhin sich ein Multiproteinkomplex bildet, der aus Adenomatous Polyposis Coli (APC), GSK3-bindendem Protein (GBP/Frat1), Axin und Glykogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β) besteht. Als Folge dessen wird das Schlüsselmolekül des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges, Armadillo/β-Catenin, nicht mehr phosphoryliert. Die Stabilität und intrazelluläre Lokalisation von β-Catenin hängt vom Phosphorylierungszustand des Proteins ab. In Abwesenheit von Wnt wird β-Catenin durch die Serin/Threonin-Kinasen *casein kinase I* (CKI) und GSK-3β phosphoryliert und bindet an Axin, wodurch es für die Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation zugänglich gemacht wird (Aberle *et al.*, 1997). Eine Aktivierung des Wnt-Signals wiederum führt zu einer Hemmung der GSK-3β-Aktivität, was zu einer Akkumulation von β-Catenin im Zytoplasma führt (Salic *et al.*, 2000) (Abb. 5). Das stabilisierte, unphosphorylierte β-Catenin kann in den Zellkern wandern und dort mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie interagieren, wodurch die Expression von Zielgenen induziert wird (Cadigan & Nusse, 1997).

Die Familie der Wnts kann entsprechend ihrer Funktion und Signaltransduktions-Spezifität in unterschiedliche Klassen unterteilt werden. In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass abhängig von Wnt und dem Frizzled-Rezeptor der kanonische oder der Wnt/Ca²⁺-Signalweg stimuliert wird. Durch Überexpression von XWnt1, XWnt3a, XWnt8 und XWnt8b konnte der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert werden, während XWnt4, XWnt5a und XWnt11 den Wnt/Ca²⁺-Signalweg aktivierten (Kuhl *et al.*, 2000). *In vivo* scheinen spezifische Wnts nicht unbedingt auf einen der beiden Signalwege festgelegt zu sein, da die Überexpression von

XWnt5a und humanem *FZD5* in *Xenopus* Embryonen zu einer Aktivierung des kanonischen Signalweges führte und eine Überexpression von *Wnt1* in *Xenopus* Embryonen eine Achsenduplikation hervorrief, während *Wnt5a* dazu nicht in der Lage war (Sokol *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1995; He *et al.*, 1997).

Ein autoregulativer Kreislauf des kanonischen Wnt-Signalweges kontrolliert die Entwicklung des Mittelhirns. So wurde mit der *antisense Morpholino loss-of-function* - Methode in *Xenopus laevis* gezeigt, dass die Expression des Transkriptionsfaktor *XTcf-4* von *XWnt2b* abhängig ist, dessen Expression wiederum selbst von *XTcf-4* kontrolliert wird. Eine Analyse der Markergene führte zu dem Schluß, dass dieser autoregulatorische Kreislauf für die Entwicklung des Mittelhirns und Isthmus von Bedeutung ist (Kunz *et al.*, 2004).

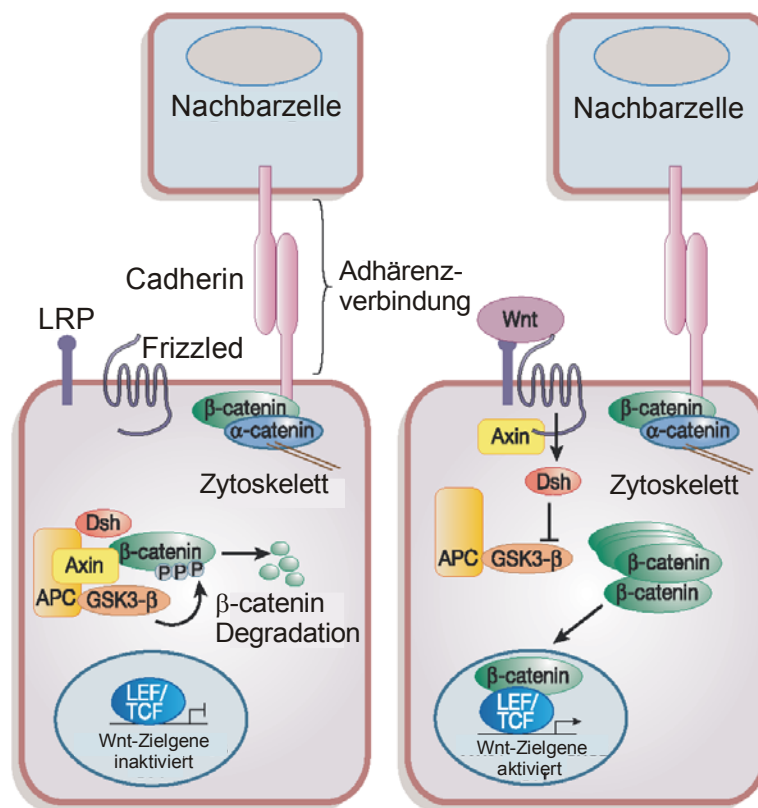


Abb. 5: Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg. In der Abwesenheit des Wnt-Signals (linke Seite) geht das phosphorylierte β-Catenin einen Komplex mit Axin, APC und GSK3-β ein und wird degradiert, oder interagiert mit Cadherin und reguliert so Zell-Zell-Adhäsion. In Anwesenheit des Wnt-Signals (rechte Seite) wandert β-Catenin in den Nukleus, wo es mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF interagiert und so Zielgene aktiviert. (Modifiziert nach Rattis *et al.*, 2004.)

Das Gen *Wnt1* kodiert für ein Protein von 370 Aminosäuren, das wie auch die anderen Mitglieder der *Wnt*-Genfamilie posttranslational glykosyliert wird und über den sekretorischen Weg in den extrazellulären Raum gelangt (Smolich *et al.*, 1993; Papkoff, 1995).

Wnt1 wird im Hühnchen zunächst im gesamten Mittelhirn exprimiert, bevor sich seine Expressionsdomäne auf einen schmalen, kaudalen Ring anterior des Isthmus und auf die dorsale Mittellinie des Vorder- und Mittelhirn eingrenzt (Abb. 3, Hollyday *et al.*, 1995; Matsunaga *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu *Fgf8* ist über die Funktion von *Wnt1* während der Entwicklung der MHR relativ wenig bekannt. Aufgrund des Expressionsmusters von *Wnt1* liegt jedoch eine Funktion bei der MHR-Entwicklung nahe.

Um die Funktion von *Wnt1* während der Entwicklung des Nervensystems zu untersuchen, wurden Überexpressionsstudien in der Maus und im Hühnchen durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass eine ektopische *Wnt1*-Expression im Neuralrohr zu einer erhöhten Zellproliferationsrate im Rückenmark und im Vorderhirn, nicht aber im MH führt (Dickinson *et al.*, 1994).

Durch gezielte Mutagenese wurde das *Wnt1* Gen auch von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen inaktiviert (McMahon *et al.*, 1992; Thomas & Capecchi., 1990). *Wnt1*^{-/-} Mäuse starben postnatal oder überlebten mit schweren Ataxien. Die Embryonen wiesen schon im frühen Embryonalstadium E9.5 einen weitgehenden Verlust des gesamten Mittel- und Hinterhirns auf, welcher mit einer frühen Deletion des Mittelhirngewebes beginnt und von einem Verlust des Hinterhirns gefolgt wird (siehe auch 2.3.). Parallel dazu kommt es in diesen Embryonen zu einem schrittweisen Verlust der *En-1*-Expression (McMahon *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu diesem Phänotyp weist die spontan aufgetretene Mutante *swaying* (*Wnt1*^{sw/sw}), welche eine Punktmutation im *Wnt1* Gen trägt, eine fast vollständige MHR auf, jedoch ist die Trennung von anterioren und posterioren Zelltypen gestört (Thomas *et al.*, 1991; Bally-Cuif *et al.*, 1995). Diese widersprüchlichen Ergebnisse führten zu der Annahme von zwei Funktionen für *Wnt1*. Zum einen könnte *Wnt1* die Proliferation und/oder die Spezifikation entlang des gesamten Mittelhirns kontrollieren und zum anderen die Wahl der Zellspezifikation am MHO beeinflussen. Um diese Hypothese zu testen, wurde *Wnt1* unter der Kontrolle des *En-1* Promoters in der Maus exprimiert. So wurde die *Wnt1*-Expression in frühen Stadien (E8) im Mittelhirn verstärkt und leicht kaudal verschoben, während sie ab dem embryonalen Tag E8.5-E9 rostral bis in das anteriore Mittelhirn und kaudal bis in Rhombomer 1 erweitert wurde, da dies der natürlichen Expressionsdomäne von *En-1* entspricht (Wurst & Bally-Cuif, 2001). Die Position des MHO und die Musterbildung der

MHR veränderten sich in diesen transgenetischen Mäusen nicht. Während der Entwicklung induzierte ektopisches Wnt1 konzentrationsabhängig nur im kaudalen Mittelhirn eine verstärkte Proliferation der Vorläuferzellen. Die verstärkte Proliferation wird dabei zumindest teilweise durch eine Verkürzung des Zellzyklus vermittelt. In adulten *En-1^{+Wnt1}* Mäusen zeigte Wnt1 einen Einfluss auf die Zellgröße von Neuronen. Dies deutet darauf hin, dass Wnt1 vorrangig als Regulator der Proliferation spezifischer Vorläuferzellen in der sich entwickelnden MHR wirkt und nur zweitrangig an der Aufrechterhaltung des MHO beteiligt ist (Panhysen *et al.*, 2004). Ob Wnt1 und Fgf8 in diesem Prozess miteinander kooperieren, ist bislang unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Wnt1 vermutlich indirekt die *Fgf8*-Expression im anterioren Hinterhirn (Lee *et al.*, 1997), nicht jedoch im Mittelhirn induzieren kann (Matsunaga *et al.*, 2002).

2.6. Charakterisierung der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen Typ IIb

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten ist *in vivo* ein dynamischer, reversibler Prozess, der durch die antagonistische Aktivität von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) kontrolliert wird. PTKs vermitteln dabei die Phosphorylierung und PTPs die Dephosphorylierung von Tyrosinresten zellulärer Proteine. Dieser Prozess ist ein fester Bestandteil intrazellulärer Signalwege und spielt daher eine zentrale Rolle in vielen verschiedenen Entwicklungsprozessen wie Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion und -migration (Johnson & Van Vactor, 2003). Auf molekularer Ebene ist über die Funktion der PTKs schon sehr viel bekannt, aber erst in den letzten Jahren zeichnet sich auch immer deutlicher die Bedeutung der PTPs für die Signaltransduktion im ZNS der Vertebraten und Invertebraten ab. Eine Vielzahl der PTPs sind transmembran und werden deshalb als Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTPs) bezeichnet, obwohl eine Funktion als Rezeptor bislang nicht für alle Mitglieder dieser Gruppe nachgewiesen werden konnte. Basierend auf phylogenetischen Analysen der Phosphatasedomänen, wurden die RPTPs in acht große Unterfamilien eingeteilt (Abb. 6). Für vier dieser Unterfamilien (R2A, R2B, R3 und R4) konnte gezeigt werden, dass sie für die Entwicklung des ZNS von Bedeutung sind (Johnson & Van Vactor, 2003). Alle Typ 2 RPTPs weisen ein extrazelluläres Segment mit einer Kombination mehrerer Fibronectin (FN) Typ III - und Immunoglobulin (Ig) - ähnlicher Domänen und eine Transmembrandomäne auf. Die intrazelluläre Region umfasst eine Juxtamembrandomäne, welche von einer katalytisch-aktiven (D1) und einer katalytisch-inaktiven (D2) Phosphatasedomäne gefolgt wird. Typ 2 RPTPs werden noch in zwei weitere

Klassen unterteilt (R2A und R2B). Gene der R2B-Klasse unterscheiden sich von der R2A-Klasse durch eine zusätzliche N-terminale Meprin-A5-PTP mu (MAM) Domäne (Beckmann & Bork, 1993). R2B-Molekülen werden neben ihrer potentiellen Rolle bei der Signaltransduktion auch Zelladhäsions-Eigenschaften zugeschrieben (Brady-Kalnay & Tonks, 1995). Da bislang kein Homolog der R2B-Moleküle bei Invertebraten identifiziert wurde, scheint die Funktion(-en) dieser Phosphatasen sehr spezifisch für Vertebraten zu sein (Walchli *et al.*, 2000). R2B-Phosphatasen werden dort während der Entwicklung in ausgeprägten Mustern, mit starker Expression im ZNS, exprimiert (Johnson & Van Vactor, 2003). R2B-Phosphatasen werden, wie auch R2A-Phosphatasen, in der extrazellulären Domäne nahe der Membran proteolytisch gespalten und scheinen eine dichte Verbindung zwischen den gespaltenen Fragmenten aufrecht zu halten (Jiang *et al.*, 1993).

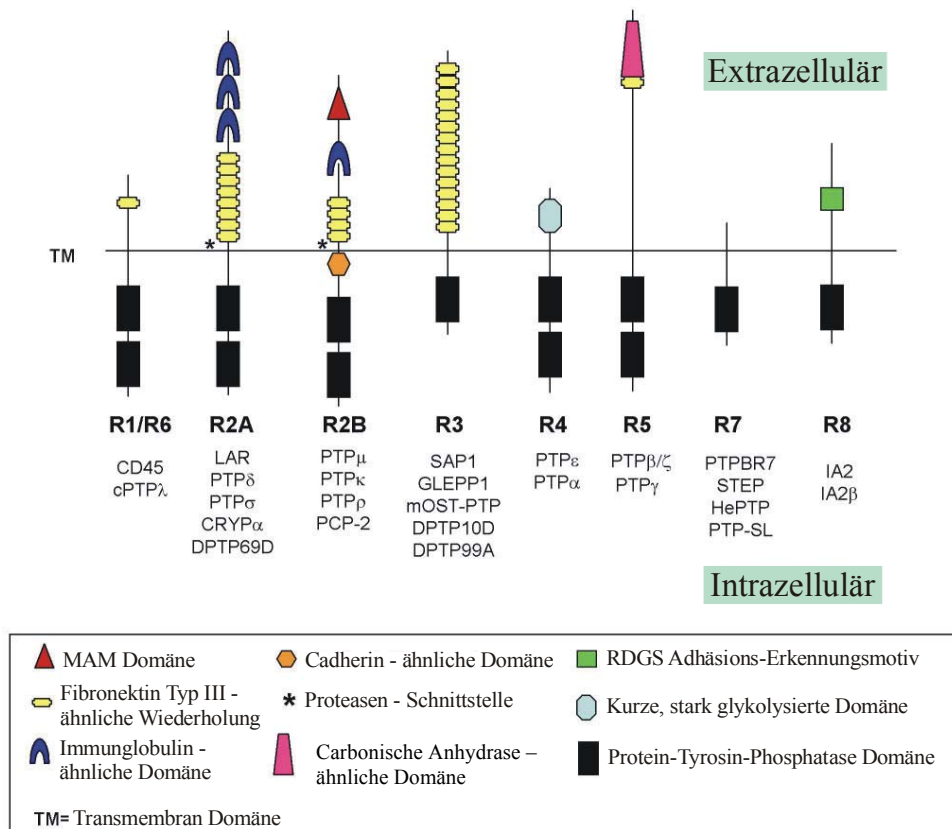


Abb. 6: Klassifikation der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTPs) in acht Unterfamilien (R1-R8). Diese Einteilung basiert auf phylogenetischen Analysen der Phosphatase-domänen. PTPμ, κ, ρ und PCP-2 sind Mitglieder der R2B Unterfamilie. (Modifiziert nach Besco *et al.*, 2004.)

Während schon bekannt ist, dass die FN Typ III – ähnlichen Wiederholungen eine generelle Rolle bei der Adhäsion einnehmen, wird auch angenommen, dass die extrazelluläre MAM Domäne der R2B Moleküle zusammen mit der Ig-Domäne in der Lage ist, spezielle homophile Adhäsionen zu vermitteln (Brady-Kalnay & Tonks, 1995; Zondag *et al.*, 1995). Das bedeutet, dass diese *cell adhesion molecule* (CAM) – ähnlichen Strukturen möglicherweise als ihr eigener Ligand agieren. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass Typ IIb RPTPs (PTP μ , PTP κ) eine homophile Zelladhäsion vermitteln, wenn sie in Zellkulturzellen exprimiert werden (Zondag *et al.*, 1995). Somit können R2-Phosphatasen vermutlich als Ligand und als Rezeptor fungieren. Diese homophile Bindung ist allerdings von der Phosphatase-Aktivität unabhängig, da Mutanten, denen die Phosphatase Domäne komplett fehlt, die Eigenschaften der homophilen Adhäsion nicht beeinflussen (Gebink *et al.*, 1993; Doherty & Walsh, 1994). Doch obwohl diese homophilen Liganden bereits nachgewiesen werden konnten, kann bislang noch keine Aussage über deren physiologische Bedeutung bei der neuronalen Entwicklung gemacht werden (Wang & Bixby, 1999; Burden-Gulley & Brady-Kalnay, 1999; Sun *et al.*, 2000). Die Existenz homophiler Liganden schließt jedoch nicht die Existenz heterophiler Liganden aus (Bixby, 2001). So wird z.B. vermutet, dass die extrazelluläre Matrix ein potentieller Ligand von PTP σ ist (Haj *et al.*, 1999).

Die Juxtamembrandomäne der R2B-Phosphatasen ist größer als in anderen RPTPs. Sie wird von sechs verschiedenen Exons kodiert, welche alternativ gespleißt werden (Besco *et al.*, 2004). Daher wird davon ausgegangen, dass diese Region hoch spezialisierte Funktionen hat und für die Substraterkennung und –spezifikation entscheidend ist. Darüber hinaus weisen diese Juxtamembrandomänen eine ähnliche Sequenz auf, wie die intrazelluläre Domäne der membranständigen Calcium-abhängigen Zelladhäsionsmoleküle Cadherine, welche an der homophilen Zelladhäsion beteiligt sind. Cadherine binden Catenine, welche wiederum mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sind und somit Zelladhäsion und Veränderungen morphologischer Eigenschaften, wie z.B. Neuronenwachstum, bewirken (Rimm *et al.*, 1995; Kypta *et al.*, 1996). Das intrazelluläre Segment von PTP μ kann z.B. direkt in einem Komplex mit α - und β -Catenin an die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin binden und so das Auswachsen von Axonen vorantreiben (Brady-Kalnay *et al.*, 1995, 1998; Burden-Gulley & Brady-Kalnay, 1999). Auch für andere R2B-Phosphatasen gezeigt wurde gezeigt, dass diese mit dem Cadherin / Catenin Signalweg interagieren können. So wurde z.B. nachgewiesen, dass die Phosphatase PCP2 aus einer humanen Karzinoma-Zelllinie der Pankreas mit β -Catenin und E-Cadherin an Zellkontakten kolokalisiert und direkt mit β -Catenin interagiert (Wang *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2002). Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin führt zu einer

Anreicherung des freien intrazellulären Proteins und spielt so bei der Initiation der Zellmigration eine Schlüsselrolle (Müller *et al.*, 1999). Die R2A-Phosphatase LAR kann β -Catenin dephosphorylieren, um so dessen Freisetzung zu verhindern und damit die Bewegung von Epithelzellen zu hemmen (Müller *et al.*, 1999). Die R2B-Phosphatase PTP μ ist in der Lage p120^{ctn}, ein Protein der Armadillo Familie, welches an E-Cadherin bindet und die Stabilität von Cadherin-Komplexen in der Zell-Zell Interaktion beeinflusst, zu dephosphorylieren, aber es gibt keinen Hinweis darauf, dass PTP μ auch Cadherine dephosphoryliert (Zondag *et al.*, 2000).

Es liegen ausreichend Hinweise dafür vor, dass intrazelluläre PTKs am Signalweg der RPTPs beteiligt sind, doch es scheint, dass auch RTKs auf diesen Signalweg Einfluss haben. Ein Beispiel dafür zeigte die Analyse des FGFR-Orthologs in *Caenorhabditis elegans* (DeVore *et al.*, 1995; Kokel *et al.*, 1998). Durch genetische Analyse in *C. elegans* wurde eine Typ II RPTP namens Clr-1 als Antagonist des FGFR-Ortholog egl-15 identifiziert. Hierbei wird der Clr-1-Phänotyp bei Verlust von egl-15 unterdrückt und kann nur durch eine Überexpression von *egl-15* nachgeahmt werden (Kokel *et al.*, 1998). Da Clr-1 während der Entwicklung von *C. elegans* katalytisch aktives PTP benötigt, um normal wirken zu können, scheint es naheliegend, dass sich FGFR und Clr-1 eine Reihe von funktionell relevanten Substraten teilen (Johnson & Van Vactor, 2003). Doch obwohl man weiß, dass FGFR eine Funktion bei dem Auswachsen und der Wegführung von Axonen und der Weiterleitung der Signale von CAMs, wie z.B. N-Cadherin, zukommt, ist die Identität der geteilten Substrate von Clr-1 und FGFR noch unbekannt.

Die Expression einer katalytisch inaktiven Form von PTP μ hemmt *in vitro* das Auswachsen retinaler Axone auf Cadherin-Substrat (Burden-Gulley & Brady-Kalnay, 1999). Dies deutet darauf hin, dass die katalytische Aktivität für die biologische Funktion der RPTPs, insbesondere für die Unterfamilie R2, sehr wichtig ist. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Bindung eines Liganden diese katalytische Aktivität beeinflusst. Von den Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen weiß man, dass die Bindung eines Liganden dort zu einer Bildung von Dimeren führt, welches wiederum zur Aktivierung der Kinase-Aktivität führt. Für CD45 (ein Vertreter der Unterklasse der R1-RPTPs) und PTP α (R4) konnte gezeigt werden, dass eine Dimerisierung von RPTPs die katalytische Aktivität durch Protein-Protein-Interaktion hemmt. Hierbei blockiert die D1 Domäne eines RPTPs den Zugang des Substrat zur D1 Domäne des Partners (Petroni & Sap, 2000). Dieses Modell scheint aber nicht universell für alle RPTPs zu

gelten, da einige RPTPs, wie z.B. LAR (R2A) und PTP μ (R2B), keine hemmende Bildung von Dimeren in kristallinen Strukturen zeigen (Hoffmann *et al.*, 1997; Nam *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation der katalytischen Aktivität von RPTPs komplexer ist als bei PTKs und sich deshalb keine allgemein gültige Aussage über die Wirkung einer Ligandenbindung getroffen werden kann.

RPTPs bilden nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere mit anderen RPTPs. So kann z.B. die D2 Domäne von PTP μ (R2B) an die intrazelluläre Domäne von RPTP α (R4) binden. Diese heterodimeren Interaktionen deuten auf eine Kommunikation zwischen den RPTPs hin, welche zu einer funktionellen Redundanz oder Überlappung führen könnte (Blanchetot & den Hertog, 2000).

Ogleich die katalytische Aktivität der Phosphatasen also für den Signalmechanismus der RPTPs sicherlich sehr wichtig ist, so handelt es sich hierbei jedoch nicht um den einzigen Mechanismus, durch den die RPTPs signalisieren, wie Untersuchungen der extrazellulären Region gezeigt haben.

2.7. Zielsetzung und experimentelles Vorgehen

Auf der Suche nach neuen Molekülen, die zur normalen Entwicklung des visuellen Systems von Vertebraten beitragen, identifizierten wir eine Rezeptor ähnliche Protein-Tyrosin-Phosphatase, welche ein Huhn-Homolog der Maus-RPTP λ ist (Fuchs *et al.*, 1997) und am MHB und im MH exprimiert wird. Über die Funktion, die von membrangebundenen RPTPs vermittelt wird, ist wenig bekannt. Es bleibt weiterhin unklar, ob diese RPTPs als Liganden, Rezeptoren oder Komponenten von Rezeptorkomplexen in der Entwicklung und Differenzierung des zentralen Nervensystems eine Rolle spielen. Die Identifizierung und Analyse der Expression und Regulation kann einen Einblick in die Funktion dieser RPTPs und die dabei beteiligten Signalkaskaden gewähren.

Das Ziel meiner Arbeit war

- (I) die Expression von $RPTP\lambda$ im Modellorganismus Huhn zu untersuchen. Hierzu sollte die Expression von $cRPTP\lambda$ zunächst detailliert beschrieben und mit den Expressionsmustern von bekannten Markerproteinen der MHB verglichen werden.
- (II) Einsichten in die Regulation von $cRPTP\lambda$ in der Mittel-/Hinterhirnentwicklung zu erlangen. Hierzu wurden zum einen bekannte Regulationsfaktoren der MHB-Entwicklung, wie z.B. *FGF8*, *Wnt1*, *Lmx1b*, *Cepu1* und β -*Catenin* in der MHB via Mikroelektroporation *in vivo* am embryonalen Tag 1.5 (E1.5) überexprimiert und anschließend mittels *in-situ* Hybridisierung eine mögliche Änderung der $cRPTP\lambda$ -Expression untersucht. Zum anderen sollte durch Implantation von Fgf8-Protein getränkten Acrylkügelchen in die laterale Wand des Mittelhirns die Frage geklärt werden, ob Fgf8 die Expression von $cRPTP\lambda$ im Mittelhirn induzieren kann.
- (III) Hinsichtlich der Funktion von $cRPTP\lambda$ am MHO sollten 2 Theorien geprüft werden:
 1. Da die Wirkung von Fgf8 durch Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Fgf8 Rezeptoren) vermittelt wird, könnte eine mögliche Funktion von $cRPTP\lambda$ in einer Modulation des Fgf8-Signals am MHO bestehen. Um dies zu testen, wurde $RPTP\lambda$ in der MHB überexprimiert und untersucht, ob dies zu einer Änderung des Expressionsmusters von Faktoren, die an der Fgf8 Signalkaskade beteiligt sind, führt.
 2. Eine weitere mögliche Funktion von $cRPTP\lambda$ ergibt sich aus Arbeiten an menschlichen Adenokarzinoma-Zellen. Hier wurde eine Interaktion des menschlichen Homologs zu $cRPTP\lambda$ (PCP2) mit β -Catenin gezeigt, welches von zentraler Bedeutung für den kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg ist (Yan et al., 2002). Im Mittelhirn ist dieser Wnt-Signaltransduktionsweg für die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung wichtig. Deshalb sollte untersucht werden, ob die ektopische Expression von $cRPTP\lambda$ die Proliferationsrate im Mittelhirn beeinflusst.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerät	Firma
Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Apothekerwaage Spoerhase Typ B6	Sartorius, Göttingen
CCD-Kamera Spot 2 (gekühlt) für Axiophot	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Curix60 Röntgenbild-Entwickler für Western Blots	AGFA Medical, Mortsel / Belgien
Brutschrank für Hühnereier, Typ BSS mit Gitterböden	EHRET GmbH und Co. KG
Eagle Eye Mini Darkroom Cabinet mit Transilluminator 2040 EV für Agarose Gele	Stratagene, über Biocrest, Amsterdam / NL
Elektroporations-Impulsgenerator EPI 2500	Dr. Fischer, Heidelberg
Horizontale Gelelektrophoresekammern	Biorad, München
GloMax TM 96 Platten-Luminometer	Promega, Mannheim
Kryostat CM 3050 S	Leica, Nussloch
Kühlzentrifugen (Super T21 und Biofuge)	Sorvall / Heraeus über Kendro, Labarotory Products, Hanau
Micropipette Puller P-87	Sutter Instrument Co., Novato, CA. / USA
Inverses Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Milli-Q [®]	Millipore GmbH, Schwalbach
Photometer	GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Spektrophotometer LC-55	Perkin Elmer, Überlingen
Sterilbank (Hera safe 12)	Sorvall / Heraeus über Kendro, Labarotory Products, Hanau
Stereomikroskop MZ12	Leica, Heerbrugg / Schweiz

Vibratom Typ 1000	Technical Products International (St. Louis / USA)
Wärme-Brutschrank (Hera Function line B6)	Sorvall / Heraeus über Kendro, Labarotory Products, Hanau

Tab. 1: Geräte**3.1.2. Software**

Software	Firma
Dokumentation von Agarose Gelen	EagleSight MFC Application, Stratagene, Heidelberg
Immunfluoreszenzaufnahmen	MetaView (Meta Imaging Series 4.5) Universal Imaging Coporation, West Chester, PA, USA
Editierung der Elektropherogramme nach DNA-Sequenzierung	Technelysium Pty Ltd. (Chromas V2.31) (http://technelysium.com.au/chromas.html)

Tab. 2: Verwendete Software.**3.1.3. Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Zur Herstellung von Lösungen wurde über eine Millipore-Anlage gereinigtes Wasser verwendet.

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (NEB) (Schwalbach/Taunus) bezogen.

3.1.4. „Kits“

Kit	Firma
“ET mix”	Amersham Biosciences (Freiburg)
“pBluescript [®] II XR cDNA Library Construction Kit”	Stratagene (Amsterdam / NL)
“QIAGEN Plasmid Maxi Kit”	Qiagen (Hilden)
“QIAprep [®] Spin Miniprep Kit”	Qiagen (Hilden)
“QIAquick [®] Gel Extraction Kit”	Qiagen (Hilden)
“QIAprep [®] Spin Miniprep Kit”	Qiagen (Hilden)
“QIAquick [®] Gel Extraction Kit”	Qiagen (Hilden)
“RNeasy [®] Protect Mini Kit”	Qiagen (Hilden)
“Silver Stain Plus”	BIO RAD (München)
TOPO TA Cloning [®]	Invitrogen (Groningen / NL)
„MATra Magnet assisted Transfection“)	IBA (Göttingen)
„SuperScript [™] One-Step RT-PCR System for Long Templates“	Invitrogen (Groningen / NL)

Tab. 3: Verwendete „Kits“.

3.1.5. Nährmedien und Antibiotikallösungen für Bakterienkulturen

Zur Sterilisation wurden die Medien 20 min. bei 120°C autoklaviert.

LB-Flüssigmedium (Luria-Bertani-)	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7.0	
LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Bacto-Agar	15 g/l
	pH 7.0	
LB ^{amp}	LB (s.o.)	
	Ampicillin	0,1 mg/ml

3.1.6. Medien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM / F-12 + 10 % FCS (2 Wochen verwendbar)	Dulbecco's Modified Eagles Medium hitzeinaktivierendes fötales Kälberserum (FCS)	10 % (v/v)
	L-Glutamin	2 mM
	Penizillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
Trypsin / EDTA	Trypsin / EDTA	2,5 % (w/v)
10 x PBS	NaCl	1,3 M
	Na ₂ HPO ₄	70 mM
	Na ₂ H ₂ PO ₄	30 mM
	pH 7.2	

3.1.7. Puffer, Marker und Enzyme für die Molekularbiologie

50 x TAE	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	0,05 M
10 x TBE	Tris	1 M
	Borsäure	890 mM
	EDTA	25 mM
	pH 8.0	
Ficoll-Ladepuffer (6x)	Ficoll (Typ 400)	15 %
	Xylencyanol	0,05 %
	Bromphenolblau	0,25 %
DNA Molecular Weight Marker	VI (0,15-2,1 kbp) Roche, Best.-Nr.: 1062590	
	VII (0,37-8,0 kbp) Roche, Best.-Nr.: 1209264	
Paraformaldehydlösung (PFA)	PFA w/v in 1x PBS	4 - 8 %

Tris-HCl pH 7.0; 7.5; 8.0; 9.5 TRIZMA Base 1 M
pH mit HCl einstellen

3.1.8. Organismen

3.1.8.1. Bakterienstämme

DH5 α *F* Δ lacU169 (σ 80 lacZ) Δ M15 *hsdR17 recA1 endA1 supE44 gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan, 1983)
Für die Hitzeschock-Transformation zur Vermehrung und Gewinnung von Plasmiden.

3.1.8.2. Zelllinien

293T Zellen Humane Nierenfibroblasten-Zelllinie mit stabiler Integration des “Large T”-Antigens de SV40-Virus. ATCC-Katalog: Best.-Nr. CRL-11268

DF1 Zellen Hühnchen-Zelllinie zur Produktion von Viruspartikeln.
Hergestellt von Doug Foster (University of Minnesota). ATCC-Katalog: Best.-Nr. CRL-12203

3.1.8.3. Hühnchen

SPAFAS Eier (Serum-Pathogen-frei) Charles River, Sulzfeld (für Virusinjektionen)

Befruchtete *White-Leghorn* Eier Geflügelfarm Körner, Frankfurt (für Elektroporationen)

Die befruchteten Eier wurden bei 12°C gelagert und nach Bedarf bei 37,8°C in einem Feuchtinkubator bebrütet. Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien wurden nach Hamburger und Hamilton (1951) definiert.

3.1.9. Plasmide, Oligonukleotide und Expressionskonstrukte

3.1.9.1. Plasmide

Die Plasmide, die für Klonierungen in dieser Arbeit verwendet wurden, werden in Tabelle 4 näher beschrieben.

Plasmid	Größe	Eigenschaften	Referenz
pMiw III MCS	1,0 kb	Elektroporationsvektor; Amp ^r	Suemori <i>et al.</i> , 1990
pSlax-13-Flu	3,0 kb	Shuttlevektor für RCAS; Amp ^r	C. Cepko, Boston / USA
pMes	5,5 kb	Elektroporationsvektor mit IRES-EGFP; Amp ^r	C. Krull, Columbia / USA (Swartz <i>et al.</i> , 2001)
RCAS (B)	11,0 kb	Virusproduktion; Amp ^r	C. Cepko, Boston / USA (Petropoulos & Hughes, 1991)
pCR II-TOPO	3,9 kb	Klonierungsvektor; Amp ^r	Invitrogen, Karlsruhe
psiCHECK™2	3,5 kb	Quantitative Analyse von RNAi; enthält Renilla- und Firefly-Luciferase	Promega, Mannheim
psiSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human)-hMGFP	5,0 kb	Expression von siRNA-Konstrukten	Promega, Mannheim

Tab. 4: Verwendete Plasmide.

3.1.9.2. Generelle Oligonukleotide

Die generell verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert und sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Nr.	Bezeichnung	Sequenzen in 5'-3'-Richtung
1	M13F (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G
2	M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
3	T3+4	GCG CAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG AA
4	T7+4	GCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG
5	Sp6	CA TTT AGG TGA CAC TAT AG
6	5' pMIW III	AGG GCG GGG TTC GGC TTC TG
7	3' pMIW III	TTC CAC CAC TGC TCC CAT TCA TCA

Tab. 5: Generell verwendete Oligonukleotide.

3.1.9.3. Degenerierte Primer zur Klonierung von *cRPTPλ*

Um ein 490 bp großes Teilfragment des 3'-Endes von *cRPTPλ* (NT: 1041-1323) zu amplifizieren wurde die Strategie der „Consensus-Degenerate Hybrid Oligonukleotid Primer (CODEHOP)-PCR“ (Rose *et al.*, 2003) angewendet. Dazu wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Primer verwendet.

Nr.	Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
170	Abcod_1	AGT GGT ACT GGT CCA TGG TCT C(AGCT)A CCA T(AG)T T
180	ABcod_2	GCC GTA GTC GTA CAC CAG CC(GT) CCA (AG)AA (AG)TC
181	ABcod_3	CGG GCT CGG GCC A(AG)T A(CT)T

Tab. 6: Degenerierte Primer zur Klonierung eines Teilfragmentes von *cRPTPλ*.

3.1.9.4. Degenerierte Primer zum Nachweis von *cRPTPλ* mittels „One-Step RT-PCR“

cRPTPλ wurde aus RNA, welche aus den Köpfen von Hühnchenembryonen Stadium HH 15-20 isoliert wurde, kloniert. Dazu wurden degenerierte Primer verwendet, die von der Sequenz des Maus-Homologs *mRPTPλ* (NCBI: U55057) nach der Strategie von Rose *et al.* (2003) abgeleitet wurden (Tab. 7).

Nr.	Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
214	cRPTPI-AB1	CTC ATC AGC CGC ACC AAG TG
215	cRPTPI-AB2	GTG ATC TCT GTG AGC GCT GTC

Tab. 7: Degenerierte Primer zum Nachweis von *cRPTPλ* mittels „One-Step RT-PCR“.

3.1.9.5. Primer zum Nachweis von *PCP-2* mittels „One-Step RT-PCR“

Die Primer für den Nachweis des humanen *RPTPλ* (*PCP-2*) in fötaler humaner Retina sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Nr.	Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung
79	hPCP2-1F	CAT CAG CCG CAC CAA ATG CGC AG
80	hPCP2-1R	AGA TGT TAG TGG TTA TCT CAG TGA G

Tab. 8: Primer zum Nachweis von *PCP-2* mittels „One-Step RT-PCR“.

3.1.9.6. Expressionskonstrukte

Labornummer	Plasmid	Referenz
12	GFP-pMiw	D. Schulte, unpubliziert
189	cCepu1-pMiw III	K. Bumsted O'Brien, unpubliziert
193	Fgf 8-pMiw III	D. Schulte und K. Bumsted O'Brien, unpubliziert
278	mRPTP λ -pMiw III	D. Schulte, unpubliziert
291	mRPTP λ - Δ 2P-pMiw III	diese Arbeit
294	x β -Catenin-pMiw III	diese Arbeit
295	cLmx1b-pMiw III	diese Arbeit
296	cShh-RCAS (A)	B. Riddle <i>et al.</i> , 1993
278	mRPTP λ -HA-pMiw III	D. Schulte, unpubliziert
317	mRPTP λ -HA-pMes	D. Schulte, unpubliziert
325	mWnt1- Miw III	diese Arbeit
326	mWnt1-pMes	D. Schulte, unpubliziert
342	mRPTP λ Δ JM-pMiw III	D. Schulte, unpubliziert
366	mRPTP λ -HA-RIS	D. Schulte, unpubliziert
377	mEngrailed-1-pMiw III	D. Schulte, unpubliziert
380	cRLKB3-psiCHECK	diese Arbeit

Tab. 9: Verwendete Expressionskonstrukte. cDNA's mit vollständigem Leserahmen, Proteinfusionen und Mutanten zur eukaryotischen Expression wurden in die Vektoren pMIW III MCS oder pMes kloniert, welche eine Expression unter der Kontrolle des Hühnchen β -Actin-Promotors ermöglicht.

3.1.9.7. Plasmide zur Herstellung von RNA-Sonden

Plasmid	Beschreibung	Referenz/ Herkunft
cβ-Catenin	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>β-Catenin</i> Gens in pGem-Teasy, NT: 64-272 <i>antisense</i> Transkript: EcoRI / T3	C. Tabin, Boston / USA (Hartmann & Tabin, 2000)
cCepu1	Enthält die vollständig kodierende Sequenz (nach Brümmendorf; 1,2kb) des <i>Cepu1</i> Gens des Hühnchens in pSlax <i>antisense</i> Transkript: PCR: T3+4, T7+4 / T7	D. Schulte
cEngrailed-1	Enthält ein 800 bp großes cDNA Fragment des Hühnchen <i>Engrailed-1</i> Gens in pBS SK <i>antisense</i> Transkript: EcoRI / T3	C. Logan, Calgary, Kanada (Logan <i>et al.</i> , 1996)
cEphrinB1	Enthält ein 650 bp großes cDNA Fragment des Hühnchen <i>EphrinB1</i> Gens in pBS KS <i>antisense</i> Transkript: EcoRI / T7	Todd McLaughlin, La Jolla, CA / USA (Braisted <i>et al.</i> , 1997)
cFgf8	Enthält ein 1.5kb großes cDNA Fragment des Hühnchen <i>Fgf8</i> Gens <i>antisense</i> Transkript: NotI / T3	C. Tabin, Boston / USA
GFP	Enthält ein cDNA Fragment von <i>GFP</i> in pMiw, <i>antisense</i> Transkript: PCR: M13F,M13R / T7	D. Schulte
cGrg4	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Grg4</i> Gens in Topo, NT: 564-1357 <i>antisense</i> Transkript: PCR: M13F,M13R / T7	diese Arbeit
cLef	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <u>Lef</u> Gens in pBS <i>antisense</i> Transkript: BamH1 / T7	C. Tabin, Boston / USA
cLmx1b	Enthält die vollständig kodierende Sequenz (3.2kb) des <i>Lmx1b</i> Gens des Hühnchens in pBS SK <i>antisense</i> Transkript: SpeI / T7	C. Tabin, Boston / USA (Riddle <i>et al.</i> , 1995)

cMeis2	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Meis2</i> Gens in pBS KS ; NT 1-818 <i>antisense</i> Transkript: ClaI / T3	D. Schulte
cOtx2	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Otx2</i> Gens in pBS KS ; NT 1996-1560 <i>antisense</i> Transkript: ClaI / T3	C. Tabin, Boston / USA
cPax-2	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Pax-2</i> Gens in pBS <i>antisense</i> Transkript: ClaI / T3	D. Schulte
cPax-5	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Pax-5</i> Gens in Topo, NT: 571-1129 <i>antisense</i> Transkript: PCR: M13F,M13R / T7	diese Arbeit
RCS	Enthält ein 1,2kb großes cDNA Fragment des Matrix-Core-Proteins von RCAS in pBS SK <i>antisense</i> Transkript: SalI / T3	D. Schulte
cRPTP λ	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>RPTPλ</i> Gens in Topo, NT: 1169-1759 (nach Aerne et al., Pubmed: AY147868) <i>antisense</i> Transkript: BamHI / T7	diese Arbeit
mRPTP λ	Enthält ein 1 kb großes cDNA Fragment des Hühnchen <i>RPTPλ</i> Gens, NT: 1900-2900 (nach Cheng <i>et al.</i> (1997), Pubmed: U55057) <i>antisense</i> Transkript: KpnI / T7	diese Arbeit
cSefl	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Sefl</i> Gens in Topo, NT: 1038-1768 <i>antisense</i> Transkript: PCR: M13F,M13R / Sp6	diese Arbeit
cSprouty2	Enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Sprouty2</i> Gens in pBS <i>antisense</i> Transkript: PCR: M13F,M13R / T7	C. Tabin, Boston / USA
cWnt1	Enthält die vollständig kodierende Sequenz des Hühnchens (2,2kb) des <i>Wnt1</i> Gens in pGem4z <i>antisense</i> Transkript: PCR: EcoRI / T7	C. Tabin, Boston / USA

Tab. 10: Verwendete Plasmide zur Herstellung von RNA-Sonden.

3.1.10. Antikörper für Immunfluoreszenz-Analysen

3.1.10.1. Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Referenz
Anti-GFP	Kanninchen	1:1000	Molecular Probes / Invitrogen, Karlsruhe
Anti- β -Catenin	Kaninchen	1:1000	Upstate Group Inc., NY / USA
Anti-HA-High Affinity	Ratte	1:1000	Roche, Mannheim

Tab. 11: Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Analysen.

3.1.10.2. Sekundärantikörper

Antikörper	gekoppelt mit	Verdünnung	Referenz
Anti-Kanninchen	Alexa Fluor 594	1:1000	MobiTec, Leiden
Anti-Ratte	Cy3	1:1000	MobiTec, Leiden
Anti-Kanninchen	Alexa Fluor 488	1:1000	MobiTec, Leiden
Anti-Ratte	Alexa Fluor 488	1:1000	MobiTec, Leiden

Tab. 12: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Analysen.

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung von Plasmid DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA im geringen Maßstab, wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und zum Animpfen von 5 ml LB-Medium mit 0,1mg/ml Ampicillin verwendet. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 225 Umdrehungen pro Minute im Schüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde dann bei 4°C und 3500 U/min. 30 min. abzentrifugiert. Die Plasmid DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers isoliert und das DNA-Pellet in 50 μ l HPLC-H₂O aufgenommen.

Zur Isolierung grösserer DNA-Mengen wurde mit 5 ml der gewünschten Bakterienkultur 500 ml LB-Medium (0,1 mg/ml Ampicillin) angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 225 Umdrehungen pro Minute im Schüttler inkubiert. Hier erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Vorschrift des Herstellers. Die Isolierung der Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Lysis, gefolgt von der Bindung der Plasmid DNA an den Qiagen Anionen-Austausch-Filter bei niedriger Salzkonzentration und geringem pH-Wert. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch anschließende Waschschrte bei mittlerem Salzgehalt entfernt. Die Plasmid-DNA wird abschließend durch einen Puffer mit hohem Salzgehalt und durch Präzipitatbildung mit Isopropanol entsalzt und konzentriert.

3.2.2. Isolierung von RNA aus Gewebe

Gesamt-RNA aus Gewebe embryonaler Mittelhirne des Hühnchens wurde mit dem TRIZOL[®]-Reagenz, einer monophasischen Phenol-/Guanidin-Isothiocyanat-Lösung (Invitrogen, Groningen / NL) nach Angaben des Herstellers isoliert. Um einen hohen Reinheitsgrad zu erzielen und Reste chromosomaler DNA zu entfernen, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit Ionenaustauscher-Säulen aus dem "RNeasy Protect Mini Kit" (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers zusätzlich gereinigt. Alle wässrigen Lösungen wurden aus RNase freien Substanzen hergestellt und mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Die gereinigte Gesamt-RNA wurde bis zum Gebrauch in gefältem Zustand bei -70°C gelagert.

3.2.3. Herstellung von cDNA

mRNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem "SuperScript[™] One-Step RT-PCR System for Long Templates" (Invitrogen, Groningen, Niederlande) in korrespondierende cDNA umgeschrieben.

3.2.4. Absorptionsmessungen von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm mittels eines Photometers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Nukleinsäurekonzentration errechnete sich aus der OD, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht ca. 50 µg DNA/ml. Aus

dem Verhältnis der $OD_{260\text{ nm}}$ und der $OD_{280\text{ nm}}$ erhielt man eine Aussage über Proteinkontamination in der Lösung.

3.2.5. Gelelektrophorese von DNA und RNA

Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Bei einer Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach der Molekülgröße getrennt. Die Wandergeschwindigkeit ist abhängig von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels, die durch die Wahl der Konzentration an Agarose bestimmt wird. Diese Methode wird zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Bei Agarose-Konzentrationen zwischen 0,6 und 2 % werden lineare DNA-Fragmente von 0,1 bis 25 kb getrennt.

Agarose wurde in der Konzentration von 1 % in 1x TAE (DNA) oder TBE (RNA) aufgekocht, bis die Agarose gelöst war. Die so erhaltene Lösung wurde in vorbereitete Gelträger gegossen. Die DNA/RNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ficoll-Ladepuffer (15% Ficoll; 0,25% Bromphenol blau; 0,25% Xylenxanol) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 80 V in 1x Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der DNA/RNA Fragmentgrößen wurden geeignete DNA-Längenstandards mit aufgetragen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 10-30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (ca. 10 µg/ml) gefärbt. Auf einem UV-Transilluminator wurden die Gele fotografiert. DNA-Ethidiumbromid-Komplexe emittieren nach Anregung durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm im sichtbaren Bereich.

3.2.6. Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese in einem präparativen Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung durch schwache UV-Beleuchtung (Vilber Lourmat, TCP-15L) im Gel lokalisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines Vektors mit einem Fragment wird durch die T4 DNA-Ligase katalysiert. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden von DNA-Doppelsträngen. Für den Einbau von einem oder mehreren DNA-Fragmenten in einen Vektor wurden 50 ng des linearisierten, mit alkalischer Phosphatase / *shrimp* dephosphorylierten Vektors mit den zu ligierenden DNA-Fragmente(n) in gleicher molarer Konzentration freier Enden, 10x Ligase-Puffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) gemischt und über Nacht bei 4°C oder 14,9°C inkubiert.

T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim Best. Nr.: 481 220
10x Ligase-Puffer	Roche, Mannheim Best. Nr.: 1243 292
Alkalische Phosphatase / <i>shrimp</i>	Roche, Mannheim Best. Nr.: 1758 250

3.2.8. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Um ausreichende Mengen von DNA zu erhalten, wurden die Expressionsvektoren in chemisch kompetente DH5α Bakterien des Stammes *E. coli* transformiert. Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* – Zellen erfolgte nach Inoue *et al.* (1990).

Die DH5α Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mit den gewünschten Plasmiden angeimpft und 30 min. lang auf Eis inkubiert. Die verwendeten Vektoren trugen in der Regel das Ampicillin Resistenzgen. Danach wurde das Gemisch aus Plasmiden und Bakterien 45 Sekunden lang in einen 42°C warmen Wärmeblock gegeben, wodurch das Eindringen der Plasmide in die Bakterien gewährleistet wird. Anschließend wurden die transformierten Bakterien auf vorgewärmten Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Agarplatten enthielten das Antibiotikum Ampicillin, wodurch sichergestellt wurde, dass nur transformierte Kolonien wachsen konnten.

3.2.9. Sequenzierung von DNA

Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip des Didesoxy-Kettenabbruchs sequenziert (Sanger *et al.*, 1992). Um einzelsträngige DNA-Kettenabbruchfragmente zu erzeugen, wurden die Plasmid-DNA-Matritze, ein Oligonukleotid und die *DYEnamic ET Primer DNA Sequencing* Reagenz (5'-Fluorophor gekoppelte ddNTPs, dNTPs, *Taq*-Polymerase) (Amersham Biosciences, Freiburg) in einer PCR eingesetzt. Die Kettenabbruchfragmente wurden mit der Sequenziermaschine MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Freiburg) sequenziert. Die gesamte Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.2.10. Restriktionsverdau von DNA

Um linearisierte Plasmide für die *in vitro* Transkription zu erhalten, wurden jeweils 4-6 µg der jeweiligen Plasmid-DNA in einem Reaktionsansatz von 30 µl Gesamtvolumen mit den entsprechenden Puffern und 10 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen über Nacht bei 37°C enzymatisch gespalten. Die linearisierten Plasmide wurden dann mittels gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft. Vor dem Einsatz der linearisierten DNA als Matrize für die *in vitro* Transkription wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na Acetat (pH 5,2) und 2-fachen Volumen 100 % Ethanol 30 min. bei -20°C precipitiert, anschließend 30 min. bei 4°C und 13000 rpm pelletiert, mit 70 % Ethanol in H₂O gewaschen. Das DNA Pellet wurde danach bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer Endkonzentration von 1 µg/µl in H₂O DEPC aufgenommen.

3.2.11. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine effektive Methode dar, beliebige bekannte DNA-Sequenzen exponentiell zu vervielfältigen. Der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt wird durch die Auswahl geeigneter synthetischer Oligonukleotide (Primer) festgelegt, welche die entsprechende DNA-Sequenz flankieren und mit dieser hybridisieren. Der ausgewählte DNA-Abschnitt wird durch zyklisches Denaturieren des DNA-Doppelstranges, Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize und schließlich die Verlängerung der Primer mit dNTP's durch eine thermostabile DNA-Polymerase vervielfältigt.

PCR-Ansatz für die *in vitro* Transkription zur Herstellung nicht radioaktiv markierter RNA-Proben für die *in situ* Hybridisierung:

Reaktionsansatz:	PCR-Zyklus Parameter:
2,5µl 10x Puffer	94 °C 1 min
0,5µl dNTP'S	36 Zyklen:
0,5µl Primer: T3+4/M13F	94 °C 30 sek.
0,5µl Primer: T7+4/M13R	53 °C 30 sek.
0,1µl Taq Polymerase	72 °C 90 sek.
20,9µl H ₂ O (HPLC)	53 °C 30 sek.
	72 °C 90 sek.
	72 °C 5 min.

2 µl des PCR-Ansatzes wurden anschließend auf einem Agarosegel analysiert. Zur *in vitro* Transkription wurde das PCR Produkt ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

3.2.12. *In vitro* Transkription zur Synthese von RNA-Proben

Die Synthese von RNA-Sonden, welche in *in situ* Hybridisierungen eingesetzt wurden, erfolgte durch *in vitro* Transkription. Das System der *in vitro* Transkription von RNA-Hybridisierungsproben verwendet RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 (*E.coli*) oder SP6 (*Salmonella*) in Gegenwart von Ribonukleotiden. Das DNA-Fragment von dem ein *in vitro* Transkript erstellt werden soll, muss zuvor in die multiple Klonierungstelle des entsprechenden Vektors stromabwärts der spezifischen Phagenpromotoren kloniert werden. Vor dem Einsatz des rekombinanten Plasmids in der Transkriptionsreaktion wird entweder das sich in dem Plasmid befindende DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert, oder das Plasmid wird durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen an der Stelle gespalten, an der die Transkriptionsreaktion stoppen soll.

3.2.13. Markierung von RNA mit Digoxigenin oder Fluoreszin

Zur Herstellung der RNA-Probe wurde das jeweilige DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert (siehe 3.2.12.), oder die Plasmide mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert (siehe

3.2.11.). Die Probe wurde dann mit der entsprechenden RNA-Polymerase in Gegenwart von Digoxigenin oder Fluoreszin markierten Ribonukleotiden synthetisiert.

Reaktionsansatz

10x Transkriptionspuffer (Boehringer)	2 µl
Digoxigenin oder Fluoreszin labeling Mix (Boehringer)	2 µl
DNA	1 µg linearisiertes Plasmid oder 5 µl einer PCR Reaktion
RNAse Inhibitor (Boehringer)	1 µl
RNA Polymerase (T3, T7 oder SP6)	1 µl
H ₂ O DEPC	auffüllen auf 20 µl

Der Ansatz wurde für 2 h in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert, nach der Synthesereaktion mit 2 µl RNAse freier DNase (Boehringer) zur Degeneration der Plasmid-DNA versetzt und 15 min. bei 37°C inkubiert. Das Volumen des Ansatzes wurde mit H₂O DEPC auf 70 µl erhöht, die RNA unter Zugabe von 8 µl 4 M LiCl und 180 µl EtOH über Nacht bei -20°C präzipitiert, bei 4°C pelletiert und in 50 µl H₂O DEPC resuspendiert. Davon wurde 1 µl des Ansatzes zur Überprüfung der Effizienz der Probensynthese im Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA in einem entsprechenden Volumen Hybridisierungslösung aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.14. Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalyse wurde die *in situ* Hybridisierung verwendet. Diese Methode ermöglicht es, den Expressionort spezifischer Gene durch eine Farbreaktion im Gewebe nachzuweisen. Dabei wird die mRNA der zu untersuchenden Gene mit einer komplementären RNA-Sonde hybridisiert und der Komplex durch eine chromogene Farbreaktion im Gewebe nachgewiesen.

Die eingesetzten RNA-Sonden wurden mit Digoxigenin (Dig) oder Fluoreszin (FITC) markiert. Diese wurde durch einen spezifischen Antikörper erkannt, an den das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Das gebundene Enzym AP reagiert dann mit dem Substrat NBT/BCIP, wobei die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten und gleichzeitig NBT reduziert wird (Abb.7). Es entsteht ein schwarz-violett gefärbtes Präzipitat im Gewebe.

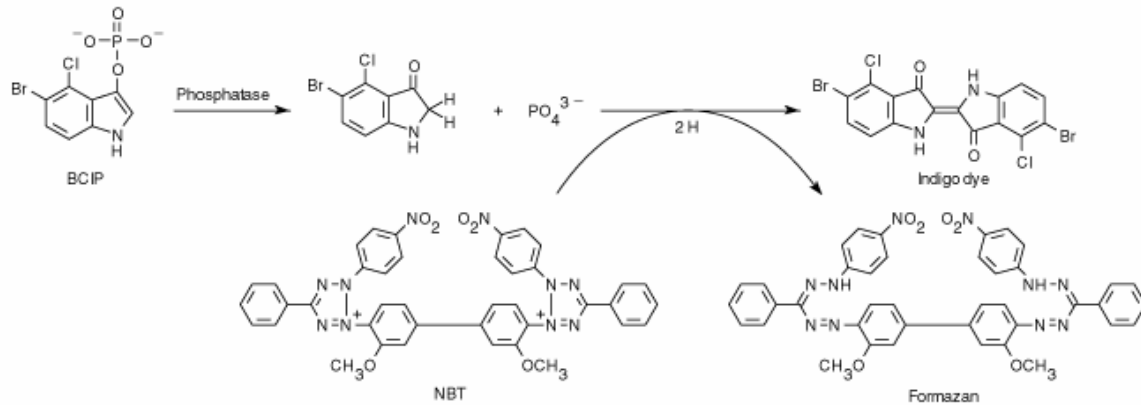


Abb. 7: Hydrolyse von BCIP und Reduktion von NBT durch alkalische Phosphatase.

3.2.15. RNA *in situ* Hybridisierung

3.2.15.1. RNA *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen

Die *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen wurde nach Schulte & Cepko (2000) durchgeführt. Die eingesetzten RNA Sonden wurden, wie unter 3.2.13. beschrieben, mit Digoxigenin (Dig) oder Fluoreszin (FITC) markiert.

Tag 1: Prähybridisierung und Hybridisierung

Die ganzen Embryonen, die zuerst in 4 % Paraformaldehyd fixiert und dann über eine ansteigende Methanolverdünnungsreihe in PBST dehydriert worden waren, wurden über eine absteigende Methanolreihe 75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBST wieder rehydriert (5 Minuten pro Schritt) und für 30-60 min. mit 6 % Wasserstoffperoxid in PBST gebleicht. Anschließend wurden die Embryonen für 3 x 5 min. in PBST gewaschen und für 12 min. mit 5 µg/ml Proteinase K in PBST inkubiert. Daran schloss sich ein Waschschrift für 10 min. in 2 mg/ml Glyzin und zwei Waschschrift für 5 min. in PBST an. Nach einer Fixierung des Gewebes in 4 % Paraformaldehyd mit 0,2 % Glutaraldehyd in PBST für 20 min. wurden die Embryonen 2 x für 5 min. in PBST gewaschen und mit vorgewärmter Hybridisierungslösung für mindestens 1 h bei 70°C prähybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde dann gegen RNA-Hybridisierungslösung ausgetauscht und über Nacht bei 70°C inkubiert. Die RNA-Hybridisierungslösung enthielt entweder nur eine Dig-markierte RNA-Sonde, oder eine Dig-sowie eine FITC-markierte Sonde, wenn zwei Gen-spezifische Transkripte simultan nachgewiesen werden sollten.

Tag 2: Waschen, Blocken und Antikörperinkubation

Die RNA-Hybridisierungslösung wurde entfernt und die Embryonen wurden 3 x 30 min. mit Lösung I bei 70°C und 3 x 30 min. mit Lösung III bei 65°C gewaschen, auf Raumtemperatur heruntergekühlt und 3 x 5 min. in TBST gewaschen. Anschließend wurde mit 10% Schafserum in TBST für 2,5 h bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde mit dem Primärantikörper (1:10.000 anti Dig AP-Fab-Fragment bzw. anti FITC AP-Fab-Fragment in 1% Schafserum in TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tag 3: Waschen

Die Embryonen wurden bei Raumtemperatur 3 x 10 min., 6 x 1 h und dann über Nacht bei 4°C in TBST (auf einem langsam rotierenden Schüttler) gewaschen.

Tag 4: Färbung

Die Embryonen wurden 3 x 10 min. mit NTMT gewaschen und dann in 125 µg/ml BCIP und 250 µg/ml NBT in NTMT inkubiert. Die Schnitte wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem rotierenden Schüttler bis zum Ende der Farbreaktion gelagert. Nach Abschluss der Farbreaktion wurde nochmals 2 x 10 min. mit NTMT gewaschen. Danach wurden die Embryonen in PBS (pH 5,5) für mindestens 30 min. gewaschen und anschließend in 4 % PFA nachfixiert.

Im Falle einer zweiten Farbreaktion wurden die Embryonen nicht nachfixiert, sondern 5 min. bei Raumtemperatur, 30 min. bei 70°C, 3 x 5 min. bei Raumtemperatur in TBST gewaschen. Anschließend wurde der Nachweis von der zweiten Gen-spezifischen Transkripte (Tag 2) durch Inkubation mit 10 % Schafserum in TBST für 2,5 h bei Raumtemperatur und Zugabe des zweiten Markierungsspezifischen Antikörpers begonnen. Bei dieser *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von zwei Genprodukten wurde das jeweils schwächer exprimierte Transkript mit Hilfe einer Dig-markierten RNA-Sonde und unter Verwendung von NBT und BCIP als Chromophore nachgewiesen. Das stärker exprimierte Genprodukt wurde anschließend mittels einer FITC-markierten RNA-Sonde und durch Zugabe von Mangenta-Phosphat als Chromophor sichtbar gemacht.

Lösungen für die RNA *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen:

DEPC-H ₂ O	DEPC in H ₂ O	0,01 %
	ü.N. bei 37°C schwenken; 21 min autoklavieren	
PBST	1x PBS	
	Tween-20	0,1 %
Proteinase K	Stock: 10 mg / ml in H ₂ O	
20 x SSC (<i>Saline Sodium Citrate</i>)	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0,3 M
	pH mit 1 M HCl auf 4,5 einstellen	
10 x TBST	Tris-HCl pH 7,5	1 M
	NaCl	1,5 M
	Tween-20	0,1 %
Hybridisierungs-/ Prähybridisierungslösung	ultra-reines Formamid	50 %
	SSC pH 4.5	5 x
	SDS	1 %
	Hefe tRNA	50 µg / ml
	Heparin	50 µg / ml
Lösung I	Formamid	50 %
	SSC pH 4,5	5 x
	SDS	1 %
Lösung III	Formamid	50 %
	SSC pH 4,5	5 x
	Tween 20	0,05 %

NTMT	NaCl	100 mM
	Tris-HCl pH 9,5	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
	Tween 20	0,1 %
NBT	Stammlösung: 200 x	
	50 mg / ml NBT in 70 % DMF in H ₂ O	
BCIP	Stammlösung: 200 x	
	25 mg / ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat	
	in H ₂ O	
Mangenta-Phosphat	Stammlösung: 200 x	
	25 mg / ml 5-Bromo-6-Chloro-3-Indolylphosphat	
	in DMF	

3.2.15.2. RNA *in situ* Hybridisierung an Vibratomschnitten

Die *in situ* Hybridisierung wurde an schwimmenden Vibratomschnitten durchgeführt. Die eingesetzten RNA Sonden wurden mit Digoxigenin (Dig-UTP) markiert. Die Hybridisierung und Färbung der Vibratomschnitte wurden nach einem Standardprotokoll nach D. Engelkamp *et al.* (1999) durchgeführt.

Tag 1: Prähybridisierung und Hybridisierung

Die dehydrierten Vibratomschnitte (100 µm Dicke) wurden in „24-well“ Zellkulturschalen über eine absteigende Methanolreihe 75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBST rehydriert (5-10 Minuten pro Schritt) und für 10 min. mit 6 % Wasserstoffperoxid in PBST gebleicht. Anschließend wurden die Schnitte für 2 x 5 min. in PBST gewaschen. Danach wurden 200 µl Prähybridisierungslösung pro „well“ zu den Schnitten gegeben und für 4-5 h bei 62-68°C inkubiert. Während der Prähybridisierung wurde die RNA Probe im Hybridisierungspuffer gelöst (Verdünnung 1:100) und für 5-10 min. bei 70°C denaturiert. Die Prähybridisierungslösung wurde dann gegen 120 µl RNA Hybridisierungslösung ersetzt und über Nacht bei 62-68°C inkubiert.

Tag 2: Waschen, Blocken und Antikörperinkubation

Die Hybridisierungslösung wurde entfernt und die Schnitte wurden 2 x 10 min., 2 x 30 min. mit 1x SSC und 2 x 30 min. mit 0,2x SSC bei 62-68°C gewaschen, auf Raumtemperatur heruntergekühlt und 3 x 10 min. in TBST gewaschen. Anschließend wurde mit 10% hitzeinaktiviertem Schafserum in TBST für 3 h bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde mit dem Primärantikörper (1:2000 anti Dig AP-Fab-Fragment in 1 % Schafserum in TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tag 3: Waschen und Färbung

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur 2 x 10 min., und dann 4 x 1 h in TBST (auf einem langsam rotierenden Schüttler) gewaschen. Anschließend wurde 2 x 10 min. mit NTMT gewaschen und das NTMT durch 300 µl NBT/BCIP Färbelösung ersetzt. Die Schnitte wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur und auf einem rotierenden Schüttler bis zum Ende der Farbreaktion gelagert. Nach Abschluss der Farbreaktion wurde nochmals 2 x 10 min. mit NTMT gewaschen. Danach wurden die Schnitte in PBS (pH 3-4) / 1 % TritonX-100 für mindestens 30 min. (bei 4°C bis zu 3 Tagen) gewaschen.

Tag 4: Postfixierung und Eindeckeln

Die Schnitte wurden in 4 % PFA / 0,1 % Glutaraldehyd für 1 h bei Raumtemperatur postfixiert und anschließend für 1 h in PBS (pH 6,3) gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte auf Objektträger überführt, mit Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, PA / USA) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach mindestens einem Tag der Aushärtung wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet und bis zur Auswertung im Dunkeln gelagert.

Lösungen für die RNA *in situ* Hybridisierung an Vibratomschnitten

BSA-Gelantine	PBS	450 ml
	Gelatine	2,2 g
	bei 60°C lösen, auf RT abkühlen	
	BSA	70 g

10 x Salz	NaCl	114 g
	Tris-HCl	14,04 g
	Tris Base	1,34 g
	NaH ₂ PO x H ₂ O	7,8 g
	Na ₂ HPO ₄	7,1 g
	0,5 % EDTA	100 ml
	auffüllen auf 1l mit H ₂ O, pH 7,5	
Prähybridisierungslösung	10 x Salz	1 x
	ultra-reines Formamid	50 %
	Blocking Reagenz	2 %
	DEPC-H ₂ O	
Hybridisierungslösung	10 x Salz	1 x
	ultra-reines Formamid	50 %
	50 % Dextran-Sulfat	10 %
	Hefe tRNA (10 mg/ml)	1 mg/ml
	50 x Denhardt's	1 x
	Blocking-Reagenz	2 %
	DEPC-H ₂ O	
Lösung A (1 x SSC)	SSC pH 7,0	1 x
	Formamid	50 %
	Tween 20	0,1 %
Lösung A (0,2 x SSC)	SSC pH 7,0	0,2 %
	Formamid	50 %
	Tween 20	0,1 %

3.2.16. Herstellung von sagitalen oder koronalen Gefrierschnitten

Die geernteten Embryonen wurden über Nacht in 4 %igem PFA bei 4°C fixiert, dann in 30 % Sukrose in 1x PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen in Einbettmedium (Leica, Nussloch) eingebettet, entsprechend ausgerichtet und auf einen Kryostatblock bei -18°C aufgefroren. Es wurden 12-14 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Objektträgern (Menzel Gläser, Braunschweig) gesammelt. Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.17. Antikörperfärbung

Für die immunhistochemischen Markierungen wurden die zu untersuchenden Gefrierschnitte vorsichtig bei Raumtemperatur aufgetaut. Die aufgetauten Gefrierschnitte wurden dann mit einem Fettstift umrandet. Die Inkubation mit dem Erstantikörper in 5 % Chemiblocker + 0,5 % Triton erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Schnitte 3 x 10 min. mit PBS gewaschen. Der gebundene Erstantikörper wurde mit einem spezifischen Zweitantikörper nachgewiesen. Dazu wurden die Schnitte ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Zweitantikörper in 5 % Chemiblocker (Chemicon, Temecula / USA) + 0,5 % Triton inkubiert und danach wieder 3 x 10 min. mit PBS gewaschen und in Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, PA / USA) eingedeckelt. Die Auswertung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

3.2.18. Herstellung von Vibratomschnitten

Die geernteten Hühnchen Embryonen wurden nach der Fixierung in 4 % PFA für 10 min. in 1x PBS gewaschen und für 5 min. in Glutaraldehyd präfixiert. Zum Einbetten wurde, je nach Mengenbedarf, 250 - 400 µl 25 % Glutaraldehyd (Sigma) zu 2,5 - 4 ml BSA / Gelatine-Mix gegeben, schnell gemischt und in eine Einbettform (*Resin Embedding Moulds* 12mm x 15 mm x 5 mm von Agar Scientific LTD; Plano) mit den jeweiligen Embryonen gegeben. Anschließend wurde der erhärtete Block aus der Einbettform genommen, mit einer Rasierklinge zurechtgeschnitten und mit Sekundenkleber am Vibratomblock befestigt. Das Vibratombad wurde mit eiskaltem 1x PBS gefüllt. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 100-150 µm hergestellt (Vibratomeinstellungen: Geschwindigkeit 4-5; Amplitude 8-10). Anschließend wurden die Schnitte in „multi-well“ Platten überführt und durch eine

aufsteigende Methanolreihe: 25 %, 50 %, 75 % Methanol in PBST und 2 x 100 % Methanol dehydriert. Die Schnitte wurden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.19. Mikroelektroporation

Die Mikroelektroporation (Momose *et al.*, 1999) stellt eine effektive Methode dar, Funktionen von Genen in einem sich entwickelnden Organismus zu untersuchen. Dabei werden durch zwei Mikroelektroden, die das Zielgewebe flankieren, elektrische Impulse verabreicht. Die gegebenen elektrischen Impulse permeabilisieren kurzzeitig die Zellmembranen, wodurch die vorher injizierte DNA-Lösung in die Zellen eindringen kann.

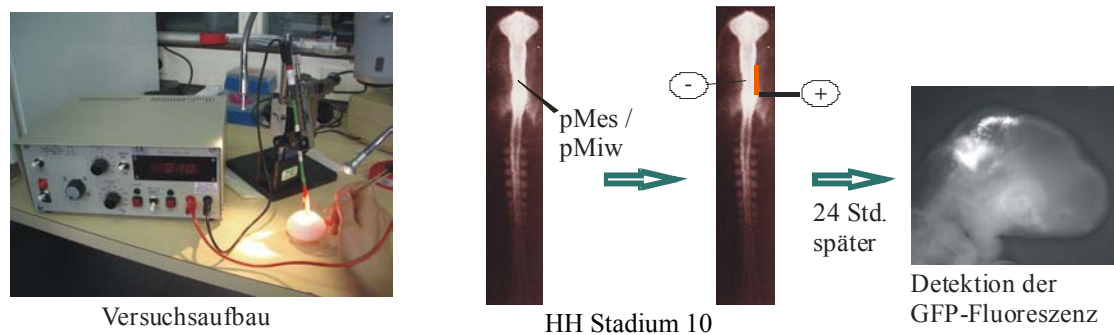


Abb. 8: Schematische Darstellung und Versuchsaufbau der Mikroelektroporation.

Befruchtete Eier wurden horizontal bei $37,8^{\circ}\text{C}$ bis zum Entwicklungsstadium HH 10-11 (Hamburger und Hamilton, 1992) inkubiert. Damit der Embryo beim Öffnen des Eies nicht verletzt wurde, wurde mit einer Pinzette am verdickten Ende ein Loch geschlagen, welches ein Absinken des Embryos bewirkt. Dann wurde ein kleiner Bereich der Schale über dem Embryo entfernt. Die jeweilige DNA-Lösung wurde in einer Konzentration von $2-3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ durch eine Mikroinjektionskapillare in das Neuralrohr injiziert. Nach Zugabe von $250 \mu\text{l}$ sterilem $1\times$ PBS wurde die Anode (spitzer Wolframdraht) direkt in das zu elektroporierende Gewebe inseriert. Die Kathode (Platindraht) wurde per Hand am äußeren Rand so plaziert, dass Anode und Kathode sich direkt gegenüber stehen. Es wurden bei etwa 1 kb großen Konstrukten 3 und bei bis zu 5 kb großen Konstrukten 5 Impulse von 10 Volt und einer Impulszeit von 50 ms gegeben. Anschließend wurden die manipulierten Eier mit Tesafilm abgeklebt und bis zum gewünschten Alter weiter bei $37,8^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Der Erfolg der Mikroelektroporation konnte bis zu 48 Std. nach der Elektroporation mittels GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 8).

DNA-Lösung

DNA	2-3 µg
10x Fast Green FCF (Sigma)	1 µl
PBS	auf 10 µl Gesamtvolumen

Wolfram-Draht Plano GmbH, Wetzlar
Durchmesser: 0,125 mm, Best. Nr.: E407-4

Borsilikat Glaskapillaren Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK
Durchmesser 1,2 x 0,69 mm, Best. Nr.: GC1 20F-10

3.2.20. Implantation von Fgf8-Protein getränkten Acrylkügelchen

Die Implantation von Fgf8-Protein getränkten Acrylkügelchen wurde nach einem Standardprotokoll nach P.H. Crossley *et al.* (1996b) durchgeführt.

Heparin beschichtete Acrylkügelchen (Sigma) wurden 2 x in sterilem 1x PBS gewaschen, mit einer Pinzette halbiert und über Nacht bei 4°C in einer FGF8-Proteinlösung (R&D Systems) mit unterschiedlichen Konzentrationen getränkt. Anschließend wurden die Kügelchen erneut mit sterilem 1x PBS gewaschen und mit Hilfe eines spitzen Wolframdrahtes in die laterale Wand des Mittelhirns von Hühnchen-Embryos HH 11-13 inseriert. Anschließend wurden die manipulierten Eier mit Tesafilm abgeklebt und bis zu 24 Stunden weiter bei 37,8°C inkubiert.

Heparin, Immobilized on acrylic beads Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: H-5263

Rm FGF-8b, recombinant mouse (E.coli-derived) R&D Systems (Minneapolis / USA),
Best.-Nr.: 423-F8

3.2.21. Virusinjektion

Die Produktion des von RCAS abgeleiteten Retrovirus wurde nach Ausubel *et al.* (1998) durchgeführt.

Die RCAS-Vektoren sind eine Familie der retroviralen Vektoren, entstanden aus dem SR-A Stamm der Rous sarcoma Viren (RSV). RSV ist ein Mitglied der Avian Sarcoma-Leukosis Virus Familie (ASLV). RSV beinhaltet das ganze Komplement der viralen Gene und zusätzlich das Oncogen src. Der RCAS Vektor macht es möglich, die kodierende Sequenz eines zu untersuchenden Proteins, das so genannte Transgen, gegen das src Oncogen auszutauschen. Der Name RCAS steht für “Replications Competent ASLV long terminal Repeat” (LTR) mit einem “Splice acceptor”. Die RCAS Vektoren behalten dabei die src splice acceptor site und exprimieren das eingebrachte Gen. Der Vektor wird in geeigneten Zellen (zum Beispiel DF-1 Zellen) repliziert. Der Lebenszyklus des erhaltenden retroviralen Virus beginnt mit der Bindung des envelope Glycoproteins an einen Oberflächenrezeptor der Zielzelle. Diese Interaktion wird durch die Fusion der viralen und zellulären Membranen ermöglicht. Nach der Fusion der viralen und zellulären Membranen, dringt der Virus in das Zytoplasma der Zelle ein. Im Zytoplasma wird dann das einzelsträngige RNA-Genom des Virus in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Dies geschieht durch das Enzym Reverse Transkriptase. Die doppelsträngige, virale DNA gelangt dann in den Zellkern der Zielzelle und wird in ihre DNA integriert, wodurch das virale Transgen sich nun in dem Genom der Wirtszelle befindet. Das Transgen wird als Teil des Genoms der Wirtszelle exprimiert und bei jeder Zellteilung auf beide Tochterzellen weitergegeben. Dadurch wird das zu untersuchende Protein ektopisch in den infizierten Zellen gebildet und die Auswirkungen dieser Manipulation auf den Ablauf der Embryonalentwicklung können *in vivo* untersucht werden.

Hühnchenembryonen wurden bis HH Stadium 11 bei 37,8°C inkubiert. Danach wurde das Ei wie zur Elektroporation geöffnet. Um ein Verstopfen der Injektionskapillare zu vermeiden, wurde das jeweilige Virusaliquot kurz abzentrifugiert. Dann wurden 8 µl Virusaliquot (die Virustiter lagen zwischen 7×10^7 und 2×10^8) mit 1 µl Fast Green und 1 µl Polybrene (Sigma-Aldrich, Steinheim; nur bei RCAS-B) versetzt. Die Viruslösung wurde mit Hilfe einer Mikroinjektionskapillare in das Neuralrohr des Embryos injiziert. Anschließend wurden die Eier mit Tesafilm abgeklebt und weiter bei 37,8°C bis zum gewünschten Alter inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Embryonen in 4 %igem PFA bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.22. Zellkultur

Alle Arbeiten wurden an einer Sterilbank (Heraeus) durchgeführt. Arbeitsflächen wurden mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt. Glasgeräte und -gefäße wurden hitzesterilisiert, Plastikmaterialien steril erworben.

3.2.22.1. Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden auf Trockeneis transportiert. Nach zügigem Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen in ein steriles 15 ml-Kulturröhrchen überführt und mit 10 ml Kulturmedium tropfenweise versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 800 rpm für 3 min. (Megafuge 1.0 R, Heraeus) wurde das Medium abgenommen und das Zellpellet in 6 ml-Kulturmedium resuspendiert und in eine 10 cm-Kulturschale überführt.

3.2.22.2. Kultur von Zelllinien

Die Kultur von 293T Zellen erfolgte in Brutschränken (Heraeus) in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C. Zum Passagieren der adhärent wachsenden Zellen wurden diese nach Entfernen des Mediums mit 1 x PBS gewaschen und pro 10 cm-Kulturschale mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37°C, 5 min.) abgelöst und in einer geeigneten Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt. Die 293T Zellen wurden in DMEM + 10% FCS kultiviert und alle 4 Tage 1:9 passagiert.

3.2.22.3. Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung adhärenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Kulturschalen einmal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37°C) von den Platten abgelöst und anschließend mit 2-3 ml Kulturmedium versetzt in ein 15ml-Kulturröhrchen überführt. Die Zellen wurden 10 min. bei 800 rpm und Raumtemperatur sedimentiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das Medium wurde abgenommen und das Pellet in insgesamt 1 ml eisgekühltem Einfriermedium (Kulturmedium mit Dimethylsulfoxid, Verhältnis 9:1) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann in ein auf

Eis gelagertes Kryoröhrchen überführt und über Nacht in einem Isopropanolbad langsam auf -70°C gekühlt, bevor es am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff überführt wurde.

Dimethylsulfoxid (DMSO) Appllichem
Best.-Nr.: A 3608,0500

3.2.22.4. MATra-vermittelte Transfektion

Zur transienten Expression rekombinanter Proteine wurden 293T-Zellen mittels MATra („Magnet Assisted Transfection“) transfiziert. Für dieses Verfahren ist hochreine DNA erforderlich, die durch Maxi-Präparation (siehe 3.2.1.) gewonnen wurde. 293T Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion im Verhältnis 1:4 passagiert, so dass eine Konfluenz von etwa 75% am Tag der Transfektion erreicht wurde. In sterilen Röhrchen wurden pro 10 cm-Kulturschalen 1 ml DMEM ohne Serum und Antibiotikum mit einer Gesamtmenge von 10 μg der zu transfizierenden DNA und 10 μl MATra-Reagenz vermischt und für 20-30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde pro 10 cm Kulturschale 1 ml DMEM ohne Serum und Antibiotikum vorgelegt und mit dem Transfektionsansatz vermischt. Die Zellen wurden danach für 15 min. bei 37°C bei 5 % CO_2 auf einer Magnetplatte inkubiert. Abschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch frisches DMEM + 10% FCS ersetzt. Die 293T Zellen wurden bis zur Analyse der Genexpression für 12-48 h weiterkultiviert.

3.2.23. RNA Interference

Das Phänomen der RNA Interferenz (RNAi) beschreibt einen hochspezifischen Mechanismus zur Stilllegung von Genen. Ausgangspunkt des RNAi-Mechanismus ist doppelsträngige RNA (dsRNA), die mit dem Ziel-Gen identische Sequenzen aufweist. Diese dsRNA wird zur Bildung von RNAi in kleinere Sequenzabschnitte von 21-23 Nukleotiden (siRNA – „short interfering RNA“) zerlegt. Es konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch eine Übertragung oder Expression dieser siRNA eine gezielte Inaktivierung von Genen in Säugerzellen erreicht werden kann (Mittal *et al.*, 2004).

3.2.23.1. Herstellung der RNAi-Konstrukte

Die RNAi-Konstrukte mit einer Länge von 19 Basen zur Inaktivierung von *cRPTPλ* wurden mit Hilfe des „siRNA Target Designers“¹ von Promega (Mannheim) gestaltet. Um später eine unspezifische Unterdrückung ähnlicher Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen zu verhindern, wurden vier unterschiedliche Oligonukleotide aus „Linker“-Regionen der *cRPTPλ*-Sequenz ausgewählt und bei Invitrogen (Karlsruhe) bestellt. Die Oligonukleotide wurden wahlweise nach der Strategie von Scherr *et al.* (2003) oder Schwarz *et al.* (2003) zur Formation der so genannten „Hairpin“-Sequenzen gestaltet (Tab. 13). Die siRNA-Konstrukte wurden nach Anleitung von Promega in den psiSTRIKE™ hMGFP-Vektor kloniert, welcher die Expression der siRNA *in vivo* ermöglicht. Dieser Vektor enthält einen U6-Promotor, der die Transkription der „Hairpin“-Sequenz initiiert und einen CMV-Promotor zur Expression des synthetischen hMGFP-Protein („human Monster green fluorescent protein“) besitzt (Abb. 9).

Bezeichnung	Zielsequenz	Position im Genom nach eigener Sequenzierung	„Hairpin Sequenz“
RPTPL-RI_A	GTC AAC ATG ACC AAA GCA A	1915-1933	TTT GTG TAG (Scherr <i>et al.</i> , 2003)
RPTPL-RI_B	GGG ATG CTT CAA AGA AGA A	2272-2291	TTT GTG TAG (Scherr <i>et al.</i> , 2003)
RPTPL-RI_C	GCT TCA AGC AGG AGT ATG A	2237-2255	CTT CCT GTC A (Schwarz <i>et al.</i> , 2003)
RPTPL-RI_D	GAG ATC ACC ACC AAC ATA T	1333-1351	CTT CCT GTC A (Schwarz <i>et al.</i> , 2003)

Tab. 13: siRNAs gegen *cRPTPλ*

¹ www.promega.com/siRNADesigner/default.htm

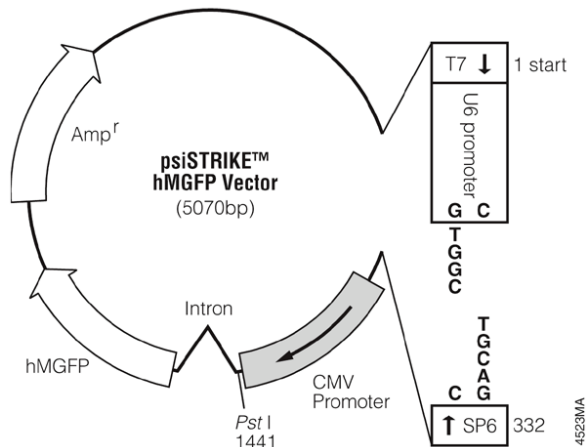


Abb. 9: psiSTRIKE™ hMGFP Vektor

3.2.23.2. Messung der Effektivität von siRNA-Konstrukten

Das psiCHECK™-System von Promega (Mannheim) ermöglicht den quantifizierbaren Nachweis des Erfolgs der Inaktivierung von Genen durch RNAi und beruht auf dem Nachweis der *Renilla*-Luciferase, die als Reporter gen mit dem Zielgen fusioniert wird. Der RNAi-Effekt wird in diesem Fall durch Kotransfektion mit den siRNA-Oligos im psiSTRIKE™-2-Vektor eingeleitet. Geeignete RNAi-Zielsequenzen führen zur Degradation der endogenen Ziel-mRNA und der Fusions-RNA aus *Renilla*- und Ziel-Gen (Abb. 10). Die *Renilla*-Luciferaseaktivität lässt sich mit dem Dual-Glo™-Luciferase-Protokoll (Promega, Mannheim) nachweisen und quantifizieren. Die Verminderung der *Renilla*-Lumineszenz ist proportional zur Unterdrückung des Zielgens.

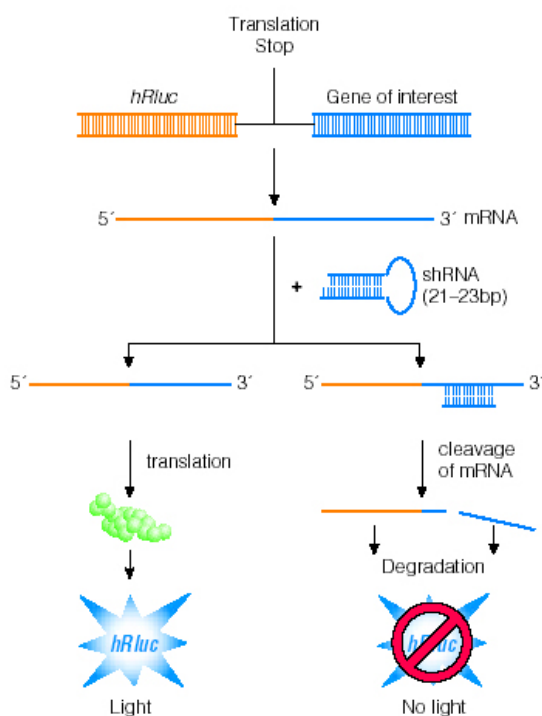


Abb. 10: Mechanismus der Aktivität des psiCHECK™ Vektors. Nach Klonierung des Zielgens in die Klonierungsregion wird der Vektor in eine Säugetier-Zelllinie transfiziert und das *Renilla*-Gen und das Ziel-Gen werden transkribiert. Bei Kotransfektion mit siRNA-psiSTRIKE bindet die siRNA an die mRNA des Ziel-Gens und initiiert den RNAi-Prozess. Die fusionierte *Renilla* mit der mRNA des Zielgens wird degradiert, was zu einem verringerten *Renilla*-Luciferasesignal führt.

Der in dieser Arbeit verwendete psiCHECK™-2 Vektor (Promega, Mannheim) enthielt neben dem *Renilla*-Luciferase Reporter gen (*hRluc*) ein zusätzliches Firefly-Luziferase Reporter gen (*hLuc+*) (Abb. 11). Die Firefly-Expressionskassette besteht aus einem HSV-TK Promoter, einem synthetischen Firefly-Luziferasegen und einem SV40 poly(A)-Signal. Diese Firefly-Reporterkassette dient als ein Reporter für die Normalisation der Transfektion, somit kann das Signal der *Renilla*-Luziferase gegen das Signal der Firefly-Luziferase normalisiert werden.

In den psiCHECK™-2 Vektor wurde ein Teilfragment von *cRPTPλ* (*cRLKB-3*) kloniert, welches die Zielsequenzen der siRNA-Konstrukte enthielt. Die Klonierung wurde nach Anleitung von Promega durchgeführt.

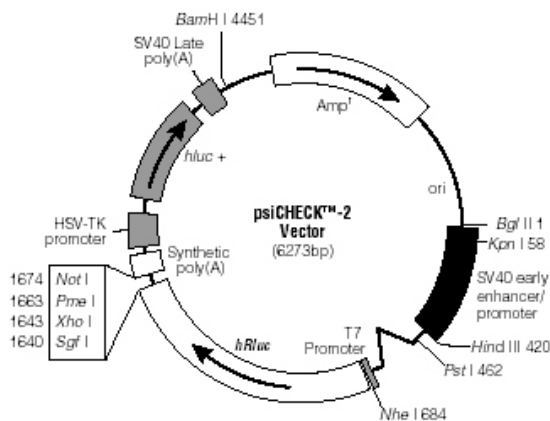


Abb. 11: psiCHECK™-2 Vektor

3.2.23.3. Quantifizierung der Luziferase-Aktivität

Der RNAi-Effekt wurde vor dem *in vivo* Einsatz zunächst in HEK 293T-Zellen getestet. Dazu wurden HEK 293T-Zellen auf einer 60-80 % konfluent bewachsenen „6-well“-Platte mit Hilfe der MATra-Reagenz transfiziert (siehe 3.2.22.4.). Es wurden je 1,5 µg DNA der siRNA-Konstrukte (RPTPL-RI_A-, RPTPL-RI_B-, RPTPL-RI_C- und RPTPL-RI_D-psiSTRIKE™ hMGFP) mit 1,5 µg DNA von *cRLKB-3*-psiCHECK™-2 kotransfiziert. Als Kontrolle wurden 1,5 µg *cRLKB-3*-psiCHECK™-2 allein transfiziert.

Etwa 48 Stunden später wurden die transfizierten Zellen mit 250 µl Trypsin abgelöst und anschließend mit 1,75 ml Medium durchmischt. Von diesem Gemisch wurden jeweils 100 µl und 200 µl in beschichtete „96-well“-Platten transferiert und anschließend erneut 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Dual-Glo-Luziferase-Reagenzien, Computer und Glomax-Luminometer vorbereitet (alles nach Anleitung von Promega).

Das Medium der „96-well“-Platten wurde auf 75 µl reduziert und danach wurden jeweils 75 µl der Dual-Glo-Luziferase Reagenz für 10 min. bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Dann wurden die Luziferase-Aktivitäten der *Renilla*- und der Firefly-Luziferase im GlomaxTM-Platten-Luminometer (Promega, Mannheim) gemessen.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min. mit dem Dual-Glo-Stop&Go-Luziferase-Reagenz, von dem wieder 75 µl zugegeben wurden, wurde die Lumineszenz erneut gemessen. Die jeweiligen Messungen wurden 2x durchgeführt und in den anschließenden Berechnungen zur Normalisierung der Luziferase-Aktivitäten wurde jeweils der Mittelwert verwendet.

3.2.24. Proteinbiochemie

3.2.24.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; modifiziert nach Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von denaturierten Proteinen. Das Kochen einer Proteinprobe in dem SDS-haltigen reduzierenden Puffer führt zur Denaturierung aller Proteine. Die Eigenladung des Proteins wird durch die Anlagerung der SDS-Moleküle überdeckt, so dass anionische Protein-SDS-Komplexe gebildet werden. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol zum Probenpuffer reduziert die Disulfidbrücken der Polypeptidketten und trägt zur Entfaltung bei.

Es wurden Trenngele mit 7,5 % oder 10 % Polyacrylamid gegossen und nach der Polymerisation mit einem 4%igen Sammelgel, in denen Taschen zum Probenauftrag ausgespart blieben, überschichtet. Als Proben wurden bei Minigelen pro Spur 5-20 µg Protein (Schichtdicke 0.75 mm) in SDS-Probenpuffer denaturiert (5 min, 95°C) und aufgetragen. Zur Bestimmung der Größen aufgetrennter Proteine wurde eine Spur mit *BenchMark prestained marker* (Invitrogen) beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in Laemmli-Laufpuffer bei 20–30mA (1 oder 2 Gele). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen (siehe 3.2.4.3.) transferiert, wo sie mittels Immundetektion spezifisch sichtbar gemacht werden konnten. Sollte hingegen nur die Proteinmenge einer Probe überprüft werden, so wurde das Gel für 1 h mit Coomassie-Blau angefärbt (modifiziert nach Weber und Osborn, 1969) und anschließend für 3-12 h in Entfärbelösung geschwenkt, um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen.

Polyacrylamid-Trenngele	Acrylamid (40%)	7,5 % oder 10 % (v/v)
	Tris/HCl	0,375 M
	SDS	0,1 % (w/v)
	Die Polymerisation des Gels wurde vor dem Gießen durch Zugabe folgender Komponenten gestartet:	
	10 % Ammoniumpersulfat	4 µl/ml
	TEMED	0,72 µl/ml
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin	
	Sigma	25 ml
	Best.-Nr.: T9281	
Polyacrylamid-Sammelgel	Acrylamid (40%)	4 % (v/v)
	Tris/HCl	0,125 M
	SDS	0,1 % (w/v)
	Die Polymerisation des Gels wurde vor dem Gießen durch Zugabe folgender Komponenten gestartet:	
	10 % Ammoniumpersulfat	6 µl/ml
	TEMED	0,72 µl/ml
5 x SDS-Probenpuffer	SDS	15 % (w/v)
	Glycerol	50 % (v/v)
	Mercaptoethanol	15 % (w/v)
	Bromphenolblau	1,5 % (w/v)
<i>BenchMarkPrestained SDS Molecular Weight Marker</i>	Invitrogen	
	Best.-Nr.: 10748-010	
10 x Laemmli-Laufpuffer	Tris	250 mM
	Glycine	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	pH 8,3	

Coomassie-Blau	Coomassie Blau R-250	0,25 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	50 % (v/v)
Entfärbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	50 % (v/v)

3.2.24.2. Western-Blot („Semidry-Blot“)

Unter *Western-Blotting* versteht man den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran und erlaubt spezifische Nachweisreaktionen von den auf Membran immobilisierten Proteinen.

Der Transfer aufgetrennter Proteine aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membran erfolgte elektrophoretisch in einer Horizontalblotkammer. Auf die Anodenplatte der Apparatur wurden 3 Schichten Whatman 3MM-Papier, die zuvor in Transferpuffer getränkt worden waren, aufgelegt und blasenfrei mit einer feuchten PVDF-Membran (Invitrogen), dem Polyacrylamidgel und 3 weiteren Lagen getränkten 3MM-Papiers überschichtet. Nach dem Auflegen der Kathodenplatte wurden die Proteine aus dem Gel für 1 h bei einem Strom von 1 mA/cm² auf die Membranfläche transferiert. Der erfolgreiche Transfer wurde durch reversibles Anfärben der Nitrozellulose mit Ponceau S überprüft. Die Membran wurde dazu 5 min. mit Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. entfärbt, bis die Proteine durch eine rote Färbung sichtbar waren.

Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycine	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
	pH8,3	
Ponceau-S-Lösung	Ponceau S	0,5 % (w/v)
	Trichloressigsäure	1 % (w/v)

3.2.24.3. Immundetektion von Proteinen

Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an PVDF-Membran zu verhindern, wurden diese vor der Immundetektion 2 x 5 min. in TBST gewaschen und für mindestens 1 h mit 5% (w/v) Milchpulver in TBST behandelt. Anschließend wurde die Membran mit einem in TBST mit 3 % Rinderserumalbumin (BSA) verdünnten Antikörper unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen eines unspezifisch gebundenen Antikörpers wurde dreimal für je 10 min. mit TBST gewaschen. Zur Detektion des Antikörpers wurden die Membranen dann in einer Lösung eines geeigneten Antikörper-Peroxidase-Konjugats in TBST für 1 h inkubiert und anschließend 1 x 10 min. in TBST und 3 x 10 min. in TBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Bindung des Konjugats über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen.

Dazu wurde die gewaschene Membran für 2 min. mit einem Gemisch der Detektions-Reagenzien 1 und 2 (1:1) des ECL-Systems bedeckt. Nach dem Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen und die Signale für Zeitintervalle von 2-30 min aufgenommen und schließlich auf einem Film abgebildet.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung	Blockpuffer
anti-HA-Peroxidase, High Affinity Roche Best.-Nr.: 2013819	1 : 10.000	(1. und 2. Antikörper in einem)		3 % (w/v) BSA / 1x TBST
anti-β-Catenin, Kaninchen, polyklonal upstate Best.-Nr.: 06-734	1 : 1000	Anti-Kaninchen IgG-HRP, Cell Signaling Technology Best.-Nr.: 7071-1	1 : 10 000	3 % (w/v) BSA / 1x TBST
anti-HA, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology Inc. Best.-Nr.: sc-805	1: 1000	Anti-Kaninchen IgG-HRP, Cell Signaling Technology Best.-Nr.: 7071-1	1 : 10 000	3 % (w/v) BSA / 1x TBST

Tab. 14: Für die Western-Blot-Analyse verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

ECL-System

Amersham Biosciences,

Lumigen PS-3 detection reagent

Nach Immundetektion können die gebundenen Antikörper wieder von der Membran entfernt werden, so dass der jeweilige Blot mehrmals mit verschiedenen Antikörpern angefärbt werden kann.

Dazu wurde der Blot nach der Behandlung mit dem ECL-System 15 min. in PBS gewaschen und in "Stripping"-Puffer für 30 min. in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS für 10 min. konnte mit der üblichen Absättigungs-Reaktion für den als nächstes zu verwendenden Antikörper fortgefahren werden.

<i>Stripping</i> -Puffer	β-Mercaptoethanol	100 mM
(für PVDF)	Tris/HCl	50 M
	SDS	2 % (w/v)

3.2.24.4. Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation können Proteinkomplexe z.B. aus Zellextrakten mit spezifischen Antikörpern aufgereinigt werden. Dabei werden die Antikörper über ihre Fc-Regionen an eine Matrix gekoppelt. Als Matrix kann Protein A bzw. Protein G von *Staphylococcus aureus* dienen. Bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern, wurde in der Regel Protein G als Matrix genutzt. Antigen und spezifisch gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert. Die Antikörper bleiben weitgehend an der Matrix gebunden.

Wenn gegen das jeweilige Protein kein Antikörper verfügbar war, wurde in der MHR von Embryos HH 10-11 (Hamburger und Hamilton, 1992) DNA mit einem HA-tag mittels Mikroelektroporation überexprimiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation der manipulierten Eier, wurden die Mittelhirne der Embryos heraus präpariert. Dieses Gewebe konnte bei -80°C gelagert werden, oder sofort für eine Immunpräzipitation verwendet werden.

5 Mittelhirne wurden in 100 µl Lysispuffer resuspendiert und 15 min. auf einem Rotator bei 4°C inkubiert. Dem schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C an. Für die Kontrolle der Proteinexpression wurden danach 10 µl Lysat abgenommen, mit 2,5 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20°C gelagert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde der Überstand auf mit Lysispuffer gewaschene Protein G-Agarose gegeben und für 30 min. auf einem Rotator bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand, welcher die zu präzipitierenden Proteine enthielt, mit 2-5 µg anti-HA-Antikörper (siehe Tab. 14) für 4-5 h auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Danach wurde Protein G-Agarose für 1 min. bei 10.000 rpm sedimentiert und mit Lysispuffer gewaschen. Zu der Agarose

wurde der mit dem Antikörper versetzte Extrakt der Mittelhirne gegeben und ÜN erneut auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag schloss sich zunächst eine Zentrifugation für 5 min. bei 10.000 rpm an. Die Protein-G Agarose wurde in fünf Waschschritten mit jeweils 200-400 µl gekühltem Lysispuffer und 1 x mit 1 x *avian* Ringerlösung gewaschen. Die Proteine wurden dann mit 20 µl 1x SDS-Probenpuffer 5 min. auf einem Schüttler eluiert und die Agarose in einem Zentrifugationsschritt von 5 min. bei 13.000 rpm sedimentiert. Schließlich wurden die Proteinextrakte mit den Proteinlysaten zusammen für 5 min. bei 95°C denaturiert und das entsprechende Antigen durch SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot (siehe 3.2.24.2.) nachgewiesen.

Lysispuffer (nach Yan <i>et al.</i> , 2002)	NaCl	150 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	20 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Orthovanerdate	1 mM
	Igepal	1 %
	SDS	0,1 %
	Na-Deoxycholat	0,5 %
	Protease Inhibitor Tablette	1 x @ 50 ml

Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
	Best.Nr.: 1719416

10 x <i>Avian</i> Ringerlösung	NaCl	8,5 g
	KCl	0,42 g
	CaCl ₂	0,025 g
	HPLC-H ₂ O	@ 100 ml steril filtriert

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ aus dem Hühnchen

Auf der Suche nach neuen Genen, die in Vorläuferzellen der Hühnchenretina exprimiert werden, wurde mRNA aus Augen bzw. optischen Vesikeln von Hühnchenembryonen im Stadium HH 10-21 (Hamburger und Hamilton, 1992) isoliert und mit Hilfe des „pBluescript[®] II XR cDNA Library Construction Kits“ eine cDNA Bibliothek erstellt. Im Zuge dessen wurde eine Teilsequenz identifiziert, welche homolog zur Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (*RPTP λ*) der Maus ist (D. Schulte, persönliche Kommunikation).

Um die komplette DNA von *cRPTP λ* zu amplifizieren, wurde die Strategie der „Consensus-Degenerate Hybrid Oligonukleotid Primer (CODEHOP)-PCR“ angewandt (Rose *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2003). Dabei wurde *cRPTP λ* aus Gesamt-RNA von Hühnchenköpfen der Stadien HH 15-20 mittels degenerierter PCR kloniert. Die dafür verwendeten Oligonukleotide wurden von den bekannten Sequenzen der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase aus der Maus (NCBI: U55057), des Menschen (NCBI: gi1518671) und *Xenopus laevis* (NCBI: BF427560) abgeleitet. Die Oligonukleotide bestehen aus einer kurzen 3'-degenerierten Kernregion und einer äußeren längeren 5'-Consensus-Region und wurden mit Hilfe des online CODEHOP-Programms² entworfen. Da die Sequenzierung des mittleren Segmentes von *cRPTP λ* zu Beginn meiner Arbeit schon weit vorangeschritten war, wurde zunächst ein Teilfragment von 490 bp des 3'-Endes amplifiziert (siehe Anhang 4.1., 4.2.). In der Zwischenzeit wurde von Aerne *et al.* die Sequenz von *cRPTP ψ* , welche zu 98 % mit *cRPTP λ* identisch ist, in der NCBI-Datenbank (AY147868) abgelegt (Aerne *et al.*, 2003). Daher konnte von einer Amplifikation des restlichen 5'- und 3'-Endes von *cRPTP λ* abgesehen werden (Tab. 15).

Mehrere unabhängige Gruppen identifizierten *RPTP λ* gleichzeitig in verschiedenen Spezies. Im Einklang mit der Nomenklatur für Protein Tyrosin Phosphatasen nach Alonso *et al.* (2004), haben wir das Molekül, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, *cRPTP λ* genannt. Um die Sequenzidentitäten zwischen *RPTP λ* von Hühnchen und anderen Spezies zu

² <http://blocks.fhcr.org/codehop.html>

bestimmen, wurden paarweise Sequenzvergleiche („pairwise sequence alignments“) durchgeführt. Hierfür wurden Sequenzen einiger Modellorganismen ausgewählt (Tabelle 15).

Protein	Spezies	Sequenzidentität [%]	Referenz
RPTP λ	Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	100	diese Arbeit
RPTP ψ	Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	98	Aerne <i>et al.</i> , 2003
RPTP λ	Maus (<i>Mus musculus</i>)	86	Cheng <i>et al.</i> , 1997
FTP-1	Maus (<i>Mus musculus</i>)	86	Yoneya <i>et al.</i> , 1997
PCP2	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	86	Wang <i>et al.</i> , 1996
PTPJ	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	87	Wang <i>et al.</i> , 1997
RPTP ψ	Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	86	Sommer <i>et al.</i> , 1997

Tab.15: Sequenzidentität von *RPTP λ* in unterschiedlichen Spezies.

cRPTP λ ist ein Mitglied der transmembranen Typ IIb-Klasse der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatasen. Wie die Sequenzanalyse ergab, ist es durch eine N-terminale Meprin-A5-PTP μ (MAM) Domäne, ein extrazelluläres Segment mit einer Kombination von vier Fibronectin (FN) Typ III und einer Immunglobulin (Ig) – ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne und zwei intrazellulären Phosphatasedomänen gekennzeichnet (Abb. 12). Die Protein-kodierende Sequenz von *cRPTP λ* hat eine Größe von 4,6 kb.

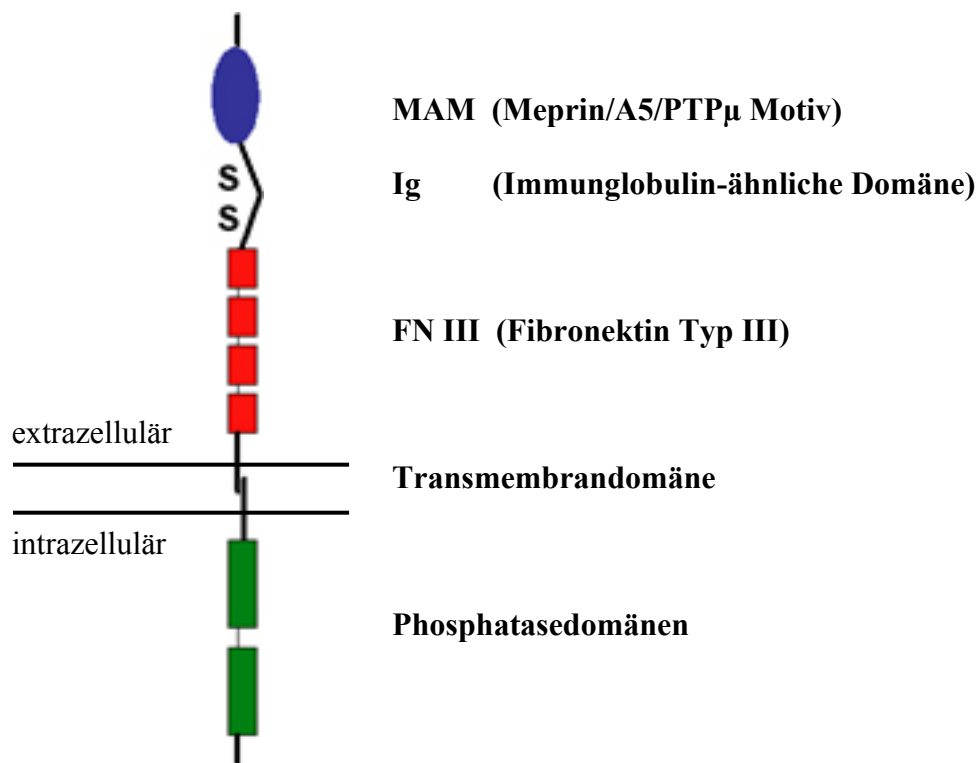


Abb. 12: Struktur der Rezeptor- ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (*cRPTP λ*). *cRPTP λ* ist durch ein N-terminales Meprin-A5-PTP μ (MAM) Motiv, ein extrazelluläres Segment mit einer Immunglobulin (Ig) – ähnlichen und vier Fibronektin (FN) Typ III Domänen, eine Transmembrandomäne und zwei intrazelluläre Phosphatasedomänen gekennzeichnet.

4.2. Untersuchungen zur Expression der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (*RPTP λ*) während der frühen Embryonalentwicklung des Gehirns beim Hühnchen

Die Expression der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (*RPTP λ*) während der frühen Embryonalentwicklung im Gehirn des Hühnchens wurde mittels „SuperScript™ One-Step RT-PCR“ (3.1.9.4.) und *in situ* Hybridisierung untersucht. Erste spezifische Transkripte von *cRPTP λ* konnten durch RT-PCR im Gewebe eines ganzen Embryos im Stadium HH 4-5 (Hamburger und Hamilton, 1992) detektiert werden. Dieses Signal verstärkte sich zunehmend in den Stadien HH 8-26 (Abb. 13A). Durch *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen im Stadium HH 5 wurde eine schwache Expression in der Kopffalte sichtbar (Abb. 13B). Im Stadium HH 9 wird *RPTP λ* sowohl stark im kaudalen Vorderhirn und im Mittelhirn als auch über weite Teile des zentralen Nervensystems in der Bodenplatte des Neuralrohres exprimiert (Abb. 13C). Im rostralen Vorderhirn und den optischen Vesikeln konnte zwischen HH 9 und HH 12 keine Expression von *RPTP λ* detektiert werden (Abb. 13C- E). Im Stadium HH 10 verstärkt sich die Expression in der Bodenplatte des Neuralrohres und in den Vesikeln des Di-

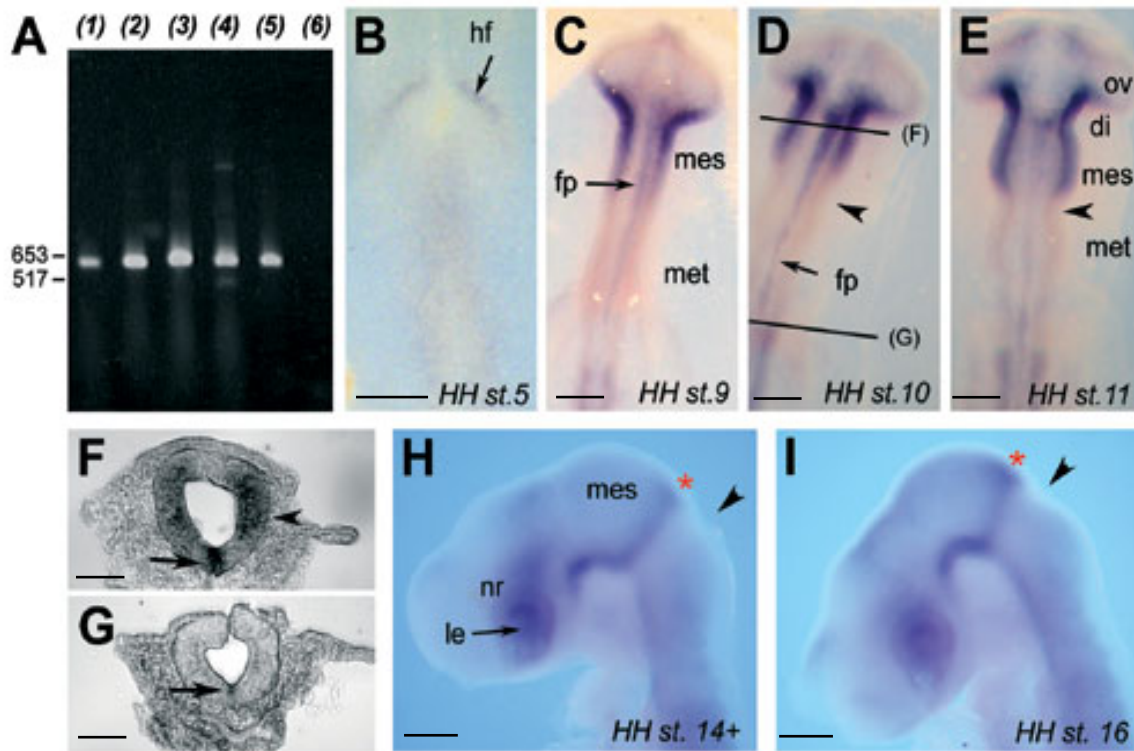


Abb. 13: Expression von *cRPTPλ* im embryonalen ZNS. (A) Nachweis eines 631 bp großen Fragmentes von *cRPTPλ* aus RNA mittels RT-PCR: (1) Stadium HH 4-5, ganzer Embryo; (2) Stadium HH 8, Kopf; (3) Stadium HH 10, Kopf; (4) Stadium HH 15-17, Kopf; (5) Stadium HH 26, Kopf; (6) keine RNA. (B) Expression in der Kopffalte im Stadium HH 5. (C) Im Stadium HH9 liegt sowohl eine starke Expression im kaudalen Vorder- und Mittelhirn, als auch in der Bodenplatte des Neuralrohres vor. (D) Expression im Stadium HH 10. Die eingezeichneten Linien weisen auf die Ebenen der Schnitte hin, welche in (F) und (G) zu sehen sind. (E) Expression im Stadium HH 11. (F) Monochromes Bild eines Querschnittes auf der Höhe des Mesenzephalons im Stadium HH 10. Expression wird sichtbar in den lateralen Wänden des (Pfeilspitze) und in der ventralen Mittellinie (Pfeil) des Neuralrohres. (G) Monochromes Bild eines Querschnittes durch das Neuralrohr auf der Höhe von Rhombomer 3. Expression von *cRPTPλ* beschränkt sich hier auf die Bodenplatte (Pfeil). (H) *cRPTPλ* ist im Stadium HH 14+ in einem Ring von Zellen innerhalb des molekularen MHOs (roter Stern), in der neuralen Retina und in der Linse (Pfeil) exprimiert. (I) Expression von *cRPTPλ* im Stadium HH 16. Der Ring von Zellen, die *RPTPλ* exprimieren (H, I), ist mit einem roten Stern gekennzeichnet.

di: Diencephalon; fp: Bodenplatte („floor plate“); hf: Kopffalte („headfold“); le: Linse („lens“); mes: Mesenzephalon; met: Metenzephalon; nr: neurale Retina; ov: optischer Vesikel. Maßstab: (B-G) 200 μ m, (H-I) 500 μ m.

und Mesenzephalons. Im Mesenzephalon reicht die Expression jedoch nicht bis zur isthmischen Einschnürung (Abb. 13D, Pfeilspitze). Die Expression wird im Stadium HH 11 im Mesenzephalon weiter verfeinert und die Expressionsdomäne von *RPTPλ* bildet nun eine scharfe Grenze, welche anterior der isthmischen Einschnürung, aber innerhalb der Mittel- / Hinterhirngrenze liegt (Abb. 13E). Ein Querschnitt durch das Neuralrohr auf der Höhe des Mesenzephalons zeigte, dass *RPTPλ* stark in der ventralen Mittellinie (Abb. 13F, Pfeil) und etwas schwächer in der lateralen Wand des Neuralrohres exprimiert wird (Abb. 13F,

Pfeilspitze). Die Expression schließt die dorsale Mittellinie aus. Mehr kaudal, auf der Höhe von Rhombomer 3, beschränkt sich die Expression auf die Bodenplatte des Neuralrohres (Abb. 13G). Kurze Zeit später, im Stadium HH 12, verkleinert sich die Expressionsdomäne von *RPTPλ* im Mittelhirn auf einen noch etwas diffusen Ring von Zellen an der Mittel- / Hinterhirngrenze (Abb. 15C). Im Stadium HH 14 ist die Expression im Dienzephalon weitgehend unterdrückt, während sich die Expression im Mesenzephalon auf einen Streifen von Zellen am MHO anterior der isthmischen Einschnürung beschränkt (Abb. 13H, roter Stern). Eine Expression wurde hier erneut im ventralen Mittelhirn und im ventralen Neuralrohr sichtbar. Zusätzlich konnten nun auch spezifische Transkripte von *cRPTPλ* in der inneren Schicht des sich einstülpenden optischen Vesikels detektiert werden, aus welcher sich später die neurale Retina und das Pigmentepithel entwickeln, sowie im Linsenvesikel. Diese Expression verfeinert sich weiter bis zum Stadium HH 16. *cRPTPλ*-Transkripte beschränken sich in diesem Stadium auf einen schmalen Ring von wenigen Zellreihen, welcher innerhalb des MHO liegt (Abb. 13I, roter Stern), während die Expression im ventralen Neuralrohr, in der Retina und in den Linsenvesikeln weitgehend unverändert bleibt. Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung wird *cRPTPλ* auch in den Somiten exprimiert (Daten nicht gezeigt, Aerne *et al.*, 2003; Aerne und Ish-Horowicz, 2004).

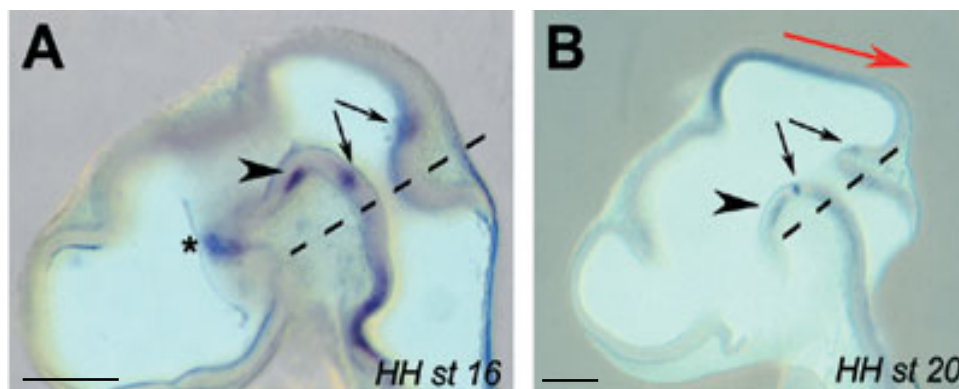


Abb. 14: Expression von *cRPTPλ* im embryonalen ZNS. (A) Sagitaler Schnitt durch den Kopf eines Embryos im Stadium HH 16. Transkripte von *cRPTPλ* wurden im ventralen Neuralrohr, in einem Ring von Zellen anterior der isthmischen Einschnürung (Pfeile), im ventralen Mesenzephalon (Pfeilspitze) und in einer kleinen Gruppe von Zellen im ventralen Dienzephalon (Stern) detektiert. (K) Im Stadium HH 20 ist die Expression am MHO noch vorhanden. Zusätzlich erscheint eine Expression im Mittelhirn in einem rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten (roter Pfeil). Die Lage der isthmischen Einschnürung ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet (A, B). Maßstab: (A-B) 500 μ m.

In situ Hybridisierungen auf Vibratomschnitten im Stadium HH 16 (embryonaler Tag E2.5) zeigten sowohl einen scharfen Ring der Expression anterior der isthmischen Einschnürung (Abb. 14A, Pfeile), als auch Expression im ventralen Mittelhirn (Abb. 14A, Pfeilspitze) und

in einer kleinen Gruppe von Zellen im ventralen Dienzephalon (Abb. 14A, Stern). Starke Expression liegt auch im ventralen Neuralrohr vor. Einen Tag später, im Stadium HH 20 (E3.5), wird *RPTPλ* weiterhin am molekularen MHO (Abb. 14B, Pfeile) und im ventralen Mesenzephalon exprimiert. Zusätzlich konnten nun auch wieder Transkripte von *RPTPλ* im sich entwickelnden optischen Tektum in einem rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten nachgewiesen werden (Abb. 14B, roter Pfeile).

Die Expression von *cRPTPλ* erweist sich somit während der Embryonalentwicklung des Gehirns beim Hühnchen als räumlich und zeitlich hoch dynamisch.

4.3. Expression von *cRPTPλ* in Relation zu anderen Markern der Mittel- / Hinterhirngrenze

Das Expressionsmuster von *cRPTPλ* am MHO bei Hühnchenembryonen im Stadium HH 15 ähnelt auffallend dem eines anderen Immunglobulin-Domäne tragenden Proteins, dem Zell-Adhäsionsmolekül *CEPU-1* (Jungbluth *et al.*, 2001). Beide Moleküle werden zu diesem Zeitpunkt im ventralen Mittelhirn und in einem scharfen Ring anterior der isthmischen Einschnürung exprimiert (Abb. 15B,D, roter Stern). In früheren Entwicklungsstadien unterscheidet sich jedoch die Expression dieser Proteine. Die Expression von *CEPU-1* erstreckt sich Stadium HH 11 weit über den molekularen MHO und die isthmische Einschnürung hinaus (Abb. 15A) und verschmälert sich erst allmählich zu einem Ring am MHO (Abb. 15B). Die Expression von *cRPTPλ* hingegen kreuzt in keiner der in dieser Arbeit untersuchten Entwicklungsstadien die Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (Abb. 13D,E, 15C,D). Des Weiteren konnten im Stadium HH 11 keine Transkripte von *CEPU-1* in der Bodenplatte des Neuralrohres detektiert werden, während *cRPTPλ* in dieser Struktur stark exprimiert wird.

Der molekulare MHO entwickelt sich an der Grenze der Expressionsdomänen der Homeodomän-tragenden Transkriptionsfaktoren *Otx2* und *Gbx2*, welche bis Stadium HH 20 anterior der isthmischen Einschnürung lokalisiert sind (Hildago-Sánchez *et al.*, 1999; z.B. zusammengefasst von Joyner *et al.*, 2000). Die Zellen nahe des MHO exprimieren die sezernierten Moleküle *Wnt1* und *Fgf8*, von denen *Fgf8* im weitesten Sinne die induktive Kapazität des isthmischen Organisators nachahmen kann (Crossley *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999).

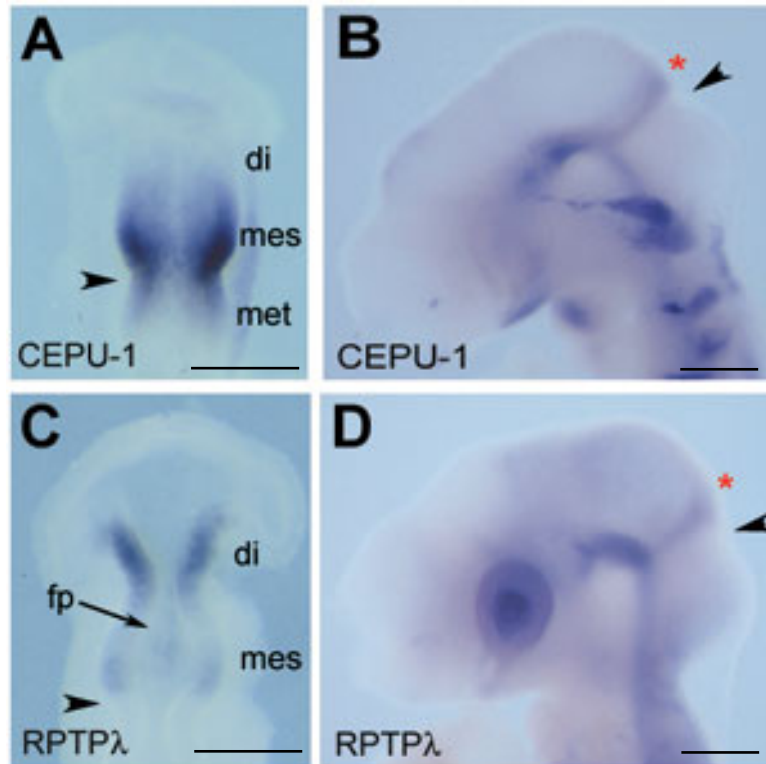


Abb. 15: Expression von *cRPTPλ* im Vergleich zu *CEPU-1*. Expression des Ig-Zelladhäsionsmolekül *CEPU-1* (A) im Stadium HH 11+ und (B) HH 15. Expression von *cRPTPλ* (C) im Stadium HH 12 und (D) HH 15. Beide Moleküle werden im Stadium HH 15 im ventralen Mittelhirn und in einem scharfen Ring anterior der isthmischen Einschnürung exprimiert (roter Stern). Die isthmische Einschnürung ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. di: Diencephalon; fp: Bodenplatte („floor plate“); mes: Mesencephalon; met: Metencephalon. Maßstab: (A-D) 500 μ m.

Um die Expression von *cRPTPλ* am MHO näher zu analysieren, wurde in dieser Arbeit dessen Expressionsdomäne mit der von anderen Markern des MHO im Stadium HH 15 verglichen (Abb. 16A-D). Der Ring der *cRPTPλ* exprimierenden Zellen liegt mehrere Zellreihen anterior der isthmischen Einschnürung, sowie anterior und nicht überlappend mit der *Fgf8* Expressionsdomäne (Abb. 16B). Der Ring der *Wnt1* exprimierenden Zellen liegt ebenfalls anterior der isthmischen Einschnürung, aber scheint mehr kaudal lokalisiert zu sein als der von *cRPTPλ* (Abb. 16C). Die Expressionsdomänen von *cRPTPλ* und *Wnt1* überlappen möglicherweise teilweise, aber nicht komplett. Der Ring der Expression von *cRPTPλ* liegt zudem vollständig im kaudalen Ende der *Otx2* Expressionsdomäne (Abb. 16D). Diese Ergebnisse wurden mittels zweifarbiger *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen (Abb. 16E-G) und *in situ* Hybridisierungen an Vibratonschnitten (Abb. 16I-L) bestätigt und wurden in einer schematischen Darstellung zusammengefasst (Abb. 16H).

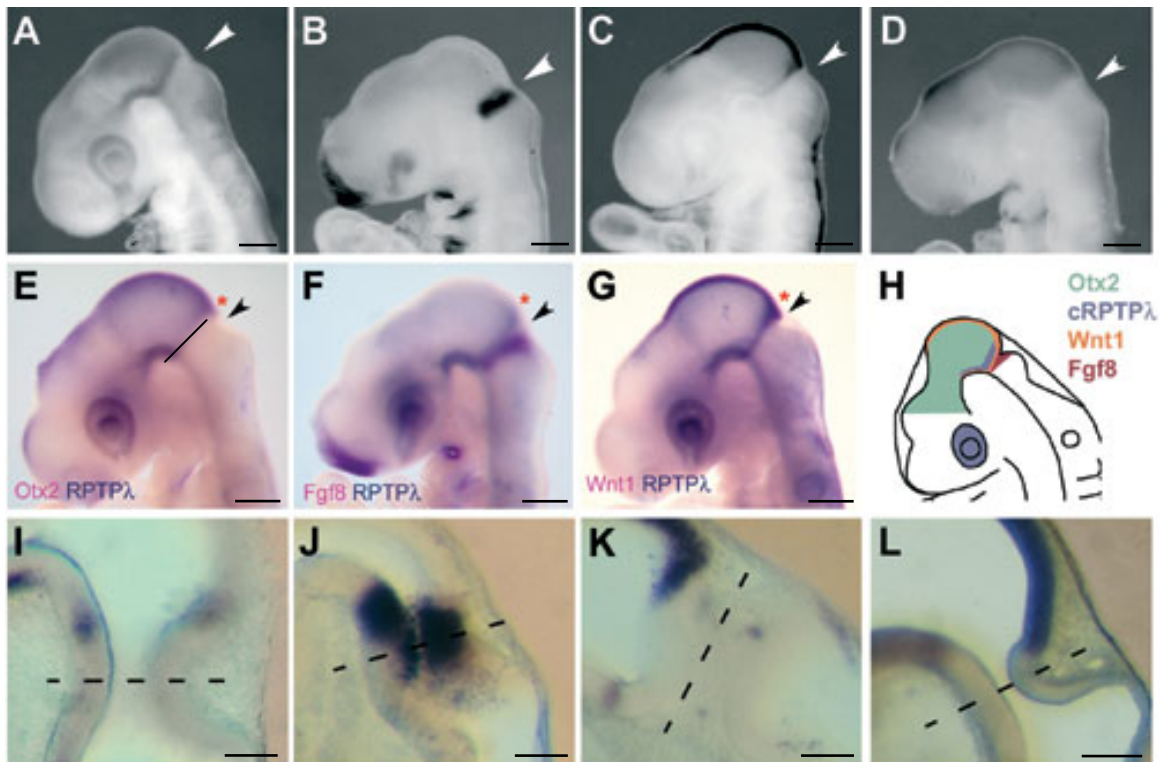


Abb. 16: Vergleich der Expressionsdomäne von *cRPTPλ* im Stadium HH 15 mit anderen Markern des MHO. (A) *cRPTPλ*, (B) *cFgf8*, (C) *cWnt1*, (D) *cOtx2*. (E-G) Zweifarbige *in situ* Hybridisierung mit folgenden Proben: (E) *cRPTPλ* in blau und *cOtx2* in pink; (F) *cRPTPλ* in blau und *cFgf8* in pink; (G) *cRPTPλ* in blau und *cWnt1* in pink. (A-G) Die Pfeilspitzen kennzeichnen die isthmische Einschnürung und (E-G) die roten Sterne den Ring von Zellen am MHO, der *cRPTPλ* exprimiert. (L) Schematische Zusammenfassung der Expressionsmuster: *cOtx2* (grün), *cRPTPλ* (blau), *cWnt1* (orange), *cFgf8* (rot). (I-L) Expressionsanalyse auf 100 μ m dicken Vibratomschnitten: (I) *cRPTPλ*, Stadium HH 16; (J) *cFgf8*, Stadium HH 16; (K) *cWnt1*, Stadium HH 16; (L) *cOtx2*, Stadium HH 18. (I-L) Die isthmische Einschnürung ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Maßstab: (A-G) 500 μ m, (I-L) 100 μ m.

4.4. Expression von *cRPTPλ* in der sich entwickelnden neuralen Retina

Anhand von sagitalen Vibratomschnitten wurde auch die Expression von *cRPTPλ* im Auge näher untersucht. Im Stadium HH 14 wird *cRPTPλ* dort stark in den zukünftigen Epithelzellen, einer äquatorialen Region der Linse und in der inneren Schicht des Augenbechers exprimiert, aus der sich die neurale Retina entwickeln wird (Abb. 17A). Im Stadium HH 22 wird *cRPTPλ* ebenfalls in der Linse und im retinalen Neuroepithelium exprimiert (Abb. 17B).

In situ Hybridisierungen zeigten eine starke, weitgehend flächendeckende Expression von *cRPTPλ* in der gesamten Retina, welche nur in einer kreisförmigen zentralen Domäne fehlte, die sich nasal der Austrittsstelle des optischen Nervs befindet (Abb. 17C,D, Pfeilspitze), sowie in einem diffusen Band von Zellen entlang des horizontalen Meridians. Dieses Muster erinnert an die Form und Lage der späteren Stäbchen-freien *aerea centralis* und dem

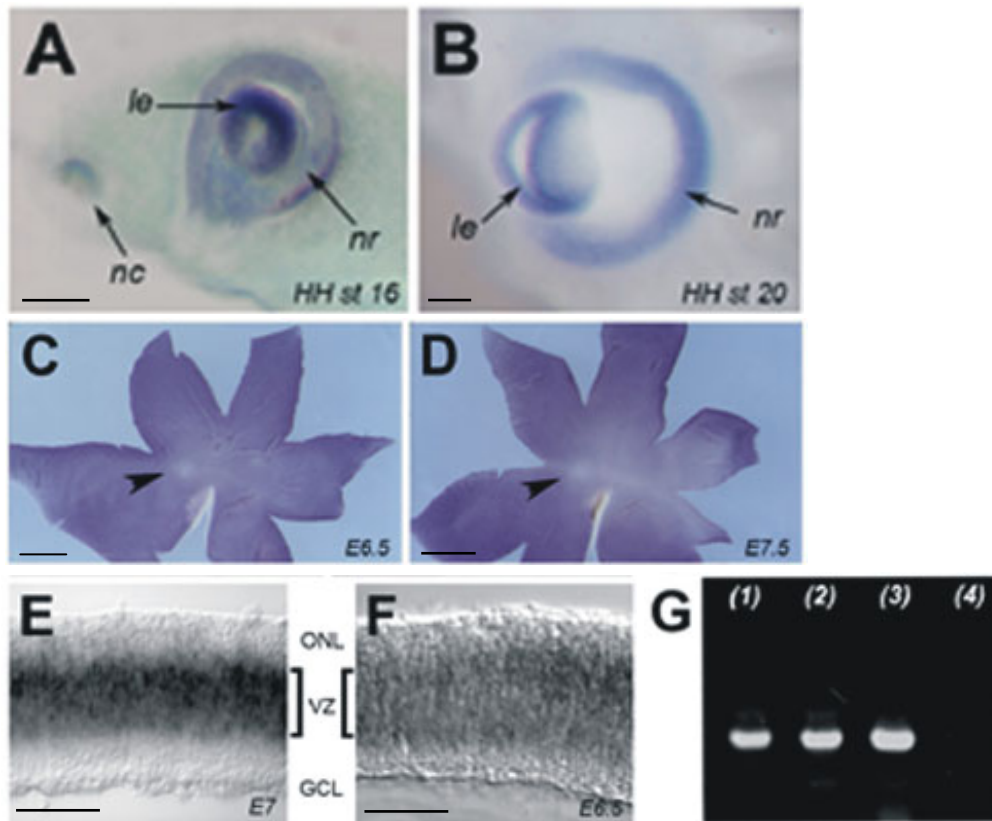


Abb. 17: Expression von *cRPTPλ* im Auge. (A) Auf sagitalen Vibratomschnitten im Stadium HH 16 wird deutlich, dass *cRPTPλ* stark in der Linse und der inneren Schicht des Augenbechers exprimiert wird. Expression wurde zudem in der Nasenanlage detektiert. (B) Im Stadium HH 22 wird *cRPTPλ* in der Linse und im retinalen Neuroepithelium exprimiert, wie auf koronalen Vibratomschnitten sichtbar wird. (C, D) Die Expression von *cRPTPλ* in der Retina E6.5 schließt einen zentralen Punkt und einen horizontal verlaufenden Streifen aus und schwächt sich bis E7.5 in einem zentral zu peripher verlaufenden Gradienten ab. (E) Querschnitt durch eine neurale Retina am embryonalen Tag E7; *cRPTPλ* wird stark in Vorläuferzellen der ventrikulären Zone, aber nicht in der äußeren nuklearen Schicht (ONL) oder Ganglienzellschicht (GCL) exprimiert, wo postmitotische Zellen lokalisiert sind. (F) Ein Querschnitt durch eine neurale Retina am embryonalen Tag E6.5 zeigt die Expression von *Chx10* in der ventrikulären Zone. (G) Nachweis der Expression von *hPCP-2* durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus fötaler Retina; (1) Fötale Woche (FWK) 12.5, (2) FWK 16.5, (3) FWK 18.5, (4) adult. le: Linse („lens“), nc: Nasenanlage („nasal cup“), nr: neurale Retina. Maßstab: (A-B) 200 μ m, (C-D) 500 μ m, (E-F) 100 μ m.

horizontal verlaufenden Streifen, der dem Bereich geringer Stäbchendichte in der ausgereiften Retina entspricht (Bruhn und Cepko, 1996). E7.5 geht die Expression von *cRPTPλ* weiter zurück und scheint dabei einem zentralen zu peripheren Gradienten zu folgen, welcher den Gradienten der Zelldifferenzierung in der Retina widerspiegelt (Abb. 17D).

In Gefrierschnitten durch die neurale Retina am embryonalen Tag 7, konnten *cRPTPλ* spezifische Transkripte in einer weiten Domäne von Zellen im Zentrum des retinalen Neuroepitheliums, nicht aber in der Ganglienzellschicht oder der äußeren nuklearen Schicht nachgewiesen werden (Abb. 17E). Die Domäne im Neuroepithelium entspricht der ventrikulären Zone, wo sich die Zellkörper der retinalen Vorläuferzellen befinden. Dies wurde

mittels *in situ* Hybridisierung mit einer Probe gegen den Transkriptionsfaktor Chx10, einem Marker für retinale Vorläuferzellen, bestätigt (Abb. 17F, Chen und Cepko, 2000).

Das menschliche Homolog von *cRPTPλ*, welches *PCP-2* genannt wird (Wang *et al.*, 1996), wird auch in der embryonalen menschlichen Retina exprimiert. Eine starke Expression konnte hier mittels „One-Step RT-PCR“ (3.1.9.5.) in fötaler menschlicher Retina in den fötalen Wochen FWK 12.5-18.5, aber nicht im Gewebe adulter menschlicher Retina nachgewiesen werden (Abb. 17G).

Das Gewebe von adulter menschlicher Retina wurde uns freundlicher Weise von Professor Anita Hendrickson (Washington University, Seattle / USA) zur Verfügung gestellt.

4.5. Untersuchungen zur Regulation der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (*cRPTPλ*) am Mittel- / Hinterhirnorganisator

cRPTPλ wird am embryonalen Tag E2.5 und E3.5 unter anderem in einem scharf abgegrenzten Ring von Zellen anterior der isthmischen Einschnürung exprimiert (siehe Abschnitt 4.2.). Während das Expressionsmuster des Zell-Adhäsionsmoleküles *CEPU-1* dem von *cRPTPλ* hier auffallend ähnelt, werden die sezernierten Moleküle *Fgf8* und *Wnt1* posterior der Expressionsdomäne von *cRPTPλ* am MHO exprimiert. In dieser Arbeit wurde nun untersucht, welche Faktoren an der Regulation von *cRPTPλ* am MHO beteiligt sind.

4.5.1. Fehlexpression von *CEPU-1* induziert keine ektopische Expression von *cRPTPλ*

CEPU-1 ist ein Zell-Adhäsionsmolekül (CAM) der so genannten IgLON Familie, welche zur Immunoglobulin Superfamilie der CAMs gehören (Jungbluth *et al.*, 2001). Es besitzt drei Ig-ähnliche Domänen und ist durch ein posttranslational angehängtes Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) an die Plasmamembran gebunden (Spaltmann und Brümmendorf, 1996). CAMs vermitteln den Zell-Zell-Kontakt und die Verbindung von Zelle und extrazellulärer Matrix und spielen verschiedene Rollen während der Embryonalentwicklung. Aufgrund des auffallend ähnlichen Expressionsmusters im Stadium HH 15 von *CEPU-1* und *cRPTPλ* am MHO, wurde untersucht, ob *CEPU-1* an der Regulation von *cRPTPλ* beteiligt ist. Dazu wurde *CEPU-1* mit Hilfe der Mikroelektroporation im Stadium HH 10 in der Region

des MHO fehlexprimiert. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt verwendet, das die kodierende Sequenz für das grünfluoreszierende Protein (*GFP*) trägt. Mit Hilfe dieser Kontrolle wurde sichergestellt, dass ein vermeintlicher Effekt nicht auf die Manipulation am Embryo während der Elektroporation zurückzuführen ist. Die Expression von *cRPTPλ* wurde mittels *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen mit einer spezifischen Sonde für *cRPTPλ*-Transkripte nachgewiesen.

Nach Fehlexpression von *CEPU-1* zeigte sich am MHO keine Veränderung des Expressionsmusters von *cRPTPλ* (Abb. 18A) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 18B; n = 27). Dies deutet darauf hin, dass *CEPU-1* nicht an der Regulation der Expression von *cRPTPλ* beteiligt ist.

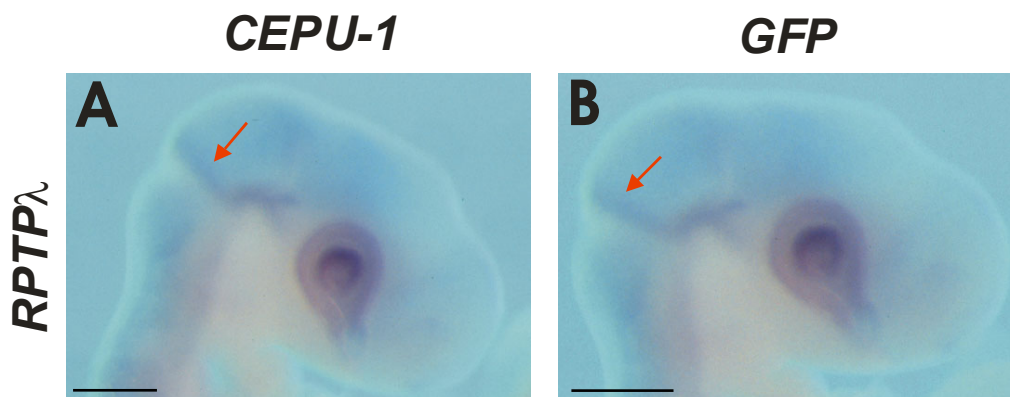


Abb. 18: Fehlexpression von *CEPU-1* induziert keine ektopische Expression von *cRPTPλ*. Expressionsmuster von *cRPTPλ* nach ektopischer Expression von (A) *CEPU-1* oder (B) *GFP*. Maßstab: (A-B) 500 μ m.

4.5.2. Fehlexpression von *Wnt1* induziert keine ektopische Expression von *cRPTPλ* oder *CEPU-1*

Das sezernierte Glycoprotein *Wnt1* steuert die Proliferation von Vorläuferzellen und ist damit für die normale Entwicklung der Mittel- / Hinterhirnregion von entscheidender Bedeutung (McMahon und Bradley, 1990). Bislang konnte jedoch nur für wenige Marker des MHO gezeigt werden, dass sie unter der Kontrolle von *Wnt1* exprimiert werden (Panhuysen *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob die Expression von *cRPTPλ* oder *CEPU-1* unter der Kontrolle von *Wnt1* steht, wurde *mWnt1-pMIW III* mittels Mikroelektroporation in der Region der Mittel- / Hinterhirngrenze fehlexprimiert. Durch *in situ* Hybridisierung wurden anschließend die Transkripte von *cRPTPλ* und *CEPU-1* nachgewiesen. Als Kontrolle diente auch in diesem

Fall eine Elektroporation von *GFP-pMIW III* mit denselben Elektroporationsbedingungen (Abb. 19C, D).

Wie in Abbildung 19 gezeigt wird, änderte eine ektope Expression von *mWnt1* in der Mittel- / Hinterhirnregion im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 19B, D) weder die Expression von *cRPTPλ* (Abb. 19A; n = 17), noch die von *CEPU-1* (Abb. 19C; n = 20). Demnach wird die Expression *cRPTPλ* oder *CEPU-1* nicht durch den Signalweg von Wnt1 reguliert.

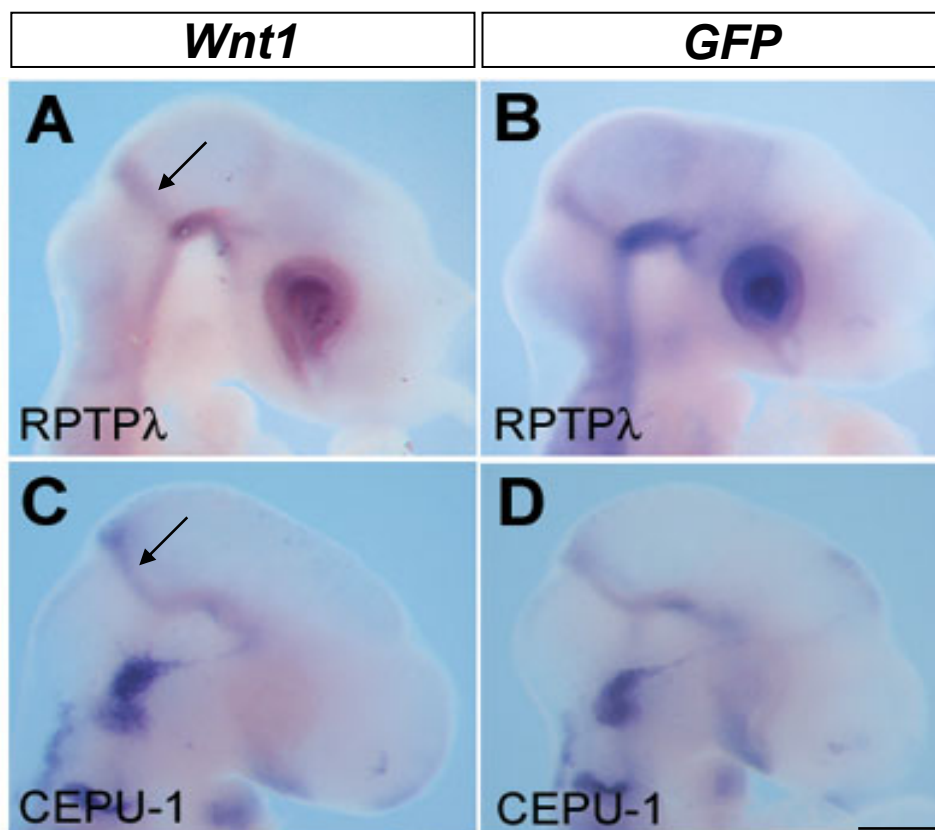


Abb. 19: Fehlexpression von *Wnt1* induziert keine ektope Expression von *cRPTPλ* oder *CEPU-1*. Expressionsmuster von *cRPTPλ* nach ektope Expression von (A) *Wnt1* oder (B) *GFP*. Expression von *CEPU-1* nach ektope Expression von (C) *Wnt1* oder (D) *GFP*. Maßstab: (A-D) 500 μ m.

Matsunaga *et al.* (2002) hatten gezeigt, dass Fehlexpression von *Wnt1* eine ektope Expression von *Fgf8* im Hinterhirn, nicht aber im Mittelhirn induziert. Um sicherzustellen, dass die Elektroporation eines Expressionskonstruktes, welches die kodierende Sequenz des Wnt1 Proteins trägt, zur Studie der Regulation von Protein-Expressionen geeignet ist, wurde dieses Experiment als Kontrollversuch wiederholt. Hierbei wurde *mWnt1* mittels Mikroelektroporation in der Region der Mittel- / Hinterhirngrenze fehlexprimiert, was zu

einer ektoptischen Expression von *Fgf8* im Hinterhirn führte (Abb. 20A; n = 8). Als Kontrolle diente erneut eine Elektroporation des *GFP*- Expressionsplasmides (Abb. 20B).

Dieses Experiment bestätigt die Aktivität des von mir eingesetzten *Wnt1-pMIW III* Expressionskonstruktes und zeigte, dass die Mikroelektroporation eine geeignete Methode ist, um die Regulation von $cRPTP\lambda$ und anderen Markern des MHO zu untersuchen.

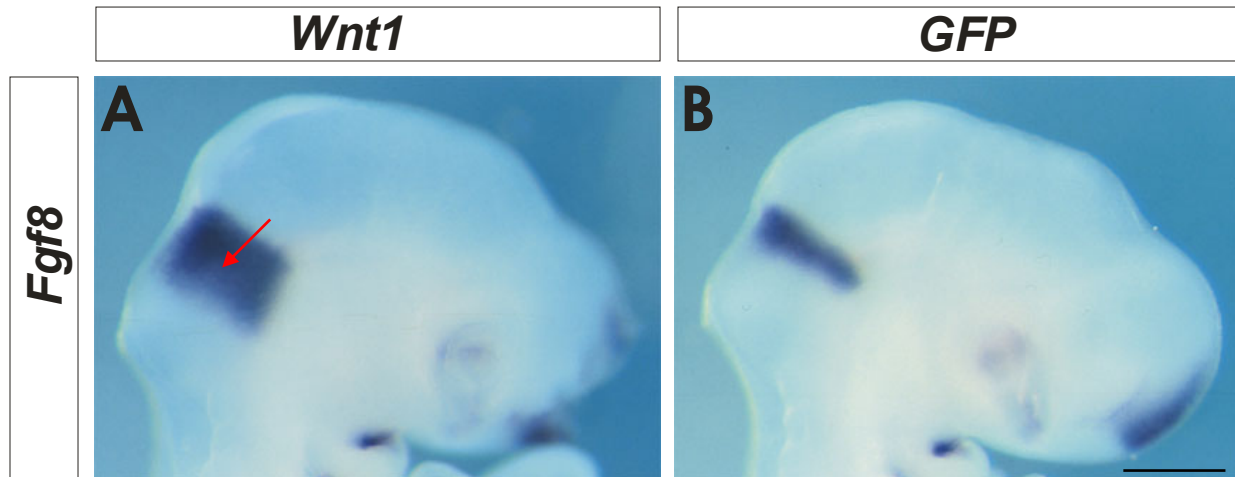


Abb. 20: Fehlexpression von *Wnt1* induziert eine ektoptische Expression von *Fgf8* im Hinterhirn. Expressionsmuster von *Fgf8* nach ektoptischer Expression von (A) *Wnt1* oder (B) *GFP*. Maßstab: (A-B) 500 μ m.

4.5.3. Die Expression von *Wnt1*, $cRPTP\lambda$ und *CEPU-1* wird von *Fgf8* induziert

Fgf8 hat eine besondere Bedeutung bei der Musterbildung am MHO (Crossley & Martin, 1995; Abschnitt 2.4.). Fehlexpression von *Fgf8* im Dienzephalon, Mesenzephalon oder Rhombenzephalon führte zur ektoptischen Expression vieler Mittel- / Hinterhirnmarker, wie z.B. *Wnt1* (Crossley *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 1999). Am MHO werden zwei verschiedene „Splice“-Isoformen von *Fgf8* exprimiert, wobei *Fgf8b* für die Organisation des MHO wichtiger zu sein scheint, als *Fgf8a* (Sato *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob auch $cRPTP\lambda$ von *Fgf8* in der Mittel- / Hinterhirnregion reguliert wird, wurde in dieser Arbeit *Fgf8b* durch *in ovo* Elektroporation eines Expressionsplasmides, welches die kodierende Sequenz für *cFgf8b* trug, ektoptisch exprimiert. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, führte die Elektroporation des *cFgf8b*-Expressionsplasmides im Mittelhirn zu einer Induktion von *Wnt1* (Abb. 21B) und $cRPTP\lambda$ (Abb. 21D). Eine Doppel-*in situ* Hybridisierung mit Sonden gegen $cRPTP\lambda$ (in blau) und *Wnt1* (in pink) zeigte, dass $cRPTP\lambda$ in einem Ring von Zellen außerhalb der ektoptischen *Wnt1* Domäne induziert wurde (Abb. 21F).

Des Weiteren wurde nach Fehlexpression von *Fgf8b* mittels Elektroporation im Mittelhirn eine Induktion von *CEPU-1* beobachtet (Abb. 21G; n = 5). Elektroporation eines Kontrollplasmides, welches die kodierende Sequenz für *GFP* trägt, veränderte jedoch nicht die Expression von *Wnt1*, *cRPTPλ* oder *CEPU-1* (Abb. 21A, D, G). Dies zeigt, dass die beobachteten Änderungen der Expressionsmuster nach *Fgf8*-Elektroporation nicht auf das Elektroporationsprotokoll zurückzuführen sind.

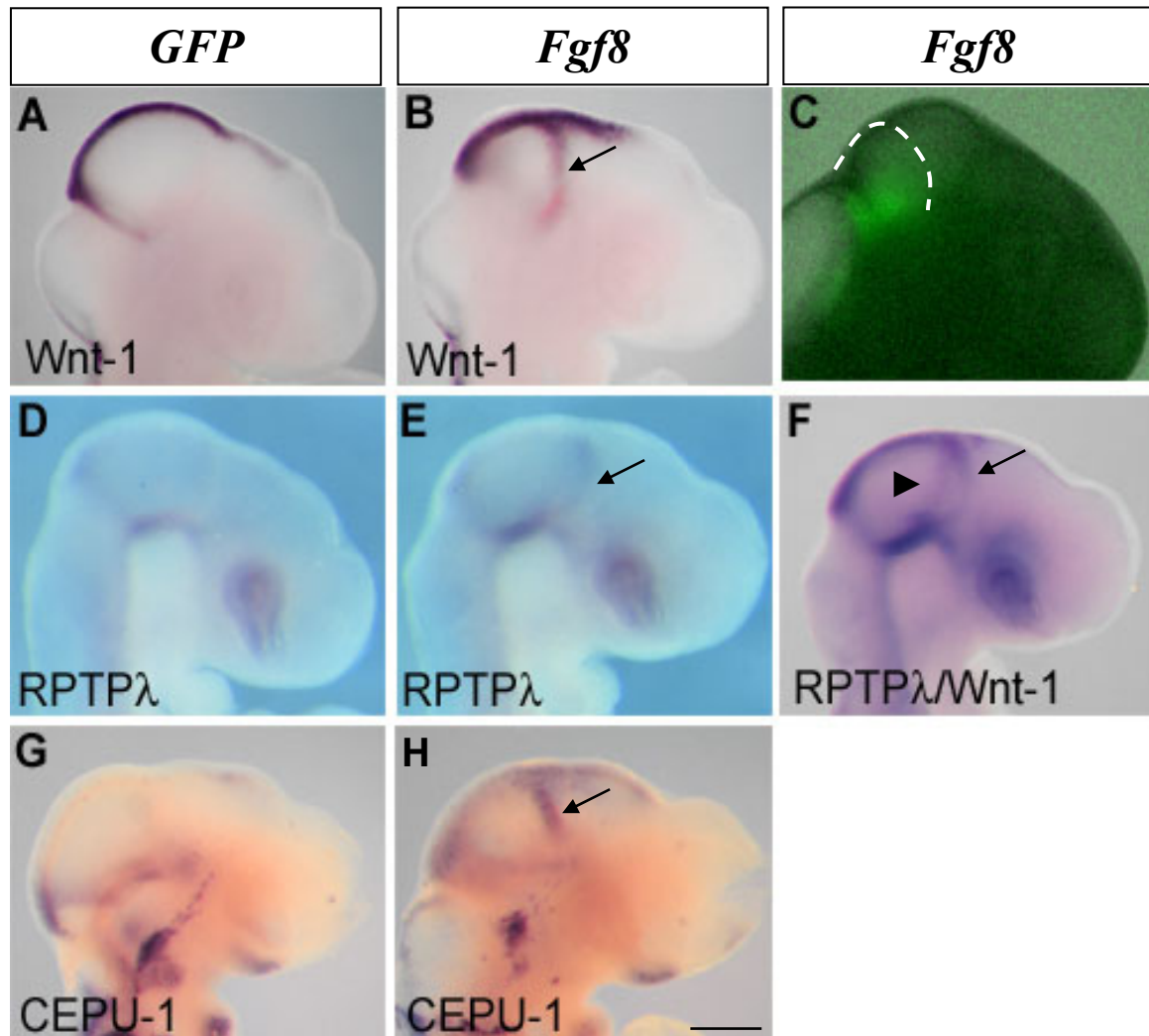


Abb. 21: Induktion von *Wnt1*, *cRPTPλ* und *CEPU-1* nach ectopischer *Fgf8b*-Expression. *In ovo* Koelektroporation eines Expressionsplasmides für *cFgf8b* und *GFP* (B, C, E, F, H) oder *GFP* allein (A, D, G). *Wnt1* wird nach *Fgf8b* Fehlexpression (B), aber nicht *GFP*-Expression (A) induziert. Ektopische Expression von *Fgf8b* (E), aber nicht Fehlexpression von *GFP* (D) induziert *cRPTPλ*. (F) Vergleich der Induktion von *Wnt1* (pink, Pfeilspitze) und *cRPTPλ* (blau, Pfeil). Expression von *CEPU-1* wird nach Fehlexpression von *Fgf8b* (H), aber nicht nach Fehlexpression von *GFP* (G) induziert. Eine Fluoreszenzaufnahme von *GFP* (C) zeigt die Effizienz der Elektroporation. Ektopische Expression von *Wnt1*, *cRPTPλ* oder *CEPU-1* ist in (B), (E) und (H) durch Pfeile gekennzeichnet.

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Implantation von *Fgf8*-getränkten Acryl-Kügelchen, die Aktivität des MHO nachahmt und je nach Lage des implantierten Kügelchens, Gewebe mit Mittelhirncharakter induziert (Abschnitt 2.4). Um das Ergebnis der Elektroporation zu

bestätigen, wurden daher Acryl-Kügelchen, welche zuvor in 0,15 mg/ml rekombinantem Fgf8b Protein aus der Maus getränkt wurden, in die laterale Wand des Mittelhirns implantiert. Wie von Martínez *et al.* (1999) gezeigt, induziert Fgf8b-Protein, welches von dem Acryl-Kügelchen in die Umgebung des Mittelhirns abgegeben wird, zunächst *Fgf8* selbst, welches wiederum *Wnt1* in den Nachbarzellen induziert (Abb. 22A, B, C). Eine Expression von *cRPTPλ* wurde ebenfalls deutlich in den Zellen rund um das Fgf8-getränkte Acryl-Kügelchen im Mittelhirn induziert (Abb. 22D). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Fgf8b-getränkte Kügelchen, die in die Region des MHO implantiert wurden, eine anteriore Verschiebung der Expressionsdomäne von *cRPTPλ* zur Folge hatten (Abb. 22E; n = 15).

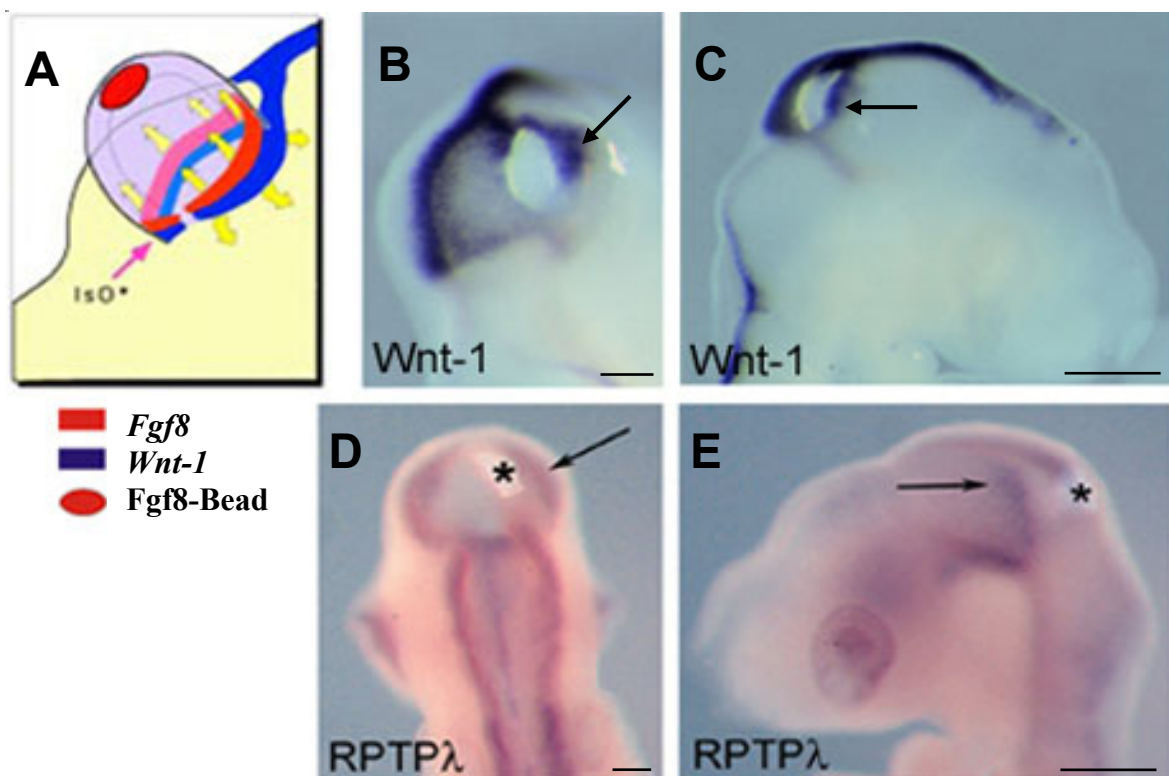


Abb. 22: Induktion von *Wnt1* und *cRPTPλ* nach ektoptischer *Fgf8b*-Expression. Implantation eines in Fgf8b-getränkten Acryl-Kügelchens. (A) Schematische Darstellung der Induktion von *Fgf8* und *Wnt1* nach Implantation in die laterale Wand des kaudalen Mittelhirns (nach Martínez *et al.*, 2001). Expression von *Wnt1* (B, C) und von *cRPTPλ* (D, E) wurde um das Acryl-Kügelchen herum nachgewiesen. Die ektoptischen Expressionen von *Wnt1* und *cRPTPλ* sind durch Pfeile gekennzeichnet. Maßstab: (B, D) 100 μ m, (C, E) 500 μ m.

In diesen Experimenten zeigte sich, dass *Wnt1* in unmittelbarer Nähe des Fgf8-getränkten Acryl-Kügelchens induziert wird, während *cRPTPλ* in einem Ring von Zellen außerhalb der ektoptischen *Wnt1* Domäne exprimiert wird.

4.5.4. Die Expression von *cRPTPλ* wird von *Lmx1b* induziert

Der Transkriptionsfaktor *Lmx1b* (LIM homeobox Protein 1) wird im ZNS stark entlang der dorso-ventralen Mittellinie und in einem schmalen Ring von Zellen am MHO exprimiert, der vermutlich mit der Expressionsdomäne von *Wnt1* überlappt.

Die Expression von *Lmx1b* wird von *Fgf8* am MHO induziert, wie eine Fehlexpression von *Fgf8* mit anschließender *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für *Lmx1b*-Transkripte (Abb. 23A; n = 5) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 23B) zeigte. *Wnt1* ist nicht in der Lage *Lmx1b* zu induzieren (Adams *et al.*, 2000). Umgekehrt führte ektoptische Expression von *Lmx1b* im Mittelhirn jedoch dazu, dass die Expression von *Wnt1* dort – auch nach Rückgang der *Fgf8*-Expression, die ab Stadium HH 9 zu beobachten ist - aufrechterhalten wird (Adams *et al.*, 2000). *Lmx1b* scheint demnach an der Regulation von *Wnt1* durch *Fgf8* beteiligt zu sein.

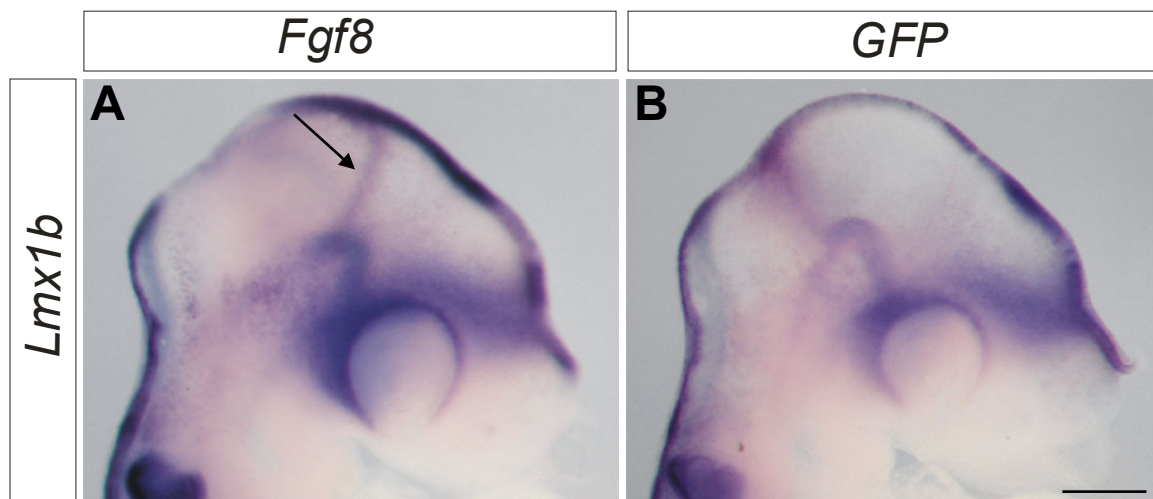


Abb. 23: Expression von *Lmx1b* wird im Mittelhirn von *Fgf8* induziert. *In ovo* Elektroporation eines Expressionsplasmides für *cFgf8b* (A) oder *GFP* (B). *Lmx1b* wird nach *Fgf8b* Fehlexpression (A), aber nicht nach Fehlexpression von *GFP* (B) induziert. Ektopische Expression von *Lmx1b* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (A). Maßstab: (A-B) 500 μ m.

Des Weiteren konnte von Matsunaga *et al.* (2002) gezeigt werden, dass ektoptisch exprimiertes *Lmx1b*, genau wie ektoptisches *Wnt1*, zu einer Vergrößerung des Tektums und Cerebellums führt. *Fgf8* wurde dabei in den Zellen, die *Lmx1b* fehlexprimierten, unterdrückt, jedoch in den Nachbarzellen induziert. Dies weist darauf hin, dass *Lmx1b* an einer nicht Zell-autonomen Induktion der *Fgf8*-Expression durch *Wnt1* beteiligt sein könnte.

Um zu untersuchen, ob *cRPTPλ* in diesem Rückkoppelungs-Kreislauf eine Rolle spielt und von *Lmx1b* induziert werden kann, wurde *cLmx1b* am MHO mittels Elektroporation überexprimiert. Anschließend wurden die Transkripte von *cRPTPλ* erneut mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Wie Abbildung 24 zeigt, induziert *Lmx1b* im Vergleich zur GFP-Kontrolle (Abb. 24B) eine Expression von *cRPTPλ* im ventralen Mesenzephalon in unmittelbarer Nähe zum MHO, nicht aber im Metenzephalon (Abb. 24A; n = 5). Diese Induktion scheint Zell-autonom zu sein.

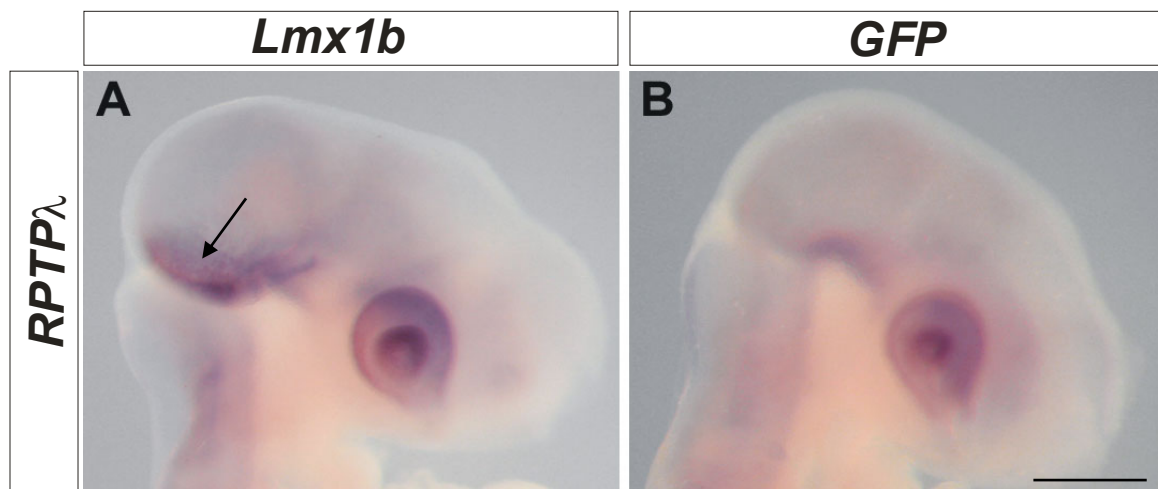


Abb. 24: *Lmx1b* induziert die Expression von *cRPTPλ* am MHO und im ventralen Mesenzephalon. *In ovo* Elektroporation eines Expressionsplasmides für *cLmx1b* (A) oder *GFP* (B). *cRPTPλ* wird nach *Lmx1b* Fehlexpression (A), aber nicht nach Fehlexpression von *GFP* (B) induziert. Ektopische Expression von *cRPTPλ* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (A). Maßstab: (A-B) 500 μm .

4.5.4. Die Expression von *cRPTPλ* wird durch *Engrailed-1* unterdrückt

Engrailed-1/2 (*En-1/2*), die beiden Wirbeltier-Homologe zu *engrailed* (*en*) aus *Drosophila melanogaster*, werden anfangs entlang der antero-posterioren Achse des frühen Mesenzephalons und später in einem zunehmend rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten exprimiert (Gardner & Barald, 1992). *En* / *en* Gene kodieren für Homeodomän-Transkriptionsfaktoren und können *in vitro* aktiv Transkription unterdrücken (Han & Manley, 1993; Hanks *et al.*, 1998). Wie in *Drosophila melanogaster* gezeigt, kann das *en*-Protein sowohl als Repressor fungieren, als auch zusammen mit dem Kofaktor Extradenticle (Exd), als transkriptionaler Aktivator wirken (Schwartz *et al.*, 1995; Serrano & Maschat, 1998; Siegler & Jia, 1999).

Die Deletion des *En-1*-Gens führte in Mäusen zu schweren Missbildungen im Mesenzephalon (Wurst *et al.*, 1994). Daher kommt *Engrailed* eine entscheidende Bedeutung bei der frühen

Entwicklung des Mesenzephalons zu. Darüber hinaus haben Araki und Nakamura (1999) an Hühnchen-Embryonen gezeigt, dass *En* die Position der dorsalen Grenze zwischen Di- und Mesenzephalon definiert, indem es zum einen direkt die Bildung des Dienzephalons unterdrückt und zum anderen die Expression von spezifischen Markern des Mesenzephalons positiv reguliert.

Um Einblicke in eine mögliche Funktion von *En-1* bei der Regulation von *cRPTPλ* zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit mittels *in ovo* Elektroporation *mEn-1* ektopisch am MHO und im Mittelhirn exprimiert. Im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 25B) und zur linken, nicht elektroporierten Seite, die als interne Kontrolle diente (Daten nicht gezeigt), wurde eine deutliche Abnahme der Expression von *cRPTPλ* am MHO nach Überexpression von *mEn-1* beobachtet (Abb. 25A).

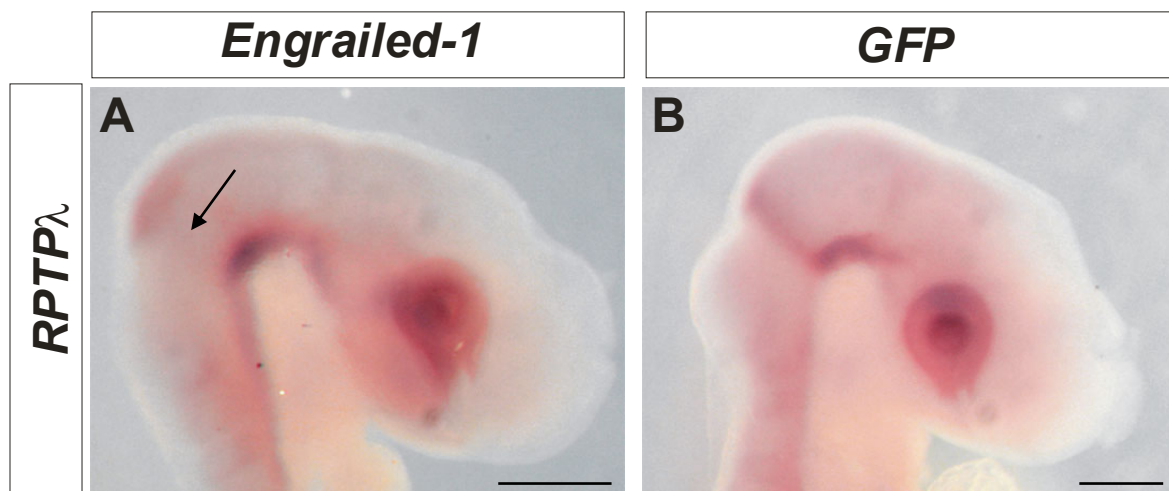


Abb. 25: Überexpression von *Engrailed-1* (*En-1*) am MHO hemmt die Expression von *cRPTPλ*. *In ovo* Elektroporation eines Expressionsplasmides für *mEn-1* (A) oder *GFP* (B). *cRPTPλ* wird nach *En-1* Fehlexpression (A), aber nicht nach Fehlexpression von *GFP* (B) unterdrückt. Fehlende Expression von *cRPTPλ* am MHO ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (A). Maßstab: (A-B) 500 μ m.

4.5.5. Zusammenfassung der Regulation von *cRPTPλ* am MHO

Zusammenfassend zeigen die oben erläuterten Versuche, dass *cRPTPλ* in der MHR von dem sezernierten Fibroblastenwachstumsfaktor *Fgf8* induziert wird (Abb. 21, 22). Diese Induktion kann zum einen direkt erfolgen, oder aber indirekt durch *Lmx1b* (Abb. 24A) vermittelt werden. Eine Fehlexpression des sezernierten Glykoproteins *Wnt1* ist nicht in der Lage *cRPTPλ* zu induzieren (Abb. 19), während Überexpression von *En-1* die Expression von

cRPTPλ am MHO unterdrückt (Abb. 25). In Abbildung 26 ist eine schematische Zusammenfassung dieser Ergebnisse dargestellt.

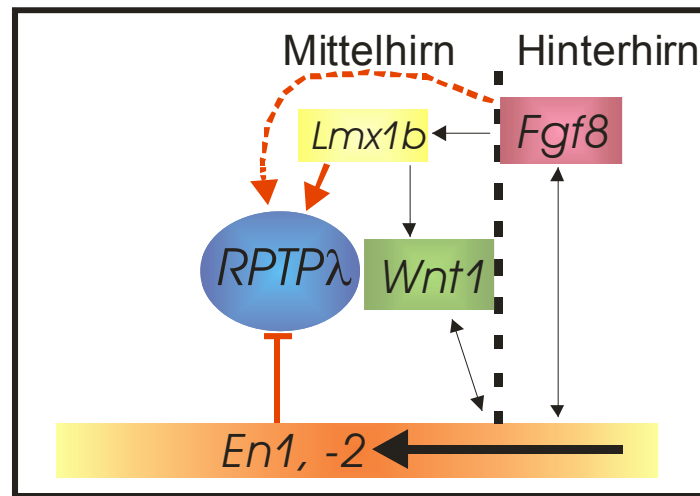


Abb. 26: Zusammenfassung der Regulation von *cRPTPλ* am MHO. *Fgf8* induziert *cRPTPλ* direkt oder indirekt durch *Lmx1b*. Unterdrückt wird die Expression von *cRPTPλ* durch *En-1*. *Wnt1* ist nicht an der Regulation von *cRPTPλ* beteiligt.

4.6. Funktion der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ am MHO

Die dynamische Regulation der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Tyrosinresten *in vivo* ist ein wesentlicher Bestandteil intrazellulärer Signalwege und spielt bei vielen verschiedenen Entwicklungsprozessen wie z.B. Zellproliferation, Differenzierung, Zelladhäsion und Zellmigration eine wesentliche Rolle. Protein-Tyrosin-Phosphorylierung wird dabei durch die antagonistische Wirkung von Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Phosphatasen kontrolliert. Während über die Funktionen von Protein-Tyrosin-Kinasen schon sehr viel bekannt ist, sind die Funktionen von Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen erst in wenigen biologischen Zusammenhängen im Detail untersucht.

4.6.1. Überexpression von *cRPTPλ* führt nicht zu einer Modulation des Expressionsmusters von *Fgf8*

Da die Wirkung von *Fgf8* durch Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (*Fgf8*-Rezeptoren) vermittelt wird, wurde hinsichtlich der Funktion von *cRPTPλ* am MHO deshalb in dieser Arbeit untersucht, ob eine mögliche Funktion von *cRPTPλ* in der Modulation des *Fgf8*-Signals am MHO besteht. Um dies zu testen, wurde *RPTPλ* am MHO durch *in ovo*

Elektroporation überexprimiert und untersucht, ob dies zu einer Änderung des Expressionsmusters von *Fgf8*, oder von Faktoren, die ihrerseits durch *Fgf8* reguliert werden, führt. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, führt eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO nicht zu einem veränderten Expressionsmuster von *Fgf8* (Abb. 27A, B; n = 12/15). Eine Elektroporation des Expressionsplasmides für *GFP* unter den gleichen Elektroporationsbedingungen zeigte ebenfalls keinen Effekt (Abb. 27C, D). Da im Zuge des Elektroporationsprotokolls nur die rechte Seite des Embryos elektroporiert wurde, diente in diesem und allen weiteren Versuchen jeweils die linke Seite des Embryos als interne Kontrolle, welche gut in der Hinteransicht des Embryos zu sehen ist (Abb. 27B, D).

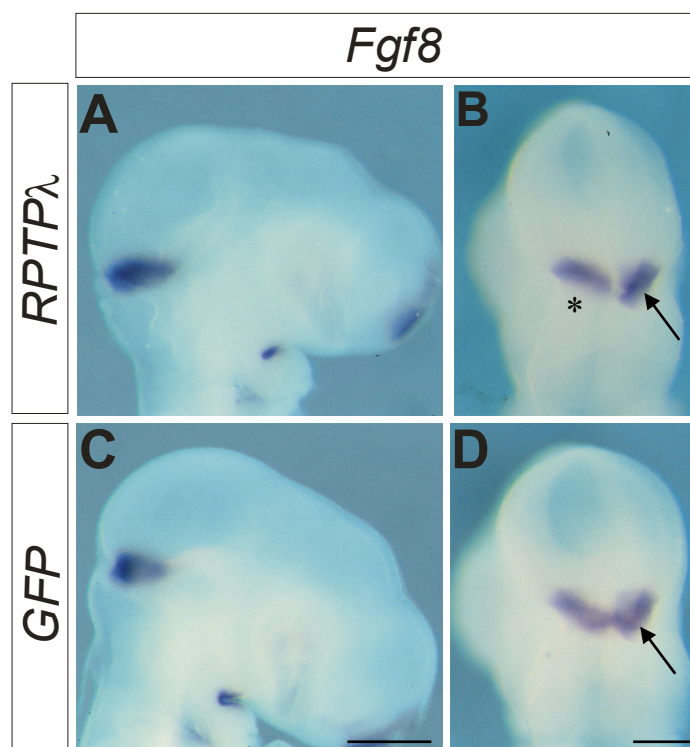


Abb. 27: Überexpression von *RPTPλ* führt nicht zu einer Änderung des Expressionsmusters von *Fgf8*. Expressionsmuster von *Fgf8* nach Überexpression von *RPTPλ* (A, B) oder *GFP* (C, D). Expression von *Fgf8* am MHO ist auf der elektroporierten rechten Seite durch einen Pfeil (B, D) und auf der nicht-elektroporierten linken Seite durch einen Stern (B) gekennzeichnet. Maßstab: (A, C) 500 μ m, (B, D) 200 μ m.

Des Weiteren wurde getestet, ob eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO zur Änderung der Expressionsmuster von Faktoren führt, die durch *Fgf8* reguliert werden. Dazu wurde zunächst erneut *RPTPλ* oder *GFP* mittels *in ovo* Elektroporation in der Region des MHO massiv überexprimiert. Anschließend wurden die Transkripte verschiedener Moleküle, von denen bekannt ist, dass sie von *Fgf8* reguliert werden, durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen.

Als erstes wurde untersucht, ob das Expressionsmuster von *Lmx1b* durch *RPTPλ* beeinflusst wird. Da in dieser Arbeit schon gezeigt werden konnte, dass *Lmx1b* in der Lage ist, die Expression von *cRPTPλ* am MHO zu induzieren, zielte dieser Versuch auf die Fragestellung ab, ob es sich hierbei um einen Rückkoppelungs-Signalweg handelt. Wie aber Abbildung Abb. 28 A und B zeigen, hat eine Überexpression von *RPTPλ* im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 28C) keinen Einfluss auf die Expression von *Lmx1b* (n = 16 / 17).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Engrailed-1* (*En-1*) die Expression von *cRPTPλ* am MHO unterdrückt (Abb. 22). Deshalb stellte sich die Frage, ob es sich in diesem Fall um einen Rückkoppelungs-Signalweg handelt. Doch auch hier zeigte sich, dass eine Überexpression von *RPTPλ* im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 28F) keinen Einfluss auf die Expression von *En-1* (Abb. 28D, E; n = 6/8) hat.

Der Transkriptionsfaktor *Pax-2* ist eines der ersten Protein, die am späteren Mittel- / Hinterhirnorganisator exprimiert werden. Es initiiert die Expression von *Fgf8* (Bouchard *et al.*, 2005). *Pax-2*^{-/-} Mäuse weisen von subtilen morphologischen Veränderungen bis hin zu einem völligen Verlust des hinteren Mittel- und Kleinhirns verschiedene Phänotypen auf (Schwarz *et al.*, 1997). Somit kann gefolgert werden, dass *Pax-2* für die Entwicklung des Mittel- und Hinterhirns von Bedeutung ist. In dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Überexpression von *RPTPλ* im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 28I) nicht zu einem veränderten Expressionsmuster von *Pax-2* führt (Abb. 28G, H; n = 9/11).

Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors *Pax-5* führt zu einer Ausweitung des Neuroepitheliums im Dien- und Mesenzephalon und fördert somit die spätere Tektumbildung (Funahashi *et al.*, 1999). *Pax-5* ist in der Lage, *En-2*, *Wnt1*, und *Fgf8* nach ektopischer Expression im Mesen- und Dienzephalon zu induzieren, während es dort *Otx2* unterdrückt (Funahashi *et al.*, 1999). Des Weiteren induziert es *ephrinA2*, ein Zelladhäsionsmolekül, welches im Tektum in einem kaudalen zu rostralen Gradienten exprimiert wird, und bei der Wegfindung retinaler Fasern eine zentrale Rolle spielt. Darüber hinaus ist *Pax-5* an der Aufrechterhaltung der tektalen Differenzierung und der rostro-kaudalen Polarität des Tektums beteiligt, was darauf hindeutet, dass *Pax-5*, neben *Fgf8*, als weiteres Schlüssel-molekül am genetischen MHO wirkt. *RPTPλ* ist auch nicht an der Regulation dieses Moleküls beteiligt, da eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO im

Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 28L) nicht zu einer veränderten Expression von *Pax-5* führte (Abb. 28J, K; n = 9/10).

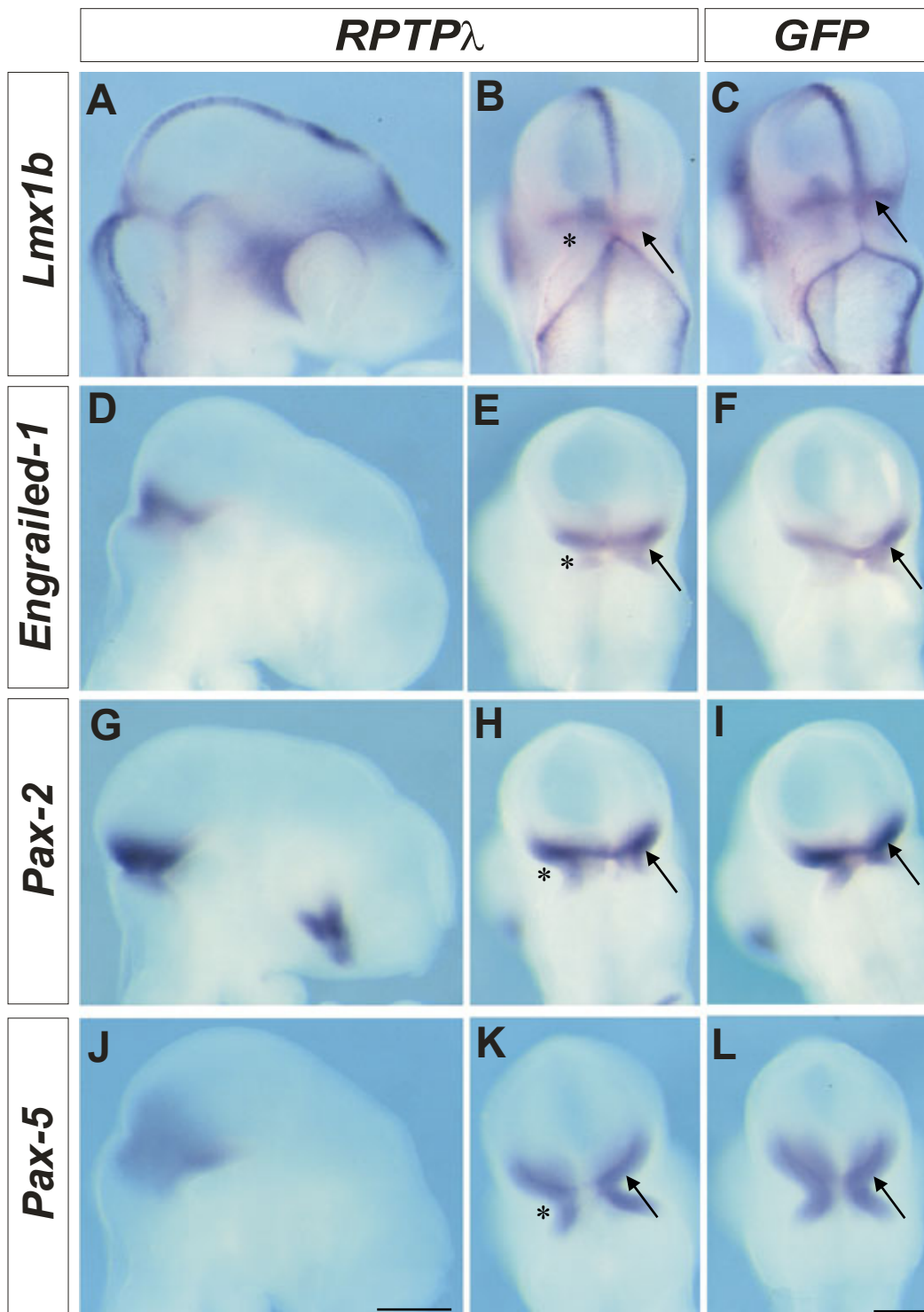


Abb. 28: Überexpression von *RPTPλ* am MHO führt zu keiner Änderung des Expressionsmusters von *Lmx1b*, *Engrailed-1*, *Pax-2* oder *Pax-5*. Expressionsmuster von *Lmx1b* (A, B), *Engrailed-1* (D, E), *Pax-2* (G, H) und *Pax-5* (J, K) nach Überexpression von *RPTPλ* oder *GFP* (C, F, I, L). Expression von *Lmx1b*, *En-1*, *Pax-2* und *Pax-5* am MHO ist auf der elektroporierten rechten Seite durch einen Pfeil (B, C, E, F, H, I, K, L) und auf der nicht-elektroporierten linken Seite durch einen Stern (B, E, H, K) gekennzeichnet. Maßstab: (A, D, G, J) 500 μ m, (B, C, E, F, H, I, K, L) 200 μ m.

In den vorangegangenen Versuchen wurde beobachtet, dass *RPTPλ* keinen Einfluss auf die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren hat, die von Fgf8 reguliert werden. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO möglicherweise zu einer Änderung des Expressionsmusters von Inhibitoren des Fgf8-Signalweges führt. Nach gleichem Elektroporationsprotokoll wurde *RPTPλ* oder eine *GFP*-Kontrolle am MHO überexprimiert und mittels *in situ* Hybridisierung anschließend das Expressionsmuster von *Sef1*, *Sprouty2* und *Grg4* analysiert.

Das Transmembranprotein Sef („similar expression to Fgf“) wird mit Fgf8 am MHO koexprimiert und gehört demnach zur sogenannten „Synexpressionsgruppe“. Es wurde gezeigt, dass dieses Molekül den Fgf-Signalweg *in vivo* inhibieren kann, indem es an den Fgf-Rezeptor 1 (FgfR1) und Fgf-Rezeptor 2 (FgfR2) bindet und so dessen Autophosphorylierung verhindert (Tsang *et al.*, 2002; Fürthauer *et al.*, 2002). Eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO führte im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 29C) nicht zu einer Änderung des Expressionsmusters von *Sef1* (Abb. 29A, B; n = 6/8).

Sprouty (Spry) wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* als Inhibitor des Signalweges des Wachstumsfaktors *branchless* identifiziert und viele Spry-Homologe bei Vertebraten werden gleichzeitig mit Liganden der Fgfs exprimiert (Sutherland *et al.*, 1996). Es wurde jedoch gezeigt, dass diese Vertebraten-Gene nicht nur nachgeschaltete Zielmoleküle des Fgf-Signalweges am MHO sind, sondern auch wichtige Modulatoren für den Signalweg selbst darstellen. Biochemische Experimente zeigten, dass Spry-Proteine eine Rückkoppelung des MAP-Kinase-Signalweges unterdrücken und Überexpression von *Spry4* in Zebrafisch eine Bildung des MHO verhindern kann (Hanafusa *et al.*, 2002; Scholpp *et al.*, 2004). Neben dieser inhibitorischen Funktion wird jedoch auch vermutet, dass Sprouty-Proteine zudem viele andere intrazelluläre Signalwege modulieren können (zusammengefasst von Guy *et al.*, 2003). Wie in Abbildung 29D, E gezeigt wird, führte eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 29F) nicht zu einem veränderten Expressionsmuster von *Sprouty2* (Abb. 29D, E; n = 6/7).

Grgs („Groucho-related genes“) kodieren für transkriptionale Ko-Inhibitoren der Lef/Tcf und Hes Proteine, welche die Signalwirkung von Wnt und Notch vermitteln. Demnach spielen sie eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen, die von Wnt und Notch kontrolliert werden, wie z.B. die laterale Inhibition, Segmentation und dorso-ventrale Musterbildung (Van Hateren

et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass *Grg4* die Expression von *En* hemmt und der *Pax-5* Aktivität entgegenwirkt (Sugiyama *et al.*, 2000). Gleichzeitig induziert *Grg4* die Expression von *Pax-6* und fördert so die Entwicklung des Dienzephalons (Sugiyama *et al.*, 2000). Eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO führte im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 29I) nicht zu einer Änderung der Expression von *Grg4* (Abb. 29G, H; n = 5/5).

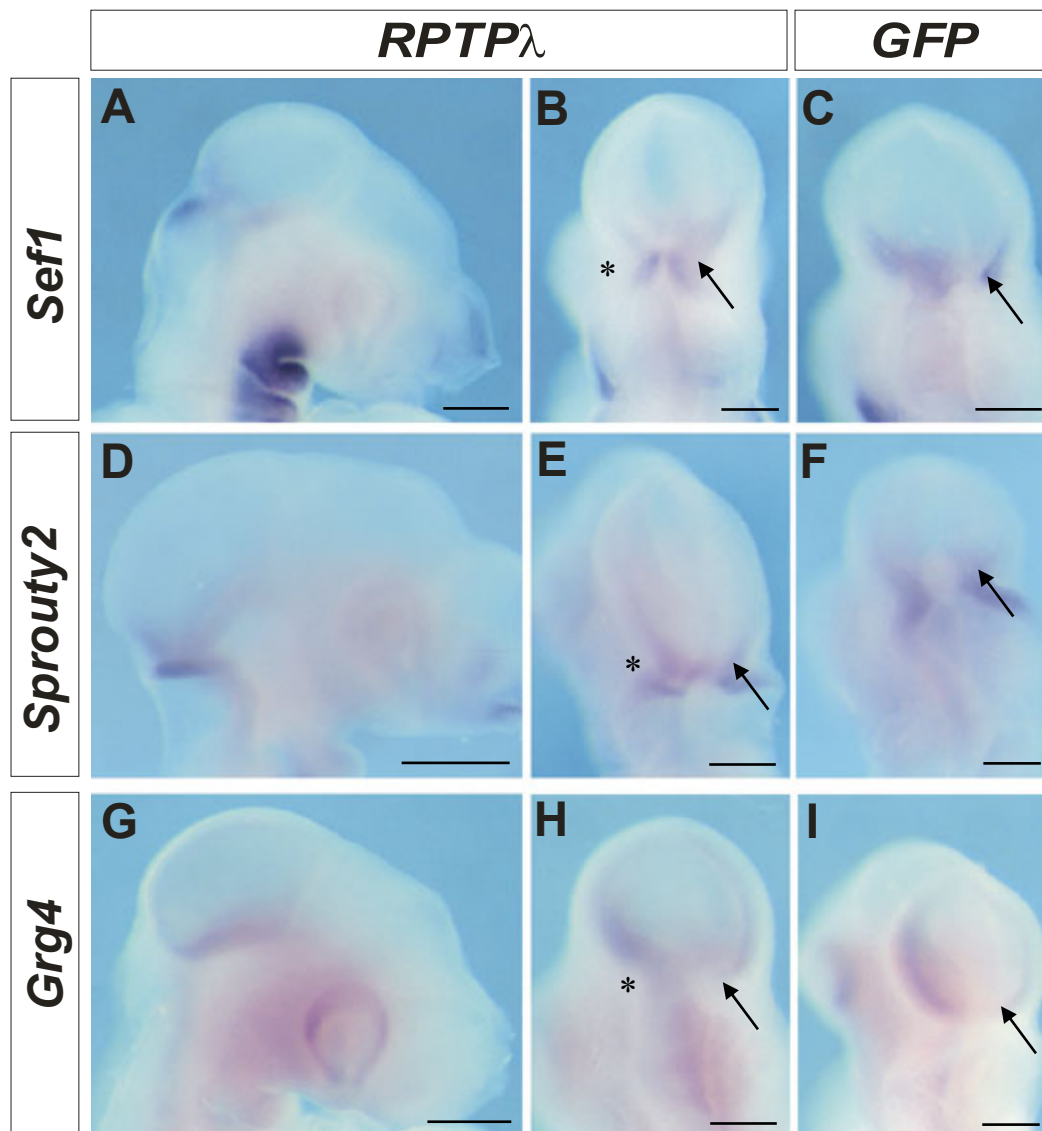


Abb. 29: Überexpression von *RPTPλ* am MHO führt zu keiner Änderung des Expressionsmusters von *Sef1*, *Sprouty2* oder *Grg4*. Expressionsmuster von *Sef1* (A, B), *Sprouty2* (D, E) und *Grg4* (G, H) nach Überexpression von *RPTPλ* (A, B, D, E, G, H) oder *GFP* (C, F, I). Expression von *Sef1*, *Sprouty2* und *Grg4* am MHO ist auf der elektroporierten rechten Seite durch einen Pfeil (B, C, E, F, H, I) und auf der nicht-elektroporierten linken Seite durch einen Stern (B, E, H) gekennzeichnet. Maßstab: (A, D, G) 500 μ m, (B, C, E, F, H, I) 200 μ m.

4.6.2. Überexpression von *cRPTPλ* führt zu einer Modulation des Expressionsmusters von *Wnt1*

cRPTPλ und *Wnt1* werden in einem scharf abgegrenzten Streifen am Mittel- / Hinterhirnorganisator exprimiert, und ihre Expressionsdomänen überlappen möglicher Weise. Um zu untersuchen, ob *RPTPλ* einen Einfluss auf die Expression von *Wnt1* hat, wurde erneut *RPTPλ* oder eine *GFP*-Kontrolle durch *in ovo* Elektroporation am MHO überexprimiert. Anschließend wurde das Expressionsmuster durch *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gegen *Wnt1* untersucht. Bei diesem Versuch zeigte sich, dass nach ektopischer Expression von *RPTPλ* die Expression von *Wnt1* am Mittel- / Hinterhirnorganisator inhibiert wird (Abb. 30A, B), bzw. sich dessen Domäne, je nach Größe der elektroporierten Region, rostral verschiebt (Daten nicht gezeigt; n = 7/15). Um zu testen, welche Domäne von *RPTPλ* nötig ist, um die Expression von *Wnt1* zu unterdrücken, wurden auf gleiche Weise zwei verschiedene Deletionskonstrukte von *RPTPλ* am MHO überexprimiert und anschließend die Transkripte von *Wnt1* nachgewiesen. Nach Überexpression von *RPTPλΔ2P*, einem Konstrukt dem beide intrazellulären Phosphatasedomänen fehlen und somit katalytisch inaktiv sein sollte, kam es erneut zu einem Verlust der *Wnt1*-Expression (Abb. 30D, E; n = 4/4). Fehlexpression von *RPTPλΔJM*, einem Konstrukt, dem beide intrazelluläre Phosphatasedomänen sowie die Juxtamembrandomäne fehlen, hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von *Wnt1* (Abb. 30F, G; n = 6/6).

Nach Überexpression von *RPTPλ* zeigte sich nur bei etwa 50 % der untersuchten Embryonen ein Effekt auf die Expression von *Wnt1*. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde deshalb ein anderes Versuchsprotokoll gewählt. Dafür wurde die Tatsache zu Nutzen gemacht, dass *Fgf8* die Aktivität des MHO im Mittelhirn simulieren kann und dort die Expression von *Wnt1* induziert (Abb. 31A). Es wurde daher untersucht, ob diese *Wnt1*-Induktion durch ektopisch exprimiertes *RPTPλ* im Mittelhirn verhindert werden kann.

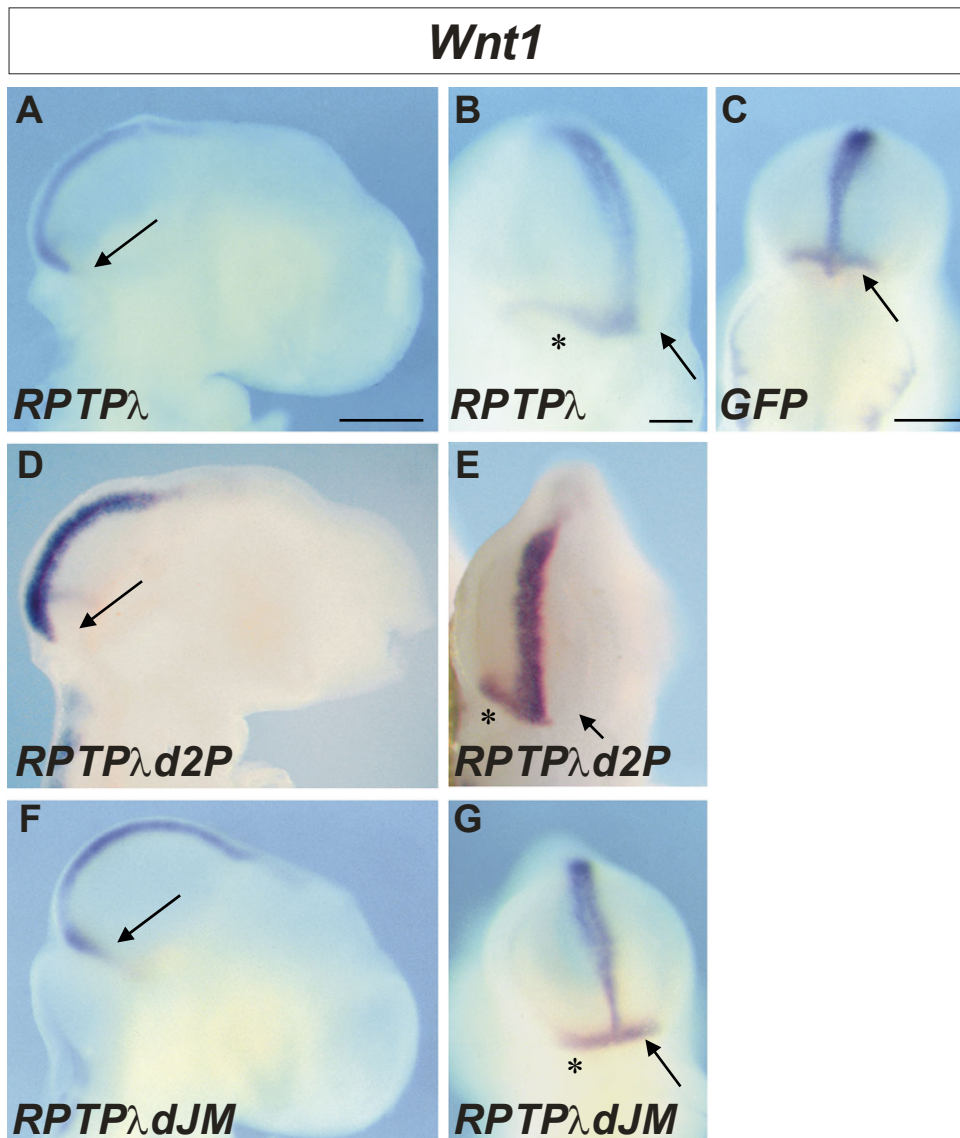


Abb. 30: Überexpression von *RPTPλ* und *RPTPλd2P*, nicht aber *RPTPλdJM* inhibiert die Expression von *Wnt1* am MHO. Die Expression von *Wnt1* wird nach Überexpression von *RPTPλ* (A, B) oder *RPTPλd2P* (D, E) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (C) unterdrückt. Überexpression von *RPTPλdJM* (F, G) hat keinen Einfluss auf die Expression von *Wnt1*. Expression von *Wnt1* am MHO wurde auf der elektroporierten rechten Seite durch einen Pfeil (B, C, E, G) und auf der nicht-elektroporierten linken Seite durch einen Stern (B) gekennzeichnet. Maßstab: (A, D, F) 500 μ m, (B) 100 μ m, (C, E, G) 200 μ m.

In diesem Experiment wurden *RPTPλ* oder *GFP* mittels *in ovo* Elektroporation ektopisch ins Mittelhirn eingebracht und nach 6-8 Stunden, wenn diese Proteine bereits stark überexprimiert werden (Abb. 31B), wurde *Fgf8* in derselben Region mittels Elektroporation überexprimiert. Nachdem den Embryonen die Gelegenheit gegeben wurde, sich weitere 18 Stunden zu entwickeln, wurde die Expression von *Wnt1* analysiert. Nach Fehlexpression von *RPTPλ* und *Fgf8* schien die ektopische Expression von *Wnt1* im Mittelhirn unterdrückt zu werden (Abb. 31E; n = 15/18). Dies lässt darauf schließen, dass *Wnt1* in Zellen, die *RPTPλ* exprimieren, nicht mehr von *Fgf8* induziert werden kann. Das es sich hierbei nicht um einen

Effekt der zweifachen Elektroporation handelt, zeigt eine Kontrolle, bei der unter gleichen Bedingungen ein Leervektor und 6-8 Stunden später *Fgf8* ektopisch exprimiert wurde (Abb. 31C). Zudem konnte beobachtet werden, dass *Wnt1* auch in Zellen, die *RPTP λ Δ JM* exprimieren, ein Konstrukt, dem beide Phosphatasedomänen sowie die Juxtamembrandomäne fehlen, von *Fgf8* induziert werden kann (Abb. 31D; n = 7/8). Teilweise auftretende kreisrunde Aussparungen in der ektopischen Expression von *Wnt1* im Mittelhirn sind methodisch bedingt (z.B. Abb. 31D).

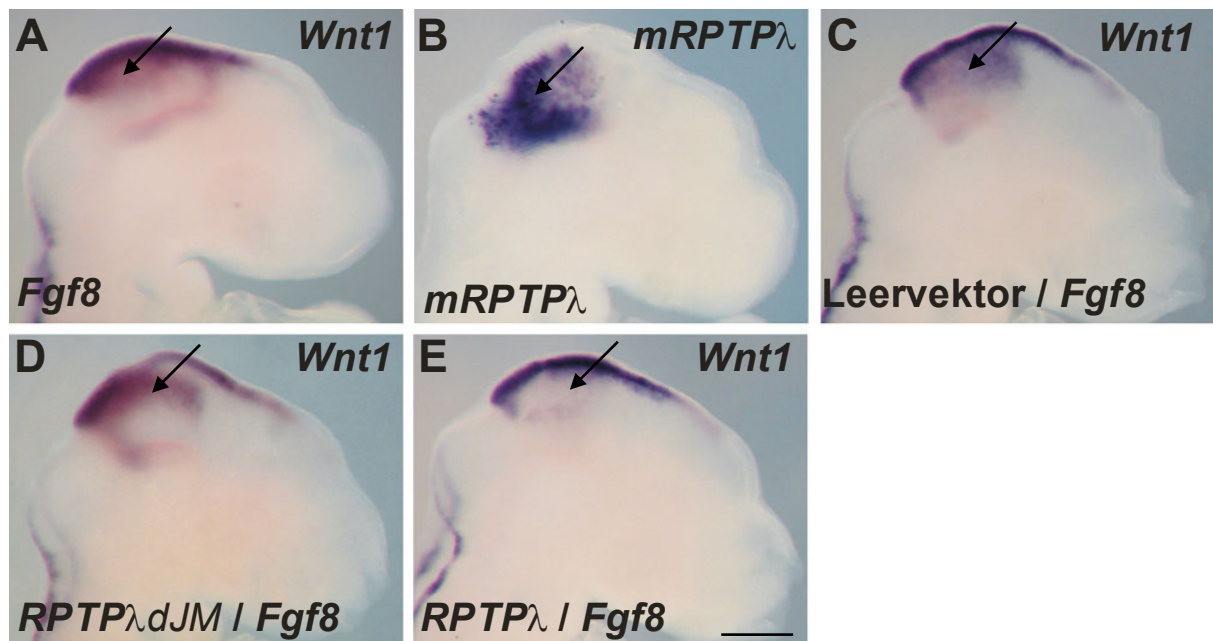


Abb. 31: In Zellen, die *RPTP λ* exprimieren, kann *Wnt1* durch *Fgf8* nicht induziert werden. Ektopische Expression von *Fgf8* im Mesenzephalon induziert *Wnt1* (A). Nach *in ovo* Elektroporation von *mRPTP λ* wird *RPTP λ* in einem weiten Bereich des Mittelhirns exprimiert (B). Während eine Überexpression des Leervektors (C), oder des Expressionsplasmides für *RPTP λ Δ JM* (D) mit anschließender ektopischer Expression von *Fgf8* zu einer Induktion von *Wnt1* führt, kann *Wnt1* in Zellen, *RPTP λ* exprimieren, nicht mehr von *Fgf8* induziert werden (E). Maßstab: (A-E) 500 μ m.

Da in dieser Arbeit ein *RPTP λ* -Konstrukt aus der Maus elektroporiert wurde, welches sehr homolog zur Aminosäuresequenz von *RPTP λ* aus dem Hühnchen ist, ermöglicht dies mit einer spezifischen Sonde gegen die Transkripte von *mRPTP λ* den Nachweis der ektopischen Expression (Abb. 31B; Tab. 15).

Um zu zeigen, dass dieser Effekt spezifisch ist, wurde das Experiment wiederholt, allerdings wurden in diesem Fall die Transkripte von *Engrailed-1* (*En-1*) analysiert. Diese Sonde wurde als Kontrolle gewählt, weil *Fgf8* auch *En-1* induziert (Abb. 32B), und schon gezeigt werden

konnte, dass eine Überexpression von *RPTPλ* am MHO nicht zu einer Änderung des Expressionsmusters von *En-1* führte (Abschnitt 4.6.1.).

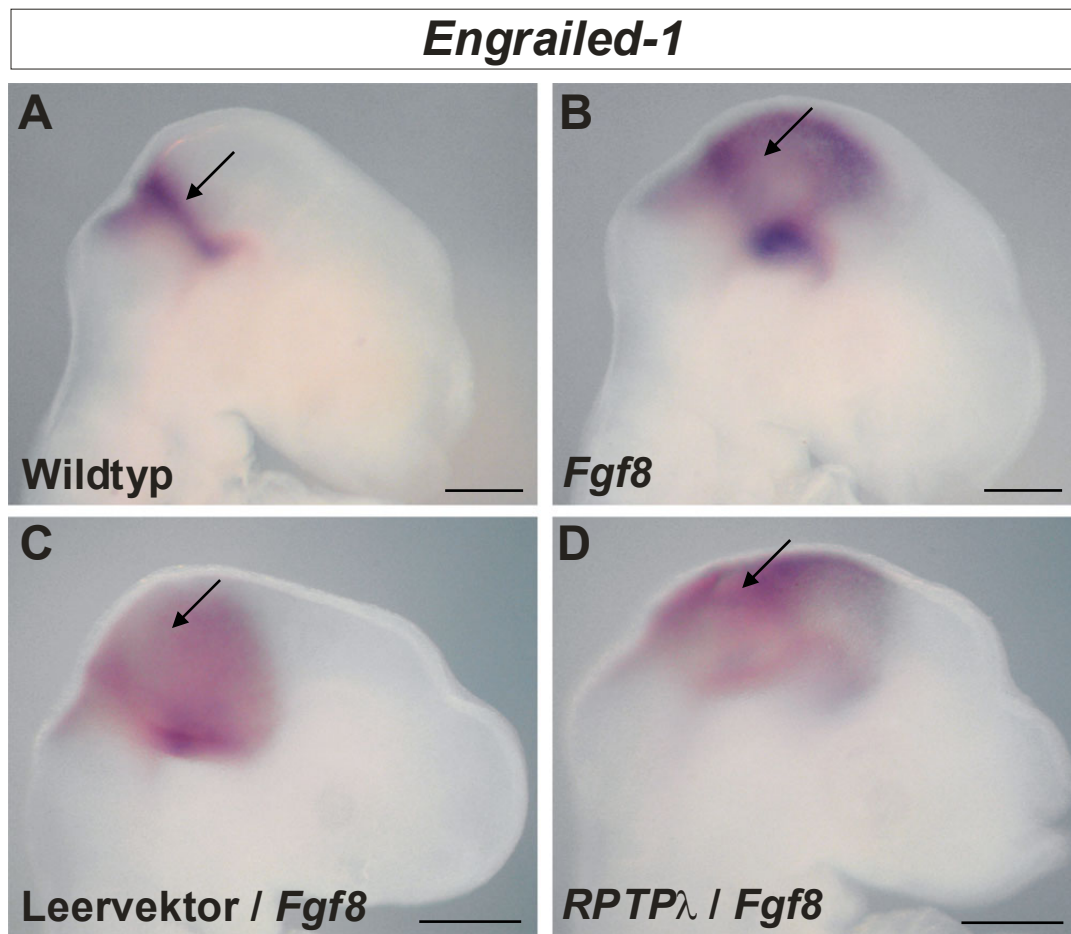


Abb. 32: In Zellen, die *RPTPλ* exprimieren, kann *En-1* weiterhin durch *Fgf8* induziert werden. Wildtypische Expression von *En-1* am MHO (A). Ektopische Expression von *Fgf8* im Mesenzephalon induziert *En-1* (B). *En-1* kann sowohl nach einer Überexpression des Leervektors mit anschließender ektopischer Expression von *Fgf8* (C), als auch nach Überexpression von *RPTPλ* und *Fgf8* induziert werden (D). Maßstab: (A-D) 500 μ m.

Dieses Experiment zeigte, dass *En-1* auch in Zellen, die *RPTPλ* exprimieren, von *Fgf8* induziert werden kann (Abb. 32D; n = 6/7). Das ektopische Expressionsmuster von *En-1* im Mittelhirn ist hier nicht von der Kontrolle, bei der unter gleichen Bedingungen der Leervektor und 6-8 Stunden später *Fgf8* ektopisch exprimiert wurde, zu unterscheiden (Abb. 32C).

Dieses Ergebnis bestätigt, dass der zuvor gezeigte Effekt von *RPTPλ* auf die Expression von *Wnt1* spezifisch ist.

4.7. Unterdrückung der Expression von *cRPTPλ* durch RNAi

Als Alternative zu den Überexpressions-Experimenten wurde eine siRNA-Strategie ("short interfering RNAs") zur Unterdrückung der Expression von *cRPTPλ* am MHO etabliert, um den hemmenden Effekt von *RPTPλ* auf die Expression von *Wnt1* näher zu charakterisieren. Dazu wurden vier chemisch synthetisierte doppelsträngige siRNAs mit einer Länge von 19 Basen gegen unterschiedliche Regionen von *RPTPλ* mit Hilfe des „siRNA Target Designers“ der Firma Promega entworfen (Tabb. 13). Dabei wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Formation der sogenannten „Hairpin“-Sequenzen eingesetzt (Scherr *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

4.7.1. Unterdrückung der Expression von *cRPTPλ* *in vitro*

Um die Effizienz der siRNAs zur Inaktivierung von *cRPTPλ* in einem einfachen Versuchsaufbau *in vitro* zu bestimmen, wurde das psiCHECK™-System von Promega (Mannheim) gewählt. Dieses System beruht auf dem Nachweis der *Renilla*-Luciferase, welche als Reporter-Gen mit *cRPTPλ* fusioniert wurde (siehe 3.2.23.2.). Dazu wurde die Zielsequenz von *cRPTPλ* in den psiCHECK™2-Expressionsvektor kloniert. Anschließend wurden 0,75 µg der Zielsequenz zusammen mit 0,75 µg der jeweiligen siRNA in HEK-293T Zellen transfiziert. Wurde durch eine der siRNAs die Spaltung der fusionierten *Renilla*-Zielsequenz induziert, so nahm das Signal der *Renilla*-Luciferase ab, da die Spaltung der chimären mRNA sehr schnell den Abbau des gesamten mRNA Moleküls nach sich zieht. Das Signal der *Renilla*-Luciferase wurde gegen das der Firefly-Luciferase normalisiert, wodurch eine qualitative Beurteilung der Effizienz der siRNAs nach Messung der Luciferase-Aktivität möglich wurde.

Für die Messung der Luciferase-Aktivitäten wurden je Transfektion einer Ø 3,5 cm Platte 200 µl (= Verdünnung 1) oder 100 µl (= Verdünnung 2) Zellsuspension eingesetzt. Mit allen vier siRNAs gegen *cRPTPλ* wurde *in vitro* ein deutlicher Abbau des Zielmoleküls erreicht (Abb. 33; n = 1). Die normalisierte *Renilla*-Luciferase-Aktivität des *cRPTPλ* - Expressionsvektors nach einer Transfektion ohne siRNA wurde gleich 100 % gesetzt. In Relation dazu reduzierte RPTPL-RI_A gegen die kodierende Sequenz von *cRPTPλ* die Expression des Reportergens um 92,3 %, RPTPL-RI_B um 54,3 %, RPTPL-RI_C um 91,5 %, RPTPL-RI_D um 83,4 % und die Kontroll-Transfektion einer siRNA gegen die Zielsequenz des nicht mit *cRPTPλ* verwandten *cMeis2* (Meis2_RI_A) um 4,6 %.

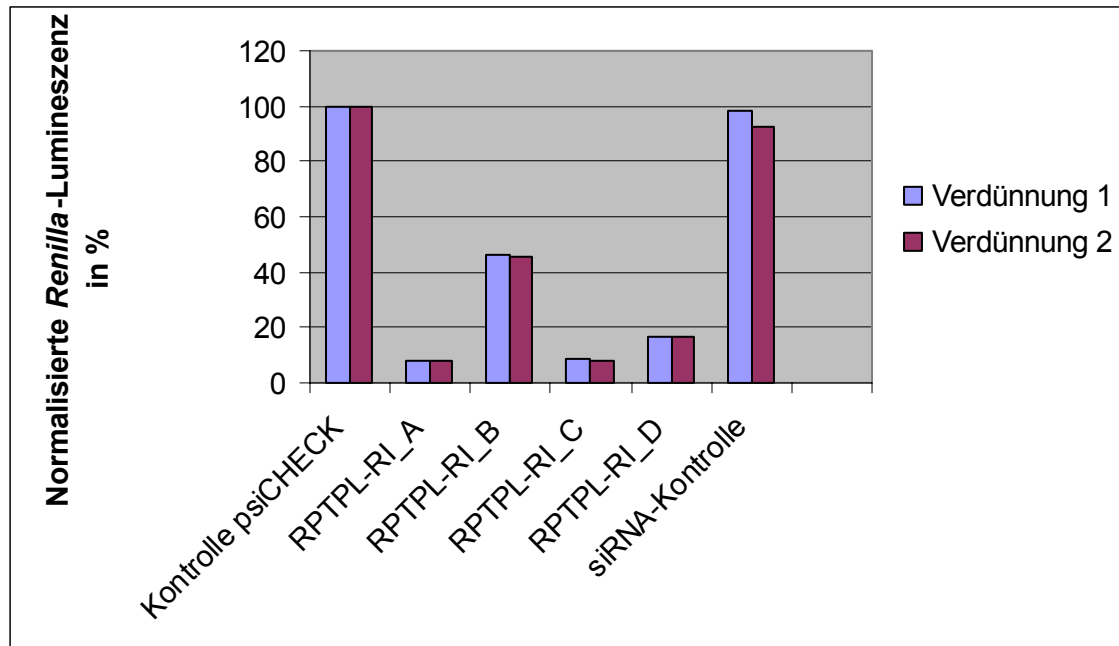


Abb. 33: Auswahl der Zielsequenz mit Hilfe des psiCHECK-Vektors. Mit allen vier siRNAs gegen *cRPTPλ* wurde ein deutlicher Abbau des Zielmoleküls erreicht. Dabei ging die Expression von *cRPTPλ* auf (A) 7,75 %, (B) 45,75 %, (C) 8,5 % und (D) 16,65 % zurück. Die Kontroll-siRNA gegen ein nicht verwandtes Protein von *cRPTPλ* war nicht in der Lage, den Abbau des Zielmoleküls zu initiieren. Die normalisierte *Renilla*-Luciferase-Aktivität des *cRPTPλ* - Expressionsvektors nach einer Transfektion ohne siRNA wurde gleich 100 % gesetzt.

4.7.2. Unterdrückung der Expression von *cRPTPλ* am MHO führt zu einer diffusen Expression von *Wnt1*

Um die Effizienz der siRNAs *in vivo* zu testen wurden 1,5 µg RPTPL-RI_D-psiSTRIKE-hMGFP in die Mittel- / Hinterhirnregion durch *in ovo* Elektroporation eingebracht. Eine *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gegen Transkripte von *cRPTPλ* zeigte, dass dessen Expression am MHO im Vergleich zur wildtypischen Expression unterdrückt wurde (Abb. 34A, B, n = 4/4). Wenn *cRPTPλ* am MHO unterdrückt wurde, wurde im Vergleich zur wildtypischen Expression von *Wnt1* beobachtet, dass *Wnt1* in verstreuten Zellen außerhalb der normalen *Wnt1*-Domäne, aber immer noch in der Nähe der Fgf8-Quelle, exprimiert wird (Abb. 34C, D, E, F; n = 7).

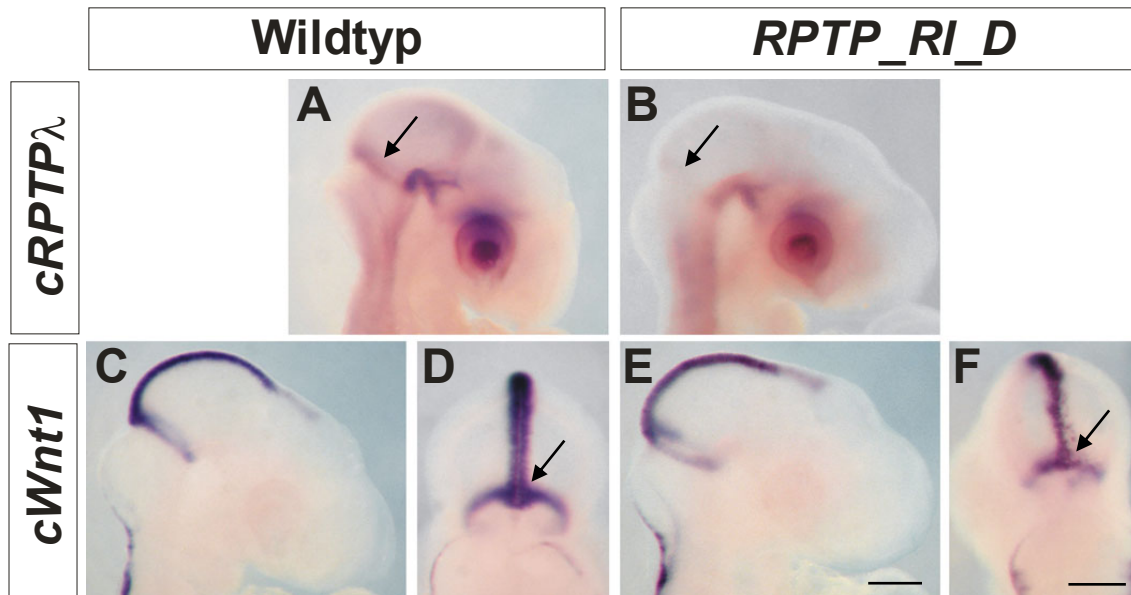


Abb. 34: Unterdrückung der Expression von *cRPTPλ* am MHO führt zu einer diffusen Expression von *Wnt1*. Nach *in ovo* Elektroporation von *RPTP_RI_D* wird *cRPTPλ* am MHO (B), im Vergleich zur wildtypischen Expression (A) unterdrückt. Nach Unterdrückung von *cRPTPλ* erscheint die *Wnt1* Expression am MHO im Vergleich zur wildtypischen Expression (C, D) diffus, aber immer noch in der Nähe der Fgf8-Quelle (E, F). Maßstab: (A, B, C, E) 500 μ m, (D, F) 200 μ m.

4.8. Untersuchungen zur Regulation der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ im Mittelhirn

Während im Stadium HH 9-11 (E1.5) *cRPTPλ* stark im Mesenzephalon exprimiert wird, ist diese Expression im Stadium HH 14-16 (E2.5) weitgehend unterdrückt und beschränkt sich auf einen Streifen von Zellen anterior der isthmischen Einschnürung. Durch *in situ* Hybridisierungen auf Vibratomschnitten konnten im Stadium HH 20 (E3.5) jedoch erneut Transkripte von *cRPTPλ* im sich entwickelnden optischen Tektum in einem rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.). Der ventrale Mittelstreifen im Mesenzephalon, in dem *Wnt1* exprimiert wird, weist keine Expression von *cRPTPλ* auf. Bei der Betrachtung dieses Expressionsmusters stellte sich die Frage, welche Faktoren an der Regulation dieser räumlich und zeitlich hoch dynamischen Expression von *cRPTPλ* im Mittelhirn beteiligt sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurden einige bekannte Mittelhirnmarker bzw. eine *GFP*-Kontrolle im Mesenzephalon mittels Mikroelektroporation oder Virusinjektion überexprimiert. Anschließend wurde das Expressionsmuster von *cRPTPλ* durch *in situ* Hybridisierung analysiert.

4.8.1. Überexpression von *Meis2* induziert keine ektopische Expression von *cRPTPλ*

Meis Proteine gehören zur Gruppe der TALE-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren. TALE steht für „three amino acid loop extension“, d.h. sie besitzen im Gegensatz zu anderen Homeodomän-Proteinen drei zusätzliche Aminosäuren innerhalb ihrer Homeodomäne, der DNA-Bindedomäne (Bürglin *et al.*, 1997). Meis-Proteine spielen bei Vertebraten eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen und bei Invertebraten bei der Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems (Maeda *et al.*, 2002).

Meis2 wird im Mittelhirn des Hühnchens ab dem Stadium HH 11 exprimiert und im Stadium HH 12 wird ein charakteristischer dorso-ventral Expressionsgradient ausgebildet. Die sezernierten Moleküle Shh und BMP sind an dieser Musterbildung beteiligt. Dabei hemmt Shh die Expression von *Meis2* im optischen Tektum, während BMPs die Expression von *Meis2* entlang der dorsalen Mittellinie hemmen. *Meis2* ist im optischen Tektum direkt oder indirekt an der Regulation der Expression von *ephrinB1* beteiligt, nicht jedoch an der Expression anderer Tektum-spezifischer Gene, wie *Pax-3*, *Pax-5*, *Pax-7*, *En-1*, *Otx2* und *Wnt1* (Z. Agoston, Diplomarbeit 2005).

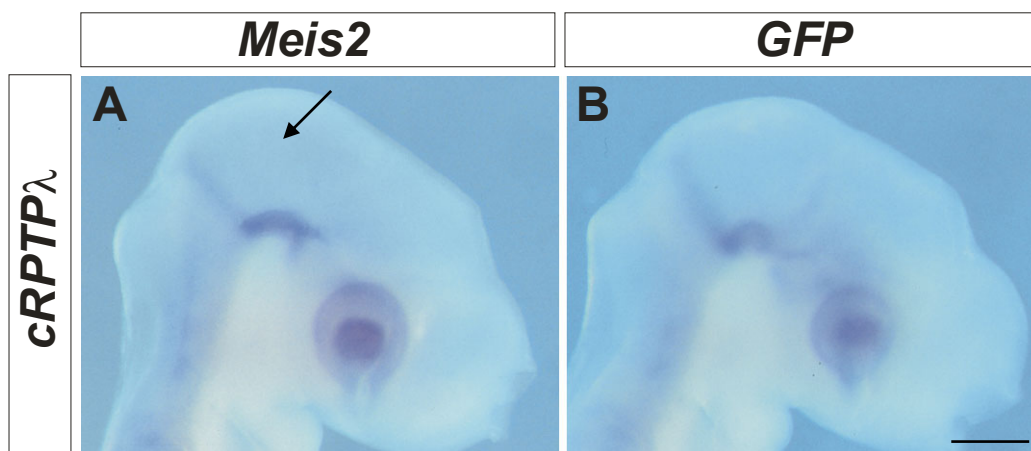


Abb. 35: Überexpression von *Meis2* induziert keine ektopische Expression von *cRPTPλ* im Mittelhirn. (A) Expressionsmuster von *cRPTPλ* nach Überexpression von *cMeis2* oder (B) *GFP*. Das Mesencephalon ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (A). Maßstab: (A-B) 500 μ m.

Nach Überexpression von *cMeis2* zeigte sich im Mittelhirn keine ektopische Expression von *cRPTPλ* (Abb. 35A; n = 8/8) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 35B). Dies deutet darauf hin, dass *Meis2* nicht an der Regulation von *cRPTPλ* im Mittelhirn beteiligt ist.

4.8.2. Überexpression von $x\beta$ -Catenin induziert keine ektopische Expression von $cRPTP\lambda$ oder *Wnt1*

β -Catenin ist das Wirbeltier-Homolog des segmentalen Polaritätsgen *Armadillo* aus *Drosophila melanogaster* und wurde als zytoplasmatisches Protein identifiziert, das mit Cadherin interagiert und so Zell-Zell-Adhäsion reguliert (Nagafuchi und Takeichi, 1988; Ozawa *et al.*, 1989; Peifer und Wieschaus, 1990).

β -Catenin ist aber auch eine wichtige Komponente des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges, da es den Frizzled- und LRP-Rezeptoren nachgeschaltet ist (Abschnitt 2.5). In Anwesenheit des sezernierten Glykoproteins Wnt wird das zytoplasmatische β -Catenin stabilisiert und wandert in den Zellkern, wo es mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF Familie interagiert und so die Expression von Genen, wie *c-myc*, *c-jun*, *fra-1* und *cyclin D1* stimuliert (Behrens *et al.*, 1996; Willert *et al.*, 2002). Die Menge und die Funktion von β -Catenin werden sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus reguliert (Kikuchi, 2000).

In Abwesenheit des Wnt Signals wird das N-terminale Ende von β -Catenin durch die Casein Kinase I am Serinrest an Position 45 phosphoryliert, woraufhin GSK3 β die Serin/Threoninreste an den Positionen 41, 37 und 33 phosphoryliert (Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Schwarz-Romond *et al.*, 2002). Komplett phosphoryliertes β -Catenin wird anschließend ubiquitiniert und durch Proteosomen abgebaut.

Da während der frühen Entwicklung des Mittelhirns im Hühnchen auch β -Catenin exprimiert wird, wurde untersucht, ob dieses Genprodukt an der Regulation von $cRPTP\lambda$ beteiligt ist. Für diesen Versuch wurde ein dominant aktives Konstrukt von $x\beta$ -Catenin verwendet. Diesem Konstrukt fehlen die N-terminalen Seronin- / Threonin-Phosphorylierungsstellen, und kann somit nicht ubiquitiniert und abgebaut werden. Überexpression dieses Konstruktes von $x\beta$ -Catenin induzierte im Mittelhirn keine ektopische Expression von $cRPTP\lambda$ (Abb. 36A; n = 8) im Vergleich zur GFP-Kontrolle (Abb. 36B). Dies deutet darauf hin, dass β -Catenin nicht an der Regulation der $cRPTP\lambda$ - Expression beteiligt ist. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des gleichen Konstruktes von $x\beta$ -Catenin im Mittelhirn im Vergleich zur GFP-Kontrolle (Abb. 36D) nicht zu einer Induktion von *Wnt1*-Expression führt (Abb. 36C; n = 12).

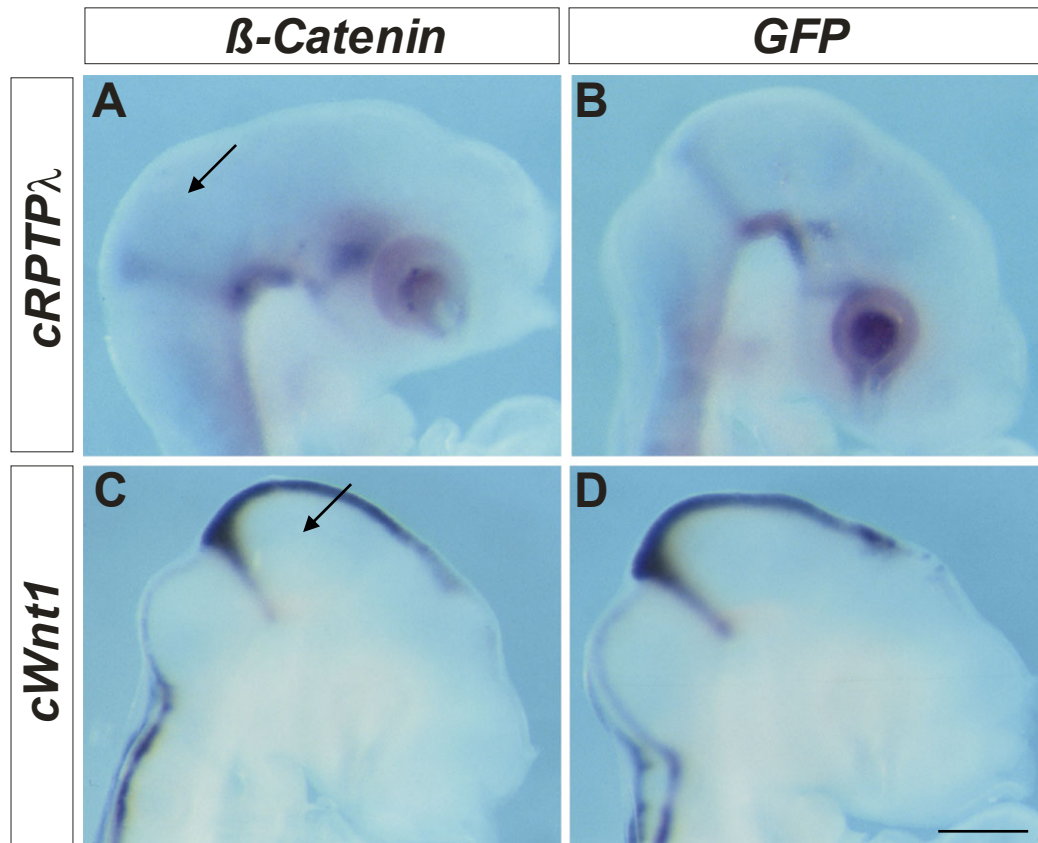


Abb. 36: Überexpression von β -Catenin induziert keine ektopische Expression von *cRPTP λ* oder *cWnt1* im Mittelhirn. Expressionsmuster von (A) *cRPTP λ* oder (C) *cWnt1* nach Überexpression von *x β -Catenin* oder (B, D) *GFP*. Das Mesenzephalon ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (A, C). Maßstab: (A-D) 500 μ m.

4.8.3. Fehlexpression von *Lmx1b* im Mittelhirn induziert keine ektopische Expression von *cRPTP λ* oder *CEPU-1*

In Abschnitt 4.5.4. konnte nach Überexpression von *Lmx1b* am MHO schon gezeigt werden, dass *Lmx1b* eine Expression von *cRPTP λ* im kaudalen Mesenzephalon in unmittelbarer Nähe zum MHO, nicht aber im Metenzephalon induziert. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob eine Fehlexpression von *cLmx1b* auch im anterioren und zentralen Mittelhirn eine Expression von *cRPTP λ* induzieren kann. Es konnte beobachtet werden, dass hier eine Expression von *cRPTP λ* (Abb. 37A; n = 9) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 37B) nur im ventralen, nicht aber im dorsalen Mesenzephalon induziert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *cRPTP λ* im dorsalen Mittelhirn anders als am MHO reguliert wird.

Parallele Experimente zeigten, dass ektopische Expression von *cLmx1b* im Mittelhirn auch nicht zur Induktion von *CEPU-1* (Abb. 37C; n = 6) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 37D) führte.

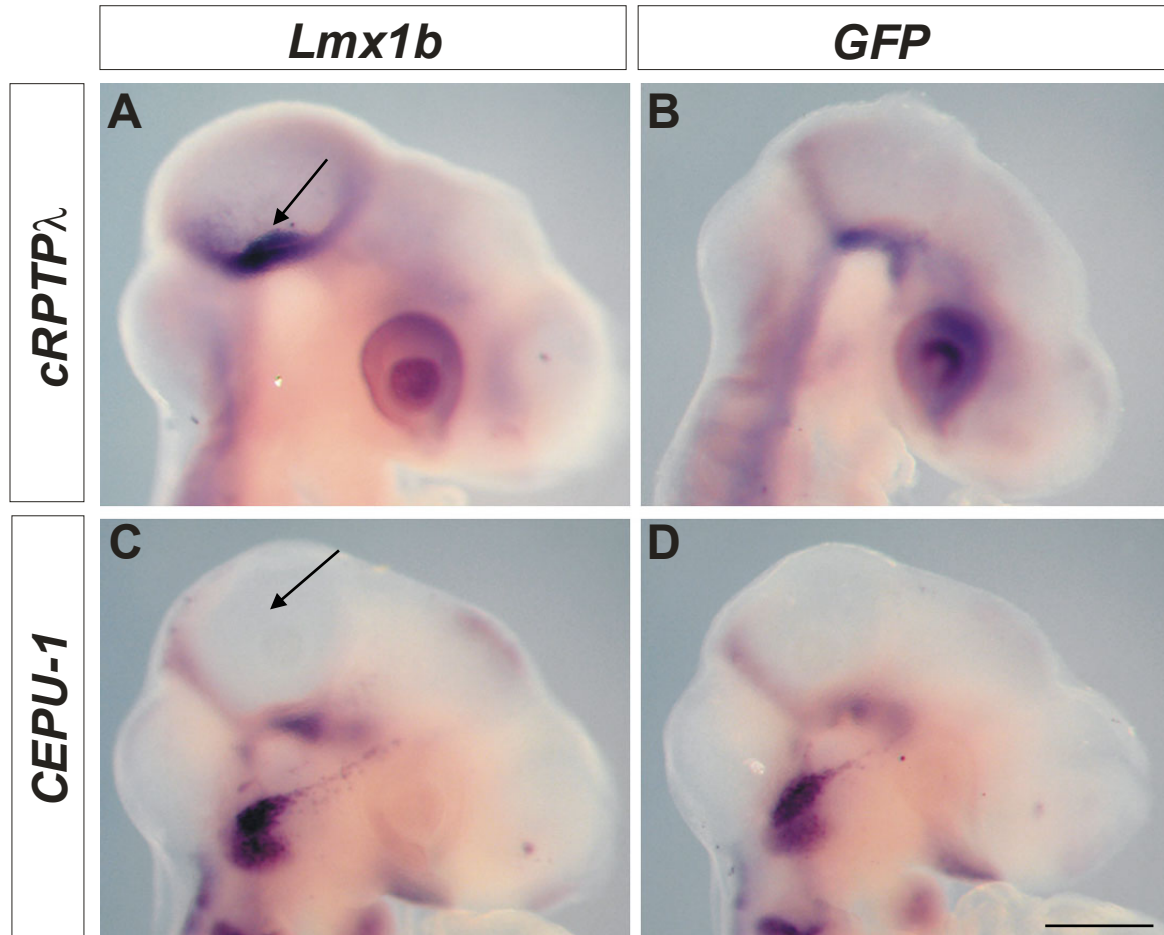


Abb. 37: Überexpression von *Lmx1b* im Mittelhirn induziert eine Expression von *cRPTPλ* nur im ventralen Mesenzephalon und keine Expression von *CEPU-1*. *In ovo* Elektroporation eines Expressionsplasmides für *cLmx1b* (A, C) oder *GFP* (B, D). *cRPTPλ* wird nach Fehlexpression von *cLmx1b* (A), nicht aber nach Fehlexpression von *GFP* (B) im ventralen Mesenzephalon induziert. Das Expressionsmuster von *CEPU-1* ändert sich nach Fehlexpression von *cLmx1b* (C) oder nach Fehlexpression von *GFP* (D) nicht. Ektopische Expression von *cRPTPλ* und fehlende ektopische Expression von *CEPU-1* im Mittelhirn sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (A, C). Maßstab: (A-D) 500 μ m.

4.8.4. Fehlexpression von *Engrailed-1* im Mittelhirn induziert oder hemmt nicht die Expression von *cRPTPλ*

In Abschnitt 4.5.5. konnte gezeigt werden, dass die Expression von *cRPTPλ* nach Überexpression von *mEngrailed-1* am MHO deutlich abnahm, deshalb wurde untersucht, ob *Engrailed-1* auch an der Regulation von *cRPTPλ* im Mesenzephalon beteiligt ist. Es wurde beobachtet, dass eine Fehlexpression von *mEn-1* im Mesenzephalon 24 Stunden nach der

Elektroporation (E2.5) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 38B) keine ektopische Expression von *cRPTPλ* induzierte (Abb. 38A; n = 6). Wurde 36 Stunden nach der Elektroporation (E3.5), also zum Zeitpunkt, wenn *cRPTPλ* erneut im sich entwickelnden optischen Tektum in einem rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten exprimiert wird, eine *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gegen Transkripte von *cRPTPλ* durchgeführt, so zeigte sich, dass *En-1* die Expression von *cRPTPλ* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 38D) nicht unterdrückt (Abb. 38C; n = 3).

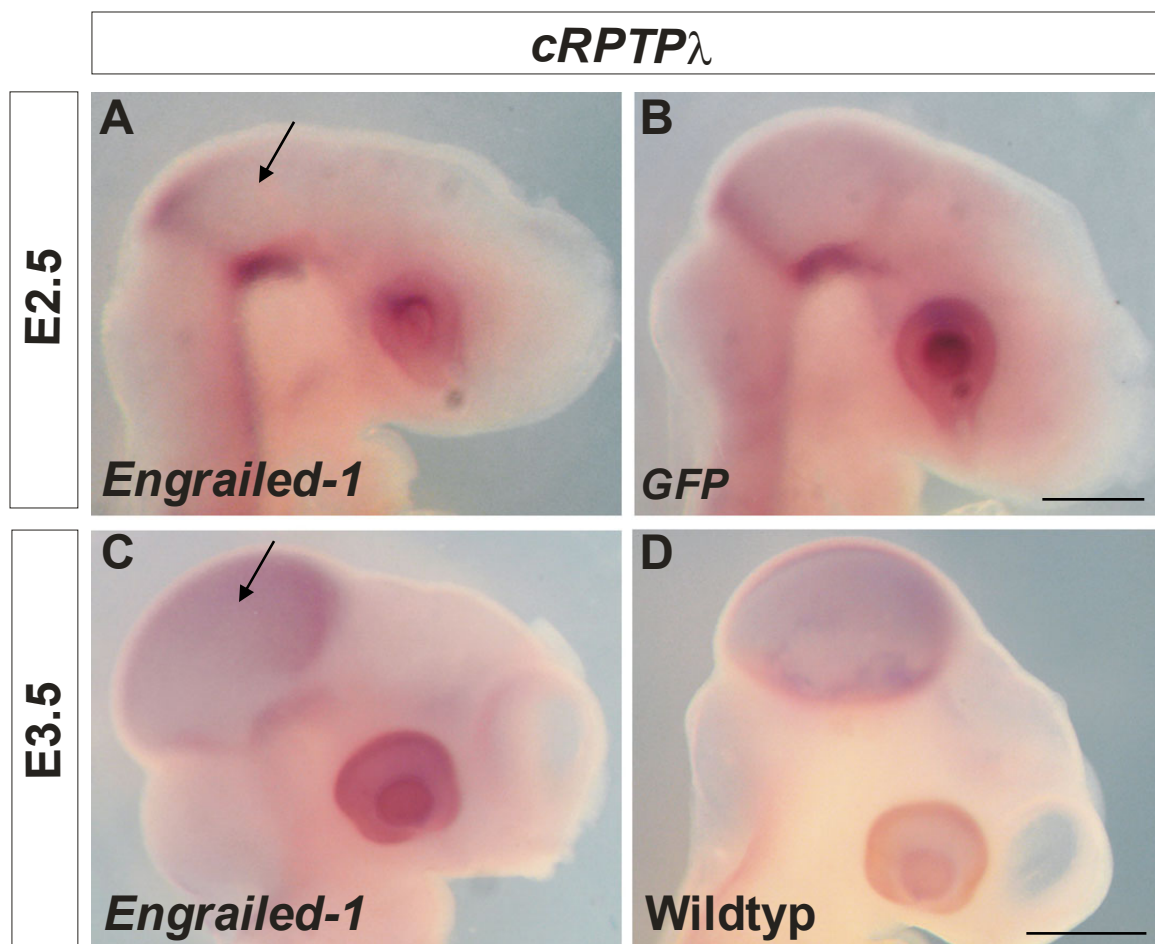


Abb. 38: Fehlexpression von *Engrailed-1* im Mittelhirn induziert keine ektopische Expression von *cRPTPλ* E2.5 und unterdrückt nicht die Expression von *cRPTPλ* E3.5. Expressionsmuster von *cRPTPλ* nach Überexpression von *mEn-1* (A) oder *GFP* (B) E2.5. Expressionsmuster von *cRPTPλ* nach Überexpression von *mEn-1* (C) im Vergleich zum Wildtyp (D) E3.5. Die Expression von *cRPTPλ* ist im Mittelhirn durch einen Pfeil gekennzeichnet (A, C). Maßstab: (A-B) 500 μ m, (C-D) 1 mm.

4.8.5. Fehlexpression von *Sonic hedgehog* im Mittelhirn unterdrückt die Expression von *cRPTPλ*

In Wirbeltier-Embryonen wird *Sonic hedgehog* (*Shh*) in einer Reihe wichtiger Signalzentren exprimiert, wie z.B. im Notochord, in der Bodenplatte und in der Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA), in einer apikalen Population posteriorer Mesenchym-Zellen in den Gliedknospen (Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995). Ektopische Expression von *Shh* zeigte, dass *Shh* die ventrale Polarität im Neuralrohr und die anterior-posterior Polarität in den Gliedmaßen reguliert (Echelard *et al.*, 1993; Krauss *et al.*, 1993; Riddle *et al.*, 1993). Hh-Signale können unterschiedliche biologische Antworten hervorrufen, je nachdem, in welchem Kontext sie wirken. Demnach können Hh-Signale die Differenzierung von Zellen, Zell-Proliferation und das Überleben von Zellen in verschiedenen Zielzellen regulieren. Das Signal kann über kurze, oder lange Distanzen mit einer Reichweite von bis zu mehreren Zellreihen, direkt oder indirekt, und vor allem konzentrationsabhängig wirken, um verschiedene molekulare Antworten bei bestimmten Konzentrationen zu stimulieren (zusammengefasst von Ingham und McMahon, 2001). *Shh* wirkt demnach als klassisches Morphogen.

Um zu untersuchen, ob *Shh* einen Einfluss auf die Expression von *cRPTPλ* hat, wurde *Shh* mit Hilfe retroviraler Expression im Stadium HH 11 im Mittelhirn fehlexprimiert. Die retrovirale Fehlexpression wurde durch RCAS-Viren durchgeführt, die die gesamte kodierende Sequenz des *Shh*-Proteins tragen. Die *in ovo* Injektion von gereinigten Viruspartikeln führte zu zufällig verteilten Infektionsereignissen im gesamten Neuralrohr. Dadurch kam es zur Expression von *Shh* in Zellen, die normalerweise kein *Shh* produzieren, in diesem Fall in Zellen des dorsalen Mittelhirns. Eine Kontrolle, wie z.B. die Injektion eines RCAS-Konstruktes, welches die kodierende Sequenz für GFP trägt, fehlte in diesem Versuch. Nach Infektion mit RCAS-*Shh* zeigten sich im optischen Tektum (Abb. 39A; n = 5) und im Auge (Daten nicht gezeigt) deutliche Unterschiede im Expressionsmuster von *cRPTPλ* im Vergleich zur wildtypischen Situation (Abb. 39B). Das Expressionsmuster war hier stellenweise von fleckenartigen Bereichen unterbrochen, in denen sich keine Transkripte von *cRPTPλ* nachweisen ließen. Eine ektopische Expression von *Shh* führte demnach zu einer Unterdrückung der *cRPTPλ*-Expression im Mittelhirn und im Auge.

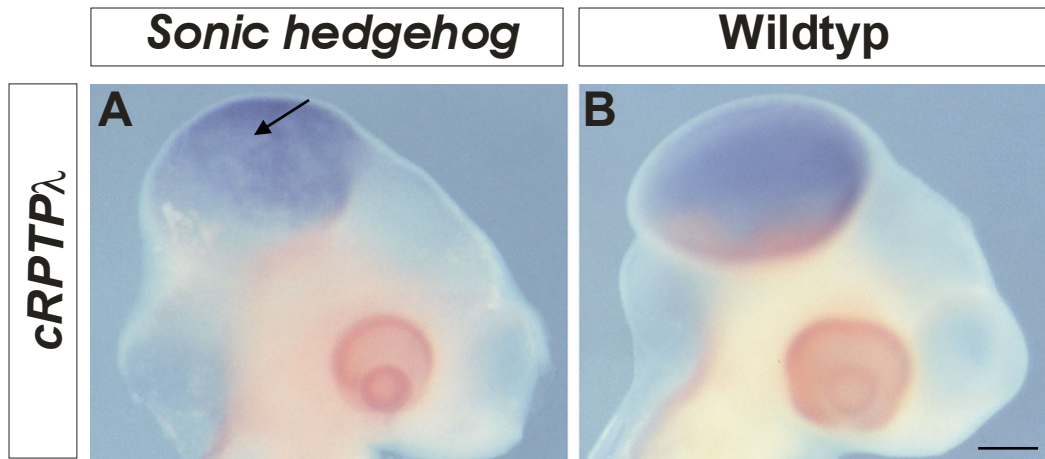


Abb. 39: Fehlexpression von *Sonic hedgehog* im Mittelhirn unterdrückt die Expression von *cRPTPλ*. Expressionsmuster von *cRPTPλ* nach Injektion von *Shh-RCAS* (A) im Vergleich zum Wildtyp (B). *cRPTPλ* wird nach Fehlexpression von *Shh* (A) im Vergleich zum Wildtyp (B) unterdrückt. Fehlende Expression von *cRPTPλ* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (A). Maßstab: (A-B) 500 μ m.

4.9. Funktion von *cRPTPλ* im Mesenzephalon

4.9.1. Fehlexpression von *cRPTPλ* führt zu einem verkleinerten Mittelhirn

Die Expression von *cRPTPλ* erstreckt sich im Stadium HH 11 (E1.5) über das gesamte Mesenzephalon (Abb. 40A), doch diese Expressionsdomäne verkleinert sich später im Stadium HH 12 auf einen Streifen von Zellen anterior der isthmischen Einschnürung (Abb. 40B). Erst E3.5 kommt es erneut zu einer Expression von *cRPTPλ* im sich entwickelnden optischen Tektum in einem rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten. *In ovo* Elektroporation erlaubt nicht nur die räumliche Fehlexpression von Genprodukten (wie sie in den Abschnitten 4.5. - 4.8. angewendet wurde), sondern auch die zeitliche Fehlexpression. Durch diese *in vivo* Manipulation lässt sich also z.B. die Expression eines Genproduktes künstlich aufrechterhalten, obwohl die endogene Expression des entsprechenden Moleküls bereits beendet ist.

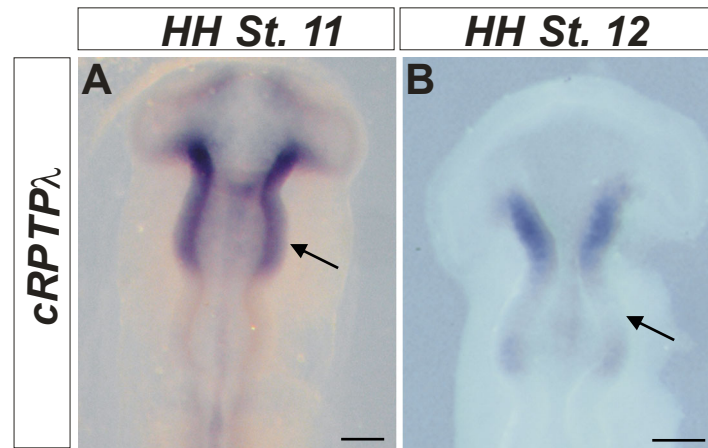


Abb. 40: Expression von *cRPTPλ* im Mesenzephalon. Während *cRPTPλ* im Stadium HH 11 im gesamten Mesenzephalon exprimiert wird (A), verkleinert sich die Expressionsdomäne bis zum Stadium HH 12 auf einen noch etwas diffusen Ring von Zellen an der Mittel- / Hinterhirngrenze (B). Das Mesenzephalon ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (A, B). Maßstab (A-B) 200 μ m.

Deshalb wurde in diesem Versuch *RPTPλ* mittels Mikroelektroporation im Entwicklungsstadium HH 9-10 im Mittelhirn überexprimiert und anschließend eine *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gegen *cMeis2* durchgeführt. *cMeis2* diente in diesem Versuch als Mittelhirnmarker, der den Unterschied zwischen elektroporierter rechter Seite und nicht-elektroporierter linker Seite sichtbar macht, da *cMeis2* im Tektum in einem dorso-ventral Expressionsgradient, nicht aber in der dorsalen Mittellinie exprimiert wird (Abschnitt 4.8.1.).

In diesem Experiment zeigte sich, dass eine künstliche Aufrechterhaltung der Expression von *RPTPλ* über das Entwicklungsstadium HH 11 hinaus, zu einer Missbildung des Mittelhirns führte (Abb. 41A, B; n = 15/16). Nach Fehlexpression von *RPTPλΔJM* (Abb. 41C, D; n = 6/6), einem Konstrukt, dem beide Phosphatasedomänen sowie die Juxtamembrandomäne fehlen, entwickelte sich hingegen das Mittelhirn im Vergleich zur Fehlexpression des Leervektors (Abb. 41E, F) normal. Fehlexpression von *RPTPλ* zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt, wenn die Expressionsdomäne von *RPTPλ* schon auf einen Streifen von Zellen am MHO verkleinert war, führte nicht zu einer Missbildung des Mittelhirns (Daten nicht gezeigt). Fehlexpression von *RPTPλ* hatte auf die Expression von *cMeis1/2* keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

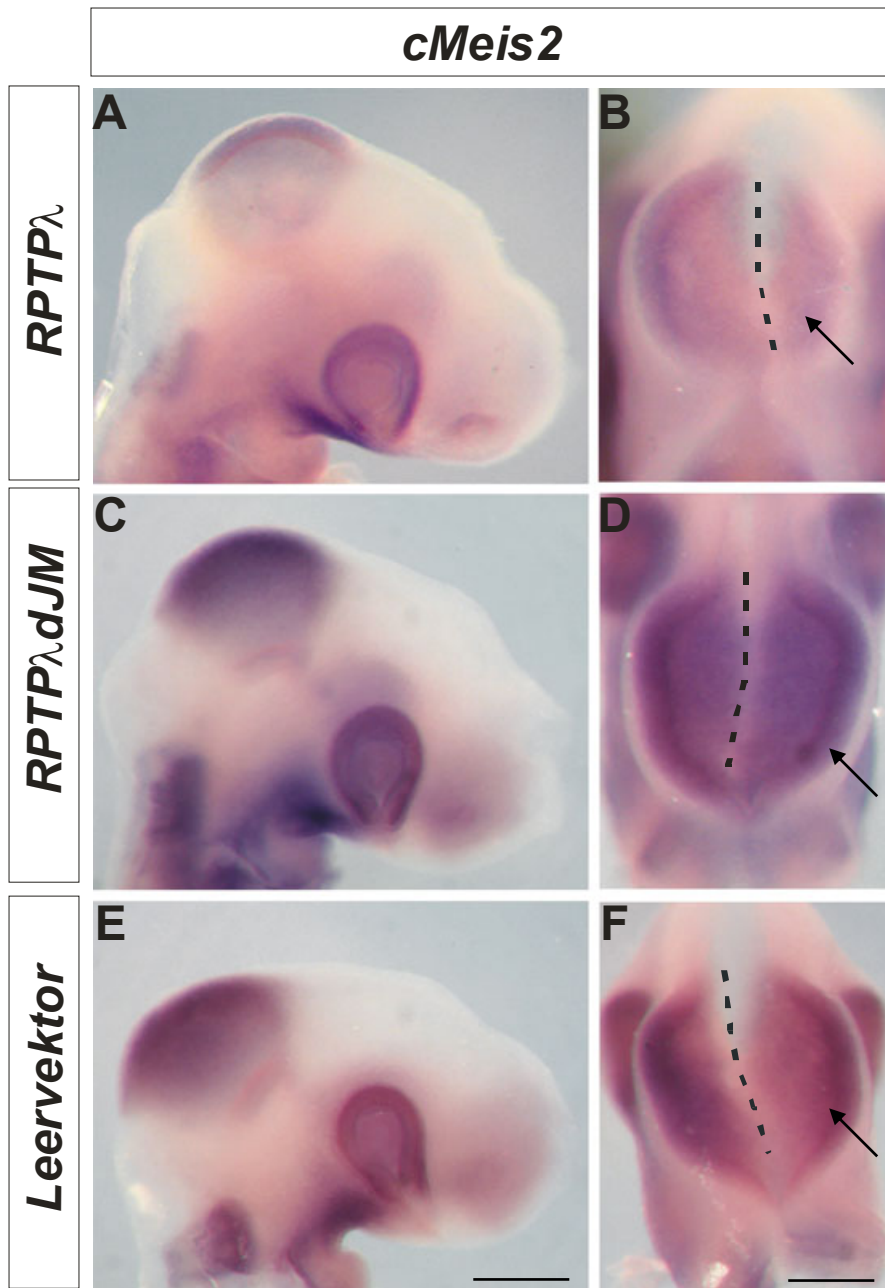


Abb. 41: Fehlexpression von *RPTP λ* , nicht aber *RPTP λ ΔJM* führt zu einem verkleinerten Mittelhirn. Expressionsmuster von *cMeis2* nach Fehlexpression von *RPTP λ* (A, B), *RPTP λ ΔJM* (C, D) oder des Leervektors (E, F) Stadium HH 10 im Mittelhirn. Die elektroporierte rechte Seite ist durch einen Pfeil und die dorsale Mittellinie des Mesenzephalons durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet (B, D, F). Maßstab: (A, C, E) 500 μm , (B, D, F) 200 μm .

4.9.2. Aufrechterhaltung der Expression von *RPTPλ* im Mittelhirn führt zu einer abgeschwächten Expression von β -Catenin

Die Verkleinerung des Mittelhirns nach Aufrechterhaltung der Expression von *RPTPλ* im Entwicklungsstadium HH 9-10 geht, im Vergleich zur Fehlexpression des Leervektors (Abb. 42B), mit einer verringerten Expression von β -Catenin einher (Abb. 42A; n = 5). Die Expression von *Wnt1* wird dadurch nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt; n = 6).

Fehlexpression von *RPTPλ* im Entwicklungsstadium HH 12 hingegen führt zu keiner Veränderung des Expressionsmusters von β -Catenin (Daten nicht gezeigt).

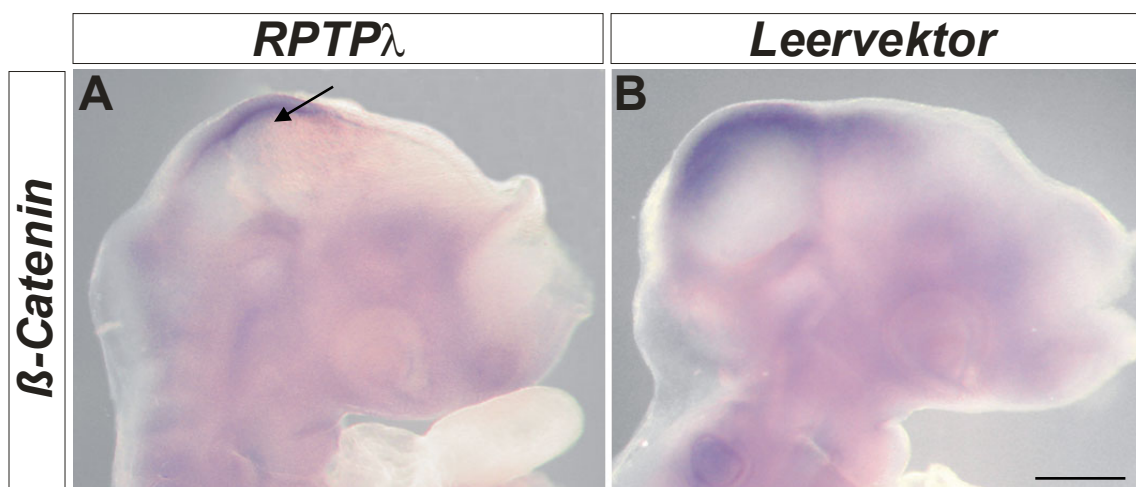


Abb. 42: Fehlexpression von *RPTPλ*, führt zu einer abgeschwächten Expression von β -Catenin. Expressionsmuster von β -Catenin nach Fehlexpression von *RPTPλ* (A) oder des Leervektors (B) Stadium HH 10 im Mittelhirn. Die Expression von β -Catenin ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (A). Maßstab: (A-B) 500 μ m.

4.9.3. Fehlexpression von *RPTPλ* im Mittelhirn führt zu keiner Modulation der Expressionsmuster von *ephrinB1*, *Otx2* oder *FgfR1*

Um zu untersuchen, ob eine Fehlexpression von *RPTPλ* im Mittelhirn auch eine Modulation der Expressionsmuster einiger bekannter Mittelhirnmarker bewirkt, wurde *RPTPλ* im Mesenzephalon im Entwicklungsstadium HH 12 mittels Elektroporation fehlexprimiert und anschließend wurden durch *in situ* Hybridisierung die Expressionsmuster von *ephrinB1*, *Otx2* und *FgfR1* analysiert.

Die EphB-Rezeptoren und ihre Liganden, die ephrinBs, spielen eine wichtige Rolle bei der molekularen Kontrolle des Axonwachstums bei der Kartierung der dorso-ventralen Achse und

auch zum Teil entlang der anterior-posterior Achse des Tektums (Hindges *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2002). Der Ligand *ephrinB1* wird im Tektum des Hühnchenembryos in einem dorso-ventral Gradienten, mit einer hohen Expression im dorsalen und einer niedrigen Expression zum ventralen Bereich hin exprimiert (Braisted *et al.*, 1997).

Fehlexpression von *RPTPλ* im Mittelhirn im Stadium HH 12 führte nicht zu einer Modulation des Expressionsmusters von *ephrinB1* (Abb. 43A; n = 5) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 43B).

Die Determinierung und Differenzierung des Mittelhirns erfolgt über das regulatorische Netzwerk einer großen Anzahl von Transkriptionsfaktoren, zu denen auch *Otx2* gehört. Die Expressionsdomäne von *Otx2* bedeckt das gesamte Mittel- und Zwischenhirn und bildet eine scharfe Grenze zum Hinterhirn, wo *Gbx2* exprimiert wird (Abschnitt 2.3).

Fehlexpression von *RPTPλ* im Mittelhirn im Stadium HH 12 führte jedoch nicht zu einer veränderten Expression von *Otx2* (Abb. 43C; n = 6) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 43D).

FgfR1 ist der einzige Fgf8-Rezeptor, der im Mittelhirn exprimiert wird (Walshe & Mason, 2000). Eine Inaktivierung von FgfR1 am MHO führte in der Maus zu einem Verlust des posterioren Mittelhirns und des anterioren Hinterhirns (Trokovic *et al.*, 2003; Abschnitt 2.4.). Zudem wurde gezeigt, dass Sef den Fgf8-Signalweg inhibieren kann, indem es an den FgfR1/2 bindet und so dessen Autophosphorylierung verhindert (Fürthauer *et al.*, 2002; Abschnitt 4.6.1.).

Fehlexpression von *RPTPλ* im Mittelhirn im Stadium HH 12 führte auch in diesem Versuch nicht zu einer veränderten Expression von *FgfR1* (Abb. 43E; n = 8) im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle (Abb. 43F).

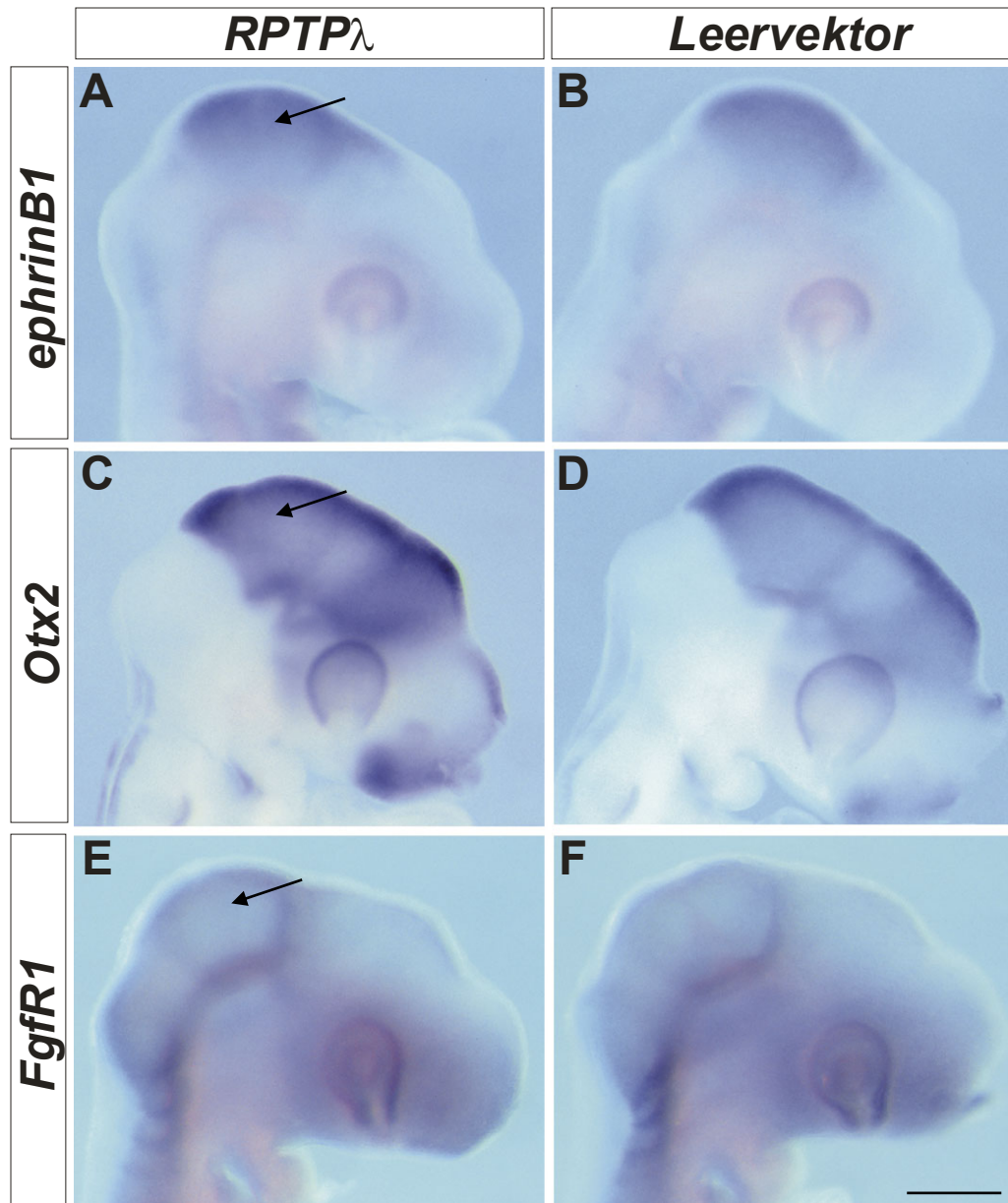


Abb. 43: Fehlexpression von *RPTPλ* im Mittelhirn führt nicht zu einer Änderung des Expressionsmusters von *ephrinB1*, *Otx2* oder *FgfR1*. Expressionsmuster von *ephrinB1* (A), *Otx2* (C) und *FgfR1* (E) nach Fehlexpression von *cRPTPλ* oder des *Leervektors* (B, D, F). Die Expressionsmuster sind im Mesenzephalon durch einen Pfeil gekennzeichnet (A, C, E). Maßstab: (A-F) 500 μ m.

4.9.3. *RPTPλ* bindet *in vivo* an β -Catenin

Es konnte schon gezeigt werden, dass die Juxtamembrandomäne des menschlichen Homologs von *cRPTPλ* (PCP2) mit β -Catenin *in vitro* interagiert und dass für diese Interaktion β -Catenin nicht phosphoryliert vorliegen muß (Wang *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2002). β -Catenin spielt im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle für die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung (Zechner *et al.*, 2003; Panhuysen *et al.*, 2004).

Da eine Aufrechterhaltung der Expression von *RPTPλ* in frühen Entwicklungsstadien zu einer Missbildung des Mesenzephalons führte, sollte der Nachweis für die Interaktion von *RPTPλ* und β -Catenin nun auch *in vivo* erbracht werden. Dafür wurde *RPTPλ-HA* in den Mittelhirnen von 5 Embryonen mittels Mikroelektroporation massiv fehlexprimiert. 24 Stunden später wurde das Gewebe der Mittelhirne lysiert und eine Immunpräzipitation mit einem α -HA Antikörper durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde anschließend mittels Western Blot unter Verwendung eines α - β -Catenin Antikörpers und anschließender Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass *RPTPλ-HA* auch *in vivo* mit β -Catenin interagiert (Abb. 44). Der Nachweis von *RPTPλ-HA* erfolgte mittels α -HA Antikörper. Als Expressionskontrolle wurden 10 μ l des Gewebelysats mittels Western Blot analysiert. β -Catenin hat eine Größe von 95 kD und *RPTPλ* eine Größe von 180 kD.

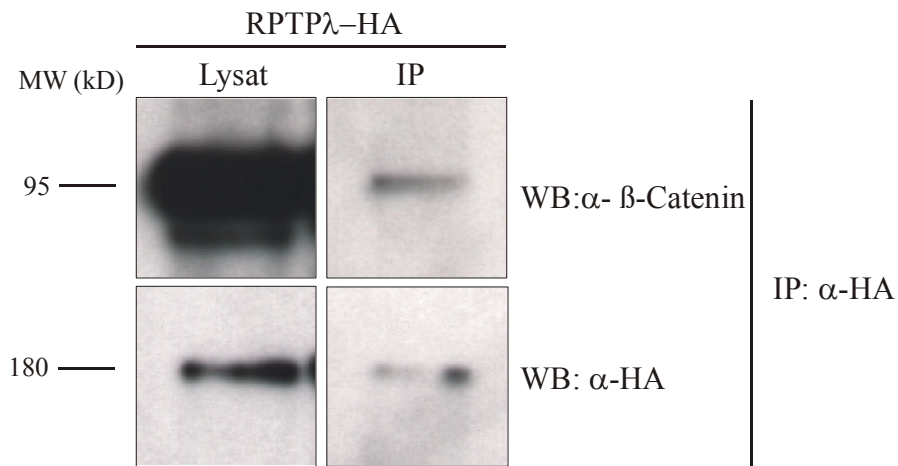


Abb. 44: Immunpräzipitation (IP): *RPTPλ* interagiert *in vivo* mit β -Catenin. *RPTPλ-HA* wurde im Mittelhirn fehlexprimiert. Das Gewebe wurde 24 Stunden nach der Elektroporation lysiert und eine Immunpräzipitation mit einem α -HA Antikörper durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde mittels Western Blot unter Verwendung eines α - β -Catenin Antikörpers und anschließender Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. β -Catenin ist 95 kD groß. Der Nachweis von *RPTPλ* erfolgte mittels α -HA Antikörper. *RPTPλ* ist 180 kD groß. Als Expressionskontrolle wurden 10 μ l des Gewebelysats mittels Western Blot analysiert.

5. Diskussion

Auf der Suche nach neuen Genen, die in Vorläuferzellen der Hühnerretina exprimiert werden, wurde das Huhn-Homolog der Rezeptor Tyrosin Phosphatase λ aus der Maus identifiziert (Fuchs *et al.*, 1998). *cRPTP λ* ist eine Typ IIb Rezeptor-ähnliche Protein Tyrosin Phosphatase. Bislang ist unklar, ob RPTPs als Liganden, Rezeptoren oder Komponenten von Rezeptorkomplexen in der Entwicklung und Differenzierung des ZNS eine Rolle spielen. Ziel dieser Arbeit war es demnach, durch Analyse der Expression und Regulation von *cRPTP λ* Einblicke in die Funktion dieser RPTPs und die dabei beteiligten Signalkaskaden zu bekommen.

5.1. Expression der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ in der Mittel- / Hinterhirnregion

Um Aufschluss über das räumliche und zeitliche Expressionsmuster der Rezeptor-ähnlichen Protein Tyrosin Phosphatase λ (RPTP λ) im Hühnerchen zu erlangen, wurde eine Expressionsanalyse in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung durchgeführt. Es zeigte sich, dass *cRPTP λ* bereits im Stadium HH 5 (etwa 20 Stunden nach Beginn des Bebrütens) schwach in der Kopffalte exprimiert wird. Am embryonalen Tag 1 (Stadium HH 9) erstreckte sich die Expression über das Zwischen- und Mittelhirn, sowie über die Bodenplatte des Neuralrohrs. Die Expression des Mittelhirns reicht zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht bis zur Einschnürung des Isthmus. Im Stadium HH 11 (E1.5) zeigt die Expression eine scharfe Grenze anterior der Einschnürung des Isthmus und überlappt mit dem molekularen Mittel- / Hinterhirnorganisator (MHO), welcher die Musterbildung der angrenzenden Hirnregionen kontrolliert (Abb. 13E). Nur etwa 2 Stunden später, im Stadium HH 12, reduziert sich die Expressionsdomäne von *cRPTP λ* im Mittelhirn auf einen diffusen Ring von Zellen am MHO (Abb. 15C). Am Tag E2.5 beschränkt sich die Expression auf einen deutlich abgegrenzten Zellstreifen, welcher anterior der *Wnt1*-Domäne und der Einschnürung des Isthmus liegt, sowie auf einen Bereich im ventralen Mittelhirn (Abb. 13I, 14A). Am Tag E3.5 wird *cRPTP λ* auch weiterhin in diesem deutlich abgegrenzten Ring von Zellen am molekularen MHO und zusätzlich im sich entwickelnden optischen Tektum in einem rostral (hoch) zu kaudal (niedrig) verlaufenden Gradienten exprimiert (Abb. 14B, 45). Es besteht die Möglichkeit, dass *cRPTP λ* einen Einfluss auf die zeitliche Entwicklung der zellulären Struktur des Tektums hat, da dieser Gradient gegensätzlich zum

Expressionsgradienten von *Engrailed-1* und *Engrailed-2*, oder dem von *ephrinA2* / *ephrinA5* verläuft (Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.* 1995; Logan *et al.* 1996; Abb. 45).

Ab E5 deckt sich der kaudal zu rostral verlaufende Expressionsgradient von *Engrailed* (*En*) mit einem ausgeprägten Unterschied in der zellulären Struktur des Tektums. Das rostrale Tektum differenziert schneller, ist generell dicker und besitzt mehr Schichten, als das kaudale Tektum (LaVail & Cowan, 1971). Logan *et al.* (1996) hatten gezeigt, dass nach Überexpression von *En-1* im gesamten Tektum dieser Unterschied in der Wanddicke des rostralen und kaudalen Tektums aufgehoben war. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die *En*-Expression die Ausbildung der zellulären Struktur des Tektums beeinflussen kann.

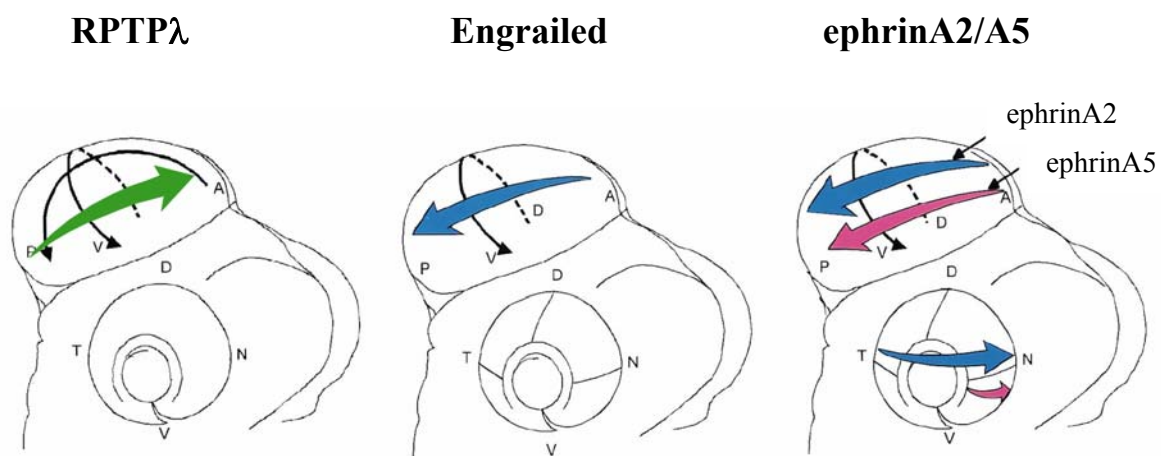


Abb. 45: Schematische Zusammenfassung der Expression von *RPTPλ*, *Engrailed* und *ephrinA2/A5* im Tektum. Zunehmend dicker werdende Pfeile kennzeichnen den Verlauf zunehmender Gradienten. Verschiedene Farben der Pfeile symbolisieren Koexpression. (Modifiziert nach Thanos & Mey, 2001).

Rotations- und Transplantationsexperimente des Neuralrohres im Bereich des Mittelhirns haben zudem gezeigt, dass eine direkte Verbindung zwischen dem Expressionsmuster von *En-2* und der Entstehung der retinotopen Karte besteht. Über die retinotektale Projektion erhält das optische Tektum direkte Eingänge aus der Retina. Bei Transplantation des dorsalen Mittelhirns, der Alarplatte, ins Zwischenhirn im gleichen Embryo, kam es im ektopisch induzierten Tektum zu einem Expressionsgradienten von *En-2*, der im Gegensatz zum normalen Expressionsmuster ein umgekehrtes Muster zeigte. Hier war die Expression von *En-2* im anterioren Bereich hoch und im posterioren Bereich niedrig. Dieses spiegelbildliche Expressionsmuster hatte zur Folge, dass weitere Entwicklungsschritte des transplantierten Tektums auch in einem umgekehrten Muster abliefen (Ichijo *et al.*, 1990). Dabei zeigte sich, dass die Entwicklung der retinotopen Karte vom *En*-Gradienten abhängig ist. Die Axone der temporalen Retina projizierten weiterhin in den posterioren Bereich des transplantierten

Tektums, wo *En-2* am niedrigsten exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu projizierten die Axone der nasalen Retina in den anterioren Bereich des Tektums, der die höchste Expression von *En-2* aufwies (Itasaki *et al.*, 1991; Itasaki & Nakamura 1992, 1996). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Überexpression von *cRPTPλ* am MHO nach 24 Stunden keinen Einfluss auf die Expression von *En-1* hat (Abb. 28). *En-1* und *En-2* werden beide durch Fgf8 reguliert und stellen funktionelle Äquivalente dar (Crossley *et al.*, 1996; Hanks *et al.*, 1998). Obwohl also die Expressionsgradienten von *cRPTPλ* und *En-2* spiegelbildlich verlaufen, kann davon ausgegangen werden, dass *cRPTPλ* seine Funktion im Mittelhirn nicht über eine Änderung der Expression von *Engrailed* ausübt.

Die Expression von *cRPTPλ* am Tag E3.5 verläuft auch spiegelbildlich zu der von *EphrinA2* und *ephrinA5*, die als Liganden von EphA-Rezeptoren an der Entstehung der retinotopen Karte entlang der anterioren-posterioren (AP) Achse beteiligt sind (Frisen *et al.*, 1998; Feldheim *et al.*, 2000). *ephrinA2* / *ephrinA5* werden im optischen Tektum in einem AP-Gradienten exprimiert, wobei die Konzentration beider ephrine am posterioren Pol des optischen Tektums am höchsten ist und nach anterior hin abnimmt (Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.*, 1995; Abb. 45). Bei Bindung des EphA-Rezeptors an seine Liganden kommt es zu einer Abstoßungsreaktion. So werden die Axone der temporalen Retina, welche EphA-Rezeptoren stark exprimieren, daran gehindert, den posterioren Bereich des optischen Tektums zu innervieren, da hier die Expression an *ephrinA2* bzw. *ephrinA5* am höchsten ist (Walter *et al.*, 1987; Monschau *et al.*, 1997; Feldheim *et al.*, 1998; Yates *et al.*, 2001).

In Mäusen wurde E10.5 (entspricht Hühnchen E3) ein weiteres Molekül in einem rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten im sich entwickelnden Tektum nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um das *ephA8/EEK* Gen, welches zur Familie der Eph Rezeptor Protein Tyrosin Kinasen gehört. Es wird angenommen, dass dieser Rezeptor während der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle bei der axonalen Wegfindung spielt (Park *et al.*, 1997). Die Expressionsgradienten von *cRPTPλ* und *EphA8* könnten im Mesenzephalon überlappen. Ob *cRPTPλ* allerdings an der Entwicklung der retinotektalen Karte, über Einflussnahme der Expression von *ephrinA2/A5* oder *EphA8* beteiligt ist, ist momentan noch unklar.

Der rostral zu kaudal verlaufende Gradient von *RPTPλ* im Mesenzephalon spiegelt jedoch den Differenzierungsgradienten von tektalen Neuronen wieder. So wurde z.B. auch für das „Helix-loop-Helix“-Gen *Hes5* im Hühnchen ein rostral zu kaudal verlaufender Expressionsgradient im Mesenzephalon beschrieben (Kimura *et al.*, 2004). *Hes5* und *Hes1*, welches im Isthmus exprimiert wird, sind Bestandteile des Notch-Signalweges, der Zellen in

undifferenziertem Zustand hält (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Gaiano & Fishell, 2002; Hitoshi *et al.*, 2002; Honjo, 1996; Kageyama & Nakanishi, 1997; Selkoe & Kopan, 2003). Hatakeyama *et al.* (2004) konnten nachweisen, dass *Hes*-Gene eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Gehirnstrukturen in richtiger Größe, Form und Zell-Arrangement spielen, indem sie den Pool neuronaler Vorläuferzellen aufrechterhalten. Sie hatten gezeigt, dass die Zelldifferenzierung in *Hes1^{-/-}/ Hes5^{-/-}* Mäusen beschleunigt wird und somit zu einer verringerten Anzahl von radialen Gliazellen führt. Dies resultiert in einer strukturellen Fehlbildung des Nervensystems.

cRPTPλ könnte somit eventuell über den Notch-Signalweg eine potentielle Funktion in der Förderung der Zelldifferenzierung zukommen. Um zu untersuchen, ob es einen Einfluss auf die zelluläre Struktur des Tektums ausübt, müsste die Expression von *cRPTPλ* mit Hilfe eines Replikations-kompetenten Virus dauerhaft im Mesenzephalon aufrechterhalten werden, denn *in ovo* Elektroporation führt nur für wenige Tage zur Fehlexpression. Dies ist allerdings problematisch, da *cRPTPλ* zu groß ist, um z.B. in RCAS-Viruspartikeln verpackt zu werden.

5.2. Expression von *cRPTPλ* im Auge

Im Stadium HH 14 (E1.5) wird *cRPTPλ* im Auge stark in den zukünftigen Epithelzellen, einer äquatorialen Region der Linse und in der inneren Schicht des Augenbeckers exprimiert, aus der sich die neurale Retina entwickeln wird. Im Stadium HH 22 (E3) können Transkripte von *cRPTPλ* ebenfalls in der Linse und im retinalen Neuroepithelium nachgewiesen werden (Abb. 17). Am Tag E6.5 und E7.5 wird *cRPTPλ* weitläufig in der gesamten Retina exprimiert. Expression von *cRPTPλ* fehlte nur in einer kreisförmigen zentralen Domäne, die sich nasal der Austrittsstelle des optischen Nervs befindet, sowie in einem diffusen Band von Zellen entlang des horizontalen Meridians. Dieses Muster erinnert an die Form und Lage der späteren Stäbchen-freien *aerea centralis* und dem horizontal verlaufenden Streifen, der dem Bereich geringer Stäbchendichte in der ausgereiften Retina entspricht (Bruhn und Cepko, 1996).

Am Tag E3 könnten die Expressionen von *cRPTPλ* und *Fgf8* in der zentralen Netzhaut überlappen (Abb. 17; Vogel-Höpker *et al.*, 2000; Martinez-Morales, 2005). Am Tag E6.5 hingegen ist die Expression von *cRPTPλ* mit der von *Fgf8* in der Retina komplementär. *Fgf8* wird zu diesem Zeitpunkt in der Retina nur in einer kreisförmigen zentralen Domäne, sowie in einem diffusen Band von Zellen entlang des horizontalen Meridians exprimiert, welche in der

Expression von *cRPTPλ* ausgespart sind (D. Schulte, persönliche Kommunikation; schematische Darstellung Abb. 46). Dieses Expressionsmuster erinnert stark an die Expressionsdomänen von *cRPTPλ* und *Fgf8* am MHO. Auch dort werden beide Moleküle von benachbarten, aber nicht überlappenden Zellgruppen gebildet. *Fgf8* bildet in der Netzhaut ein Signalzentrum aus, welches die Differenzierung von retinalen Ganglienzellen initiiert (Martinez-Morales *et al.*, 2005). E7.5 geht die Expression von *cRPTPλ* weiter zurück und scheint dabei einem zentralen zu peripheren Gradienten zu folgen, welcher den Gradienten der Zelldifferenzierung in der Retina widerspiegelt. Zu diesem Zeitpunkt konnten *cRPTPλ* spezifische Transkripte in einer weiten Domäne von Zellen im Zentrum des retinalen Neuroepitheliums, nicht aber in der Ganglienzellschicht oder der äußeren nuklearen Schicht nachgewiesen werden (Abb. 17). Die Domäne im Neuroepithelium entspricht der ventrikulären Zone, in der sich die Zellkörper der retinalen Vorläuferzellen befinden.

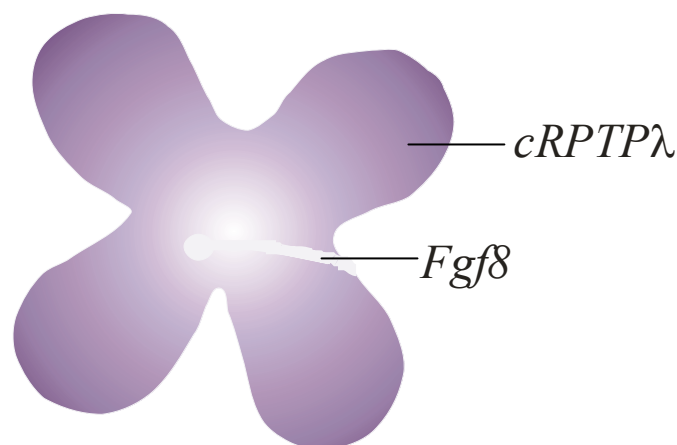


Abb. 46: Schematische Darstellung der komplementären Expression von *cRPTPλ* und *Fgf8* E6.5 in der Netzhaut des Hühnchens.

Es besteht die Möglichkeit, dass *cRPTPλ* in den kanonischen Signalweg eingreift und die Proliferation dieser Vorläuferzellen in der Netzhaut beeinflusst (siehe auch Abb. 54). Retinale Vorläuferzellen exprimieren eine Reihe von Wnt-Proteinen und Wnt-Rezeptoren (D. Schulte, persönliche Kommunikation). Einen ersten Hinweis auf die Bedeutung dieser Proteine für die Proliferation von retinalen Vorläuferzellen lieferten Kubo *et al.* (2003). Sie konnten zeigen, dass *Wnt2b* in der Marginal-Zone der Retina exprimiert wird, welche zwischen der neuralen Retina und dem ziliaren Epithel lokalisiert ist. Bei Vertebraten enthält die ziliare Marginal-Zone (CMZ) der Netzhaut undifferenzierte Vorläuferzellen, welche während der Embryonalentwicklung fortlaufend proliferieren und neue Neurone und Gliazellen hervorbringen (Perron & Harris, 2000; Reh & Levine, 1998). In der CMZ wird neben *Wnt2b* auch *Lef1* exprimiert (Kubo *et al.*, 2003). Und auch Transkripte von *β-Catenin* konnten

ubiquitär in der Netzhaut nachgewiesen werden (D. Schulte, persönliche Kommunikation). Sowohl Lef1, als auch β -Catenin sind wesentliche Bestandteile des kanonischen Signaltransduktionsweges (Abschnitt 2.5). Überexpression von *Wnt2b* in der zentralen Netzhaut inhibierte neuronale Differenzierung und induzierte Marker von Vorläuferzellen (Kubo *et al.*, 2003). Wurde der Wnt-Signalweg hingegen mit Hilfe eines dominant-negativen Konstruktes von Lef1 unterdrückt, so wurde die Proliferation der Zellen in der CMZ gehemmt und führte zu einer vorzeitigen Differenzierung dieser Zellen (Kubo *et al.*, 2003). In *Xenopus laevis* konnte zudem gezeigt werden, dass Unterdrückung des Wnt-Rezeptors Frizzled-5 in den optischen Vesikeln zu einer reduzierten Zellzahl und einer verminderten Mitose führt (Van Raay *et al.*, 2005). Diese Kenntnisse weisen zusammengenommen darauf hin, dass in der Netzhaut der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg die Proliferation reguliert.

Von Yan *et al.* (2002) konnte bereits eine Bindung des menschlichen Homologs von *cRPTP λ* , welches *PCP-2* genannt wird, an β -Catenin nachgewiesen werden (siehe auch im Folgenden S. 121). Durch diese Bindung könnte *cRPTP λ* die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen in der Netzhaut beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass *PCP-2* auch in der embryonalen Retina exprimiert wird. Eine starke Expression konnte hier in fötaler menschlicher Retina in den fötalen Wochen (FWK) 12.5-18.5, nicht aber in Gewebe adulter menschlicher Retina nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass *PCP-2* in der Retina hauptsächlich eine Funktion während der Entwicklung zukommt.

5.3. Regulation von *cRPTP λ* am Mittel- / Hinterhirn Organisator

cRPTP λ wird am MHO anterior der sezernierten Proteine Wnt1 und Fgf8 exprimiert, wobei die Expressionsdomänen von *cRPTP λ* und *Wnt1* möglicherweise überlappen (Abb. 16). Um der Fragestellung nachzugehen, wie sich das Molekül *cRPTP λ* in das Modell der genetischen Interaktionen am MHO eingliedert, wurden *Fgf8* und eine Reihe von Moleküle, die von Fgf8 reguliert werden, am MHO und im kaudalen Mittelhirn überexprimiert. Hierbei wurde es zu Nutze gemacht, dass Fgf8 in der Lage ist, die Aktivität des MHO nachzuahmen (Crossley *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999). Anschließend wurde die Expression von *cRPTP λ* analysiert. Crossley *et al.* (1996) hatten bereits gezeigt, dass Fehlexpression von *Fgf8* im Dienzephalon, Mesenzephalon oder Rhombenzephalon zur ektopischen Expression vieler Mittel- / Hinterhirnmarker, wie z.B. *Wnt1*, führt (Abb. 21). Die Untersuchungen dieser Arbeit

ergaben, dass ektopische Expression von *Fgf8* im Mittelhirn auch Expression von *cRPTPλ* induziert (schematische Darstellung, Abb. 47). Dabei schienen die Expressionen von *cRPTPλ* und *Wnt1* rostral der ektopischen Expressionsdomäne von *Fgf8* lokalisiert zu sein (Abb. 21).

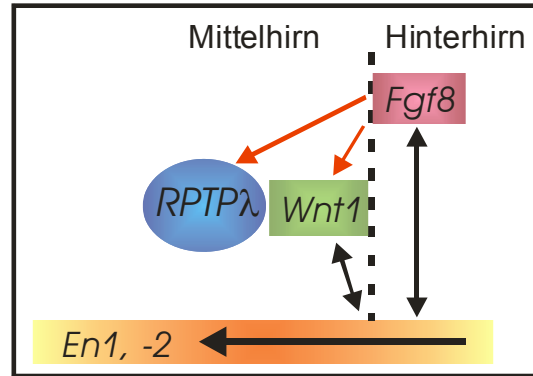


Abb. 47: Schematische Darstellung der Induktion von *Wnt1* und *cRPTPλ* nach ektopischer *Fgf8b*-Expression (rote Pfeile).

Ektopische Expression von *Fgf8* führt auch zu einer Induktion des Lim-Homeobox Protein 1 (*Lmx1b*) im Mittelhirn (Matsunaga *et al.* 2002). Diese Induktion scheint in einem deutlich abgegrenzten Streifen in benachbarten Zellen der *Fgf8*-exprimierenden Zellen zu erfolgen (Abb. 23). Adams *et al.* (2000) hatten gezeigt, dass ektopische Expression von *Lmx1b* im Mesenzephalon, auch nachdem die *Fgf8*-Expression dort bereits zurückgegangen war, die Expression von *Wnt1* aufrechterhält. Matsunaga *et al.* (2002) zeigten daraufhin, dass eine ektopische Expression von *Lmx1b* und/oder *Wnt1* zu einem vergrößerten Tektum und Cerebellum führt. Dabei wurde *Fgf8* in den Zellen, die *Lmx1b* fehlexprimieren, unterdrückt, aber in den Nachbarzellen induziert (Abb. 48). Sie schlussfolgerten, dass *Lmx1b* an einer nicht Zell-autonomen Induktion der *Fgf8*-Expression durch *Wnt1* beteiligt sein könnte.

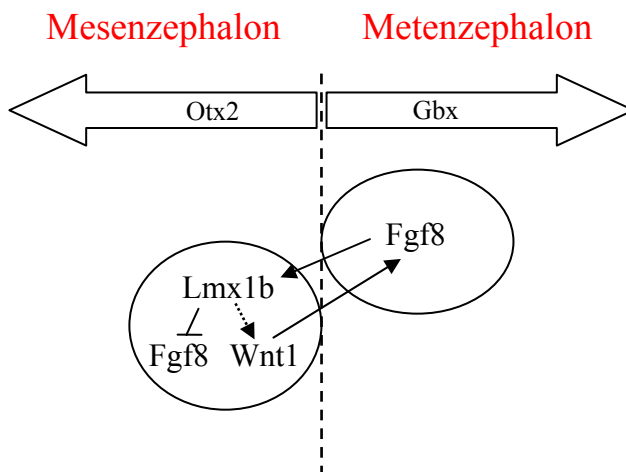


Abb. 48: Nicht Zell-autonome Induktion von *Wnt1* unter Beteiligung von *Lmx1b*. In Zellen, die *Lmx1b* exprimieren, wird die Expression von *Wnt1* aufrechterhalten, aber die von *Fgf8* unterdrückt. *Wnt1* induziert nicht Zell-autonom Expression von *Fgf8*.
 → Induktion;→ Aufrechterhaltung;
 -→ Unterdrückung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Überexpression von *Lmx1b* am MHO *cRPTPλ*-Expression induziert. Da die wildtypischen Expressionsdomänen von *cRPTPλ* und *Lmx1b* am MHO jedoch nicht ganz zu überlappen scheinen, muss davon ausgegangen werden, dass *cRPTPλ* nicht ausschließlich durch *Lmx1b*, sondern auch durch ein sezerniertes Protein induziert werden kann. Fehlexpression von *Wnt1* war nicht in der Lage, Expression von *cRPTPλ* zu initiieren (Abb. 19). Es ist daher zu vermuten, dass es sich bei dem *cRPTPλ*-induzierenden, sezernierten Protein um Fgf8 handeln könnte (Abb. 26; schematische Darstellung Abb. 49).

Es ist auffällig, dass sich die ektope Expression von *cRPTPλ* nach Überexpression von *Fgf8* oder *Lmx1b* mittels Elektroporation unterscheidet. Nach Überexpression von *Fgf8* verschiebt sich die Expressionsdomäne von *cRPTPλ* weit rostral in das Mittelhirn hinein (Abb. 21). Zellen, die Fgf8 bilden, scheinen nicht in der Lage zu sein, *cRPTPλ* zu exprimieren. Da es sich bei Fgf8 um einen sezernierten Faktor handelt, wird die Induktion von *cRPTPλ* durch Zell-Zell-Kommunikation bewirkt und erfolgt demnach nicht Zell-autonom. Im Gegensatz dazu wird *cRPTPλ* nach Überexpression von *Lmx1b* in unmittelbarer Nähe des MHO induziert (Abb. 24). Da es sich bei *Lmx1b* um einen Transkriptionsfaktor handelt, erfolgt hier die Induktion von *cRPTPλ* durch *Lmx1b* Zell-autonom.

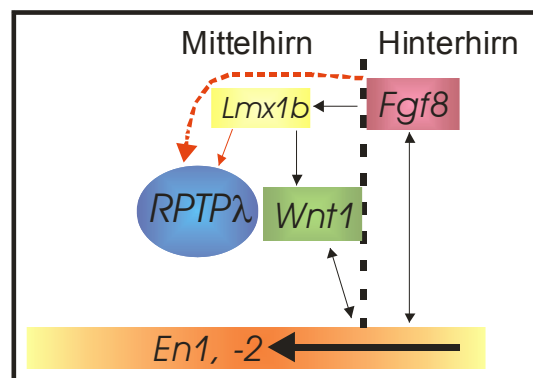


Abb. 49: Schematische Darstellung der Induktion von *cRPTPλ* nach Überexpression von *Lmx1b* (roter Pfeil). Expression von *cRPTPλ* kann aber auch direkt durch *Fgf8* induziert werden (roter, gestrichelter Pfeil).

Ektope Expression von *cRPTPλ* konnte nach Überexpression von *Lmx1b* nur im Mesenzephalon, innerhalb der *Otx2*-Expressionsdomäne, nicht aber im Rhombenzephalon, innerhalb der *Gbx2*-Expressionsdomäne, nachgewiesen werden (Abb. 24). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Induktion von *cRPTPλ* durch *Lmx1b* der gleichzeitigen Expression von *Otx2* bedarf. In *Drosophila melanogaster* wird *otd*, dem Homolog der *Otx1* und *Otx2*

Gene, im anterioren Kopf-Neuromer exprimiert. Mutation von *otd* führte zum Verlust eines Großteils des anterioren Kopf-Neuromers (Finkelstein & Perrimon, 1990). In Mausembryonen ähnelt das Expressionsmuster von *Otx1* und *Otx2* auffallend dem des Pendantes aus *Drosophila melanogaster*. *Otx* Gene sind also Teil eines evolutiv konservierten Kontrollsystems im Gehirn, welches anteriore Eigenschaften im ZNS festlegt (Lumsden und Krumlauf, 1996; Reichert und Simone, 1999). Somit liefert die Beobachtung, dass *cRPTPλ* von *Lmx1b* nur innerhalb der *Otx2*-Domäne induziert werden kann, ein weiteres Indiz für die Existenz eines Kontrollsystems, das Mesenzephalon-spezifische Charakteristika unter Beteiligung von *Otx* aufrechterhält.

Implantationen von Fgf8 Protein getränkten Acryl-Kügelchen in die laterale Wand des kaudalen Mesenzephalons führten zur ektopischen Expression von *Fgf8* (schematische Abb. 22A). Ektopisches *Fgf8* wiederum induziert *Wnt1* in direkter Nähe zum Acryl-Kügelchen, während *cRPTPλ*-Expression in einem Ring von Zellen außerhalb der ektopischen *Wnt1*-Domäne beobachtet wurde (Abb. 22). Das räumliche Verhältnis der künstlich hervorgerufenen Expressionen von *Fgf8*, *Wnt1* und *cRPTPλ* um das Fgf8 Protein getränkte Acryl-Kügelchen herum, simulieren somit deren normale Expressionsdomänen am MHO (schematische Darstellung Abb. 50A). Dies lässt vermuten, dass für die Induktion der *Wnt1*-Expression eine höhere Fgf8-Konzentration nötig sein könnte, als für die Induktion der *cRPTPλ*-Expression (schematische Darstellung Abb. 50B).

Um der Frage nachzugehen, ob es eine bestimmte Konzentration von Fgf8 gibt, die Expression von *cRPTPλ*, nicht aber *Wnt1* induzieren kann, wurden bereits Acryl-Kügelchen, die in unterschiedlichen Konzentrationen von Fgf8-Protein getränkt wurden, ins Mesenzephalon implantiert. Anschließend wurde die Expression von *Wnt1* bzw. *cRPTPλ* mittels *in situ* Hybridisierung analysiert. Um Acryl-Kügelchen herum, die in 0,015 µg/µl Fgf8 Protein statt der allgemein üblichen 0,15 µg/µl Fgf8 Protein getränkt wurden, wurde sowohl eine Expression von *Wnt1*, als auch *cRPTPλ* induziert. Somit wurde der für diesen Versuch nötige Konzentrationsbereich bereits eingengt, aber noch nicht endgültig bestimmt (Daten nicht gezeigt).

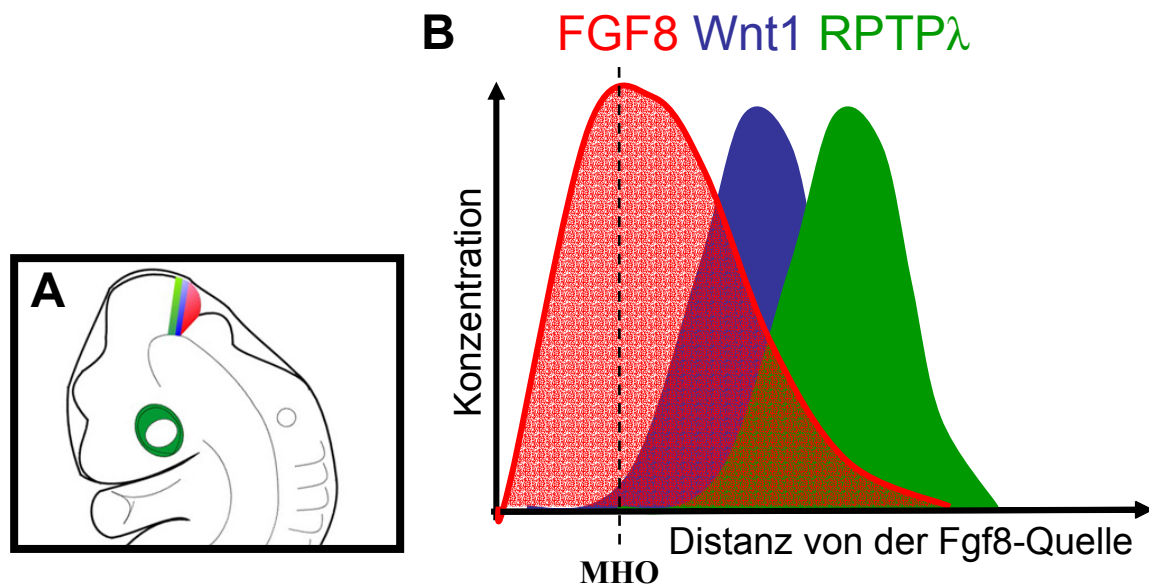


Abb. 50: Modell der Fgf8-konzentrationsabhängigen Expression von Wnt1 und RPTPλ. (A) Wildtypische Expressionsdomänen von RPTPλ, Wnt1 und Fgf8 am MHO. (B) Darstellung der konzentrationsabhängigen Expression von Fgf8, Wnt1 und RPTPλ in Relation zur Entfernung von der Fgf8-Quelle. RPTPλ (grün), Wnt1 (blau), Fgf8 (rot); MHO (gestrichelte Linie).

Überexpression von *Wnt1* im Mittelhirn induziert keine ektopische Expression von *cRPTPλ* (Abb. 19). Somit ist *cRPTPλ* kein Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Zu den direkten Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zählen z.B. der Zellzyklusregulator *Cyclin D1* und das Proto-Onkogen *c-myc* (He et al., 1998; Tetsu und McCormick, 1999). Über die Steuerung dieser Gene nimmt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg Einfluss auf die Zellproliferation. Basierend auf dem Mechanismus, der zur Genaktivierung führt, kann man zwischen direkten und indirekten Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges unterscheiden. Direkte Zielgene enthalten funktionelle LEF/TCF-Bindestellen in den regulatorischen Sequenzen und werden von TCF/ β -Catenin-Komplexen reguliert. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung indirekter Zielgene nicht über TCF/ β -Catenin-Komplexe, sondern über andere Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls Wnt-abhängig reguliert werden. Es wurden schon einige Zielgene von Wnt identifiziert³. Dazu gehören neben *Cyclin D1* und *c-myc* auch *Lef1* (Hovanes et al., 2001; Filali et al., 2002) und *Tcf-1* (Roose et al., 1999).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Expressionsmuster von *cRPTPλ* dem von *CEPU-1* auffallend ähnelt. Das Zell-Adhäsionsmolekül CEPU-1 gehört zu der Familie der IgLONs und besitzt drei Ig-Domänen (Jungbluth et al., 2001, Kimura et al., 2001). Membrangebundenen IgLONs, einer Familie der Immunoglobulin Superfamilie, wird

³ <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>

während der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle bei der axonalen Wegfindung und der Zell-Zell-Erkennung zugeschrieben (Gil *et al.*, 1998; Marg *et al.*, 1999).

RPTPλ und *CEPU-1* werden im Stadium HH 15 in einem scharfen Ring von Zellen anterior der isthmischen Einschnürung exprimiert (Abb. 15). Betrachtet man jedoch deren Expressionsmuster in früheren Entwicklungsstadien, so sieht man, dass sich die Expression von *CEPU-1* im Stadium HH 11 weit über den molekularen MHO und die isthmische Einschnürung erstreckt, während die Expression von *cRPTPλ* hingegen in keiner der in dieser Arbeit untersuchten Entwicklungsstadien die Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn kreuzt. Dies weist darauf hin, dass die Expressionen von *cRPTPλ* und *CEPU-1* durch unterschiedliche molekulare Mechanismen kontrolliert werden. Möglicher Weise verhindert ein Faktor in der Mittel- / Hinterhirnregion, dass *cRPTPλ* die isthmische Einschnürung kreuzt, während dieser Faktor die Expression von *CEPU-1* nicht beeinflusst.

Weitere Versuche zeigten, dass auch *CEPU-1* von *Fgf8*, nicht jedoch von *Wnt1* reguliert wird (Abb. 19, 21). Nach Überexpression von *Fgf8* konnte beobachtet werden, dass *CEPU-1* in einem scharf abgegrenzten Streifen im Mittelhirn ektopisch exprimiert wurde. Überexpression von *RPTPλ* am MHO führte hingegen nicht zu einer Induktion von *CEPU-1*. Ebenso führte Überexpression von *CEPU-1* nicht zu einer Induktion von *cRPTPλ* (Abb. 18 und Daten nicht gezeigt). *cRPTPλ* und *CEPU-1* beeinflussen also nicht ihre gegenseitige Expression. Aufgrund der Ig-Domänenstruktur von *cRPTPλ* und *CEPU-1* besteht jedoch die Möglichkeit, dass beide Moleküle als gegenseitige Bindungspartner in Frage kommen und unter Umständen gemeinsam Zell-Adhäsion vermitteln können.

5.4. Funktion von *cRPTPλ* am Mittel- / Hinterhirn Organisator

Bei *cRPTPλ* handelt es sich um eine Typ IIB Rezeptor Protein Tyrosin Posphatase. Aufgrund der Struktur von *cRPTPλ* ist es möglich, dass dieses Protein als Rezeptor wirken kann, jedoch wurden bislang keine potentiellen Liganden identifiziert. *cRPTPλ* besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, die eine MAM-, eine Ig- sowie vier Fibronectin-Typ III-Domänen enthält. Die extrazelluläre Domäne wird von einer kurzen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Juxtamembrandomäne gefolgt. Am C-terminus des Proteins befinden sich zwei Protein Tyrosin Phosphatasedomänen, die vermutlich die Dephosphorylierung von nachgeschalteten Proteinen vermitteln (Abb. 9). Damit könnte *cRPTPλ* in Tyrosin-Kinase Signalwege eingreifen. Protein-Tyrosin-Phosphorylierung ist *in*

in vivo ein sehr dynamischer Prozess, der durch die antagonistische Wirkung von Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Phosphatasen reguliert wird. Da die Funktion von Fgf8 durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen vermittelt wird (Johnson & Williams, 1993), war eine zentrale Hypothese dieser Arbeit, dass *cRPTPλ* das Fgf8-Signal am MHO modulieren kann (schematische Darstellung Abb. 51). Überexpressionsstudien haben gezeigt, dass *RPTPλ* keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von *Fgf8* oder einer Reihe von Faktoren, die von Fgf8 reguliert werden, hat (Abb. 27, 28, 29). So wird z.B. der Transkriptionsfaktor Pax-2, welcher als eines der ersten Proteine am MHO exprimiert wird und zusammen mit Fgf8 einen positiven Rückkoppelungskreislauf aufrechterhält, ebenfalls nicht durch *RPTPλ* reguliert (Sato *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2006; Abb. 28). Inversionsexperimente des antero-posterioren Neuroepitheliums des Mesenzephalons zeigten, dass die Pax-2-Regionalisierung von Faktoren, welche im posterioren Mesenzephalon exprimiert werden, beeinflusst wird (Vieira *et al.*, 2006). *RPTPλ* ist nicht an der Regionalisierung von Pax-2 beteiligt. Dieses Ergebnis steht mit dem Expressionsmuster von Pax-2 und *cRPTPλ* im Einklang, denn während Pax-2 schon im Stadium HH 9 am MHO exprimiert wird, konnten Transkripte von *cRPTPλ* dort erst im Stadium HH 11 nachgewiesen werden (Abschnitt 2.3.).

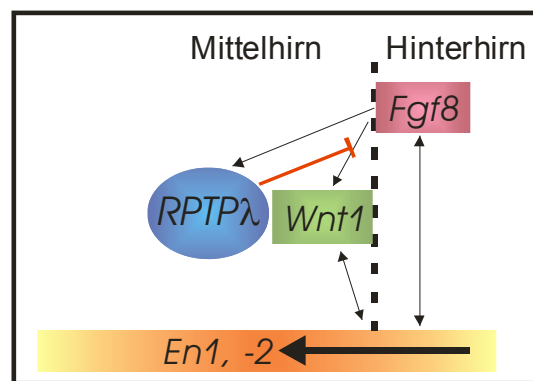


Abb. 51: Schematische Darstellung der möglichen Modulation des Fgf8-Signals am MHO durch *cRPTPλ* (roter Pfeil).

Fgf8 ist in der Lage, die Expression einer Reihe von Molekülen, wie z.B. *En-1/-2*, *Pax-2/-5* oder *Wnt1*, zu induzieren, die während der normalen Entwicklung im Bereich des MHO gebildet werden. Während *En-1/-2* und *Pax-2/-5* in einem weiten Bereich um die Fgf8-Quelle am MHO exprimiert werden, wird *Wnt1* nur in einem schmalen Ring im Mesenzephalon gebildet. Die Tatsache, dass *Wnt1*-Expression auf das Mesenzephalon beschränkt ist, lässt sich durch die Annahme erklären, dass *Wnt1*-Expression der Anwesenheit von Otx2 im Mesenzephalon bedarf. Dies lässt jedoch die Frage unbeantwortet, warum die Expression von *Wnt1* im Mesenzephalon auf einen schmalen Streifen von Zellen beschränkt ist. Eine

Erklärung dafür könnte sein, dass *Wnt1*-Expression nur durch eine ganz bestimmte *Fgf8*-Konzentration induziert werden kann (siehe Abb. 50). Eine andere Möglichkeit jedoch wäre, dass ein Inhibitor die *Wnt1*-Expression auf der rostralen Seite „schärft“. Überexpressionsstudien zeigten, dass *RPTPλ* am MHO die Expression von *Wnt1* unterdrücken oder rostral verschieben kann (Abb. 52). Expression von *En-1*, *Pax-2/-5*, *Lmx1b*, *Sef1*, *Sprouty2* oder *Grg4* wurde jedoch nicht durch Überexpression von *cRPTPλ* gestört (Abb. 28, 29). Überexpression von *RPTPλΔ2P*, einem Konstrukt, dem beide Phosphatasedomänen fehlen, führte ebenfalls zu einem Verlust von *Wnt1* am MHO. Überexpression von *RPTPλΔJM*, einem Konstrukt, welchem die Phosphatasedomänen sowie die Juxtamembrandomäne fehlen, führte hingegen zu einem normalen Expressionsmuster von *Wnt1* am MHO (Abb. 30). Demnach unterdrückt *cRPTPλ* spezifisch die Expression von *Wnt1*, nicht aber von anderen Molekülen am MHO.

Um diese Ergebnisse in einem anderen System zu belegen, wurde dieser Effekt in einem „künstlichen“ Organisator untersucht. Dafür wurde die Tatsache zu Nutzen gemacht, dass *Fgf8* die Aktivität des MHO im Mittelhirn simulieren kann und dort die Expression von *Wnt1*, sowie anderer MHO-spezifischer Proteine induziert (Abb. 31A). Deshalb wurde untersucht, ob die *Fgf8*-vermittelte *Wnt1*-Induktion im MHO durch ektopisch exprimiertes *RPTPλ* verhindert werden kann. In diesem Experiment wurden *RPTPλ*, das Deletionskonstrukt *RPTPλΔJM*, ein Konstrukt, dem beide Phosphatasedomänen sowie die Juxtamembrandomäne fehlen, oder *GFP* als Kontrolle mittels Elektroporation im Mittelhirn überexprimiert. 6-8 Stunden später, wenn diese Proteine bereits stark exprimiert werden (Abb. 31B), wurde *Fgf8* in dieselbe Region, ebenfalls mittels Elektroporation, eingebracht. Nachdem den Embryonen die Gelegenheit gegeben wurde, sich weitere 18 Stunden zu entwickeln, wurde die Expression von *Wnt1* analysiert. Nach Fehlexpression von *RPTPλ* gefolgt von *Fgf8*, war die ektopische *Wnt1*-Expression weitgehend unterdrückt (Abb. 31E). Dies lässt darauf schließen, dass *Wnt1* in Zellen, die *RPTPλ* exprimieren, nicht mehr von *Fgf8* induziert werden kann. Wird hingegen *RPTPλΔJM* ektopisch im Mittelhirn exprimiert, so verhindert dies nicht die Induktion der *Wnt1*-Expression durch *Fgf8* (Abb. 31D). In einem Kontrollexperiment wurde die Induktion von *Engrailed-1* nach Fehlexpression von *RPTPλ* und *Fgf8* untersucht. Hier zeigte sich, dass auch in Zellen, die *RPTPλ* exprimieren, *Engrailed-1* von *Fgf8* induziert werden kann (Abb. 32). Dies belegt, dass es sich bei dem Effekt von *RPTPλ* auf die Induktion von *Wnt1* durch *Fgf8* nicht um einen Effekt der zweifachen Elektroporation handelt. Die Ergebnisse der Untersuchungen im „künstlichen“ Organisator im Mittelhirn decken sich somit

mit den Überexpressionsstudien von *RPTPλ* am MHO und bestätigen einen spezifischen Effekt von *RPTPλ* auf die *Fgf8*-vermittelte Induktion der *Wnt1*-Expression.

Neben den Überexpressionsstudien von *RPTPλ* wurde die Expression von *cRPTPλ* auch mittels siRNA unterdrückt. In einem dualen Luciferase-Protokoll wurde die Effektivität von vier verschiedenen siRNAs gegen *cRPTPλ* getestet. Dabei wurde die Expression von *cRPTPλ* in einem Zellkulturexperiment im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 91,5 % reduziert (Abb. 30). Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression eines spezifischen siRNA-Konstruktes gegen *cRPTPλ* am MHO auch *in vivo* zum Verlust der Expression von *cRPTPλ* führt (Abb. 31). Nach siRNA vermittelter Reduktion der *cRPTPλ*-Expression am MHO erschien die Expressionsdomäne von *Wnt1* diffus. *Wnt1* wurde dort in verstreuten Zellen außerhalb der normalen *Wnt1*-Domäne, aber immer noch in Nähe der *Fgf8*-Quelle exprimiert (Abb. 31). Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass *cRPTPλ* eine Funktion in der rostralen „Schärfung“ der *Wnt1*-Expressionsdomäne zukommen könnte. Die Wirksamkeit der siRNAs gegenüber dem Zielgen wurde auch über einen größeren Konzentrationsbereich bestimmt, um unspezifische Effekte auszuschließen. Dazu wurden das siRNA-Konstrukt RPTPL-RI_D in den Konzentrationen 1,5 µg, 1,0 µg und 0,5 µg am MHO überexprimiert. Es zeigte sich, dass 0,5 µg des siRNA-Konstruktes ausreichen, um die Expression von *cRPTPλ* am MHO effektiv zu unterdrücken (Daten nicht gezeigt). Eine Kontrolle bestand dabei in der Verwendung eines so genannten „gescrambelten“ siRNA-Konstruktes. Hierbei wurde die Sequenz von RPTPL-RI_D, so modifiziert, dass es nicht mehr an das Zielmolekül binden kann. Eine Überexpression dieses siRNA-Konstruktes hat keinen Einfluss auf die Expression von *cRPTPλ* (Daten nicht gezeigt).

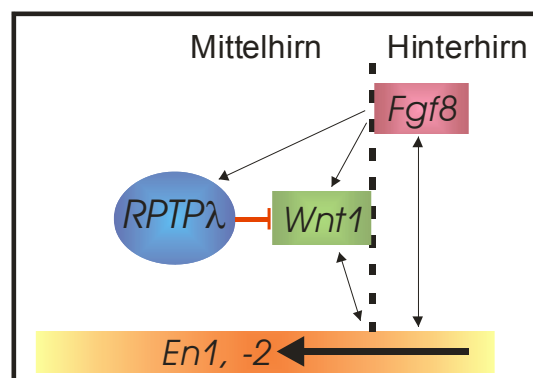


Abb. 52: Modell: *cRPTPλ* „schärft“ rostral die Expressionsdomäne von *Wnt1*, indem es der Induktion der *Wnt1*-Expression entgegenwirkt (roter Pfeil).

Diese Untersuchungen stützen die Theorie, dass cRPTP λ die Expressionsdomäne von *Wnt1* rostral „schärft“, indem es der Induktion der *Wnt1*-Expression durch *Fgf8* entgegenwirkt. Es konnte gezeigt werden, dass für diesen Effekt allerdings überraschenderweise nicht die katalytisch aktiven Phosphatasedomänen von RPTP λ von Bedeutung sind, sondern die Juxtamembrandomäne. Bei der Juxtamembrandomäne handelt es sich um einen Bereich, der häufig als Bindestelle für Komponenten intrazellulärer Signalwege dient (siehe auch im Folgenden S. 121). An die Juxtamembrandomäne von cRPTP λ könnten demnach z.B. Faktoren binden, welche an der Signalweiterleitung von *Fgf8* beteiligt sind. Diese Faktoren sind gegenwärtig noch unbekannt, könnten aber z.B. mit Hilfe eines „2-Hybrid-Screen“ bestimmt werden.

Bislang sind drei *Fgf*-Signalwege näher untersucht worden. Dabei handelt es sich um den RAS-MAP Kinase Signalweg, der ERK 1/2, p38 sowie JNK-Kinasen einschließt, den P-I-3 Kinase-AKT Signalweg und den PLC γ Signalweg. Diese Signalwege üben unterschiedliche Funktionen aus. Während der PLC γ Signalweg unter anderem die Organisation des Zytoskelettes reguliert und der P-I-3 Kinase-AKT Signalweg Faktoren aktiviert, die Apoptose verhindern, regulieren die MAP-Kinasen im RAS-MAP Kinase Signalweg die Aktivität von Kinasen und Transkriptionsfaktoren, die zu einer Vielfalt von biologischen Funktionen führen (zusammengefasst von Dailey *et al.*, 2005). Dabei formt der *Fgf*-Rezeptor nach Bindung von *Fgf* einen Dimer, dessen intrinsische Tyrosin-Kinase durch Phosphorylierung der Tyrosin-Reste aktiviert wird. Daraufhin können Moleküle an den Rezeptor binden und einen intrazellulären Signalkomplex bilden, die das Signal in die Zelle weiterleiten (Schlessinger, 2000).

Sato und Nakamura (2004) hatten gezeigt, dass sich im Stadium HH 8 im Hühnchen diphosphoryliertes ERK1/2, Komponenten des MAP-Kinase Signalweges, im Isthmus und Rhombomer 1 nachweisen lassen. Wie aus ihren Daten hervorgeht, ist der MAP-Kinase Signalweg für die Entwicklung des Metenzephalons, nicht aber des Mesenzephalons entscheidend. Interessanterweise wird die Expression von *En-1/-2* und *Pax-2/-5*, nicht aber die von *Wnt1* am MHO unterdrückt, wenn der MAP-Kinase Signalweg durch ektopische Expression einer dominant-negativen Form von RAS (RAS^{S17N}) gehemmt wird (Sato & Nakamura, 2004). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Expression von *En-1/-2*, *Pax-2/-5* und anderen Faktoren des MHO durch *Fgf8* und den MAP-Kinase Signalweg aktiviert wird, während *Wnt1* durch einen anderen, nicht RAS-abhängigen Signalweg induziert wird.

Der molekulare Mechanismus, der dem zugrunde liegt, ist also von großem Interesse. Um diesen näher zu untersuchen, wäre eine Charakterisierung der Bindungspartner von cRPTP λ

sinnvoll. Dazu könnte man z.B., wie bereits erwähnt, einen „2-Hybrid-Screen“ durchführen, oder aus Gewebeextrakten RPTP λ -enthaltende Proteinkomplexe mit Hilfe spezifischer Antikörper isolieren und anschließend die Bindungspartner von cRPTP λ mittels Massenspektroskopie identifizieren.

5.5. Regulation von *cRPTP λ* im Mittelhirn

Im Stadium HH 9-11 wird *cRPTP λ* stark im Mesenzephalon exprimiert, während die Expression ab dem Stadium HH 12+ weitgehend zurückgeht. Im Stadium HH 20 konnten wieder spezifische Transkripte von *cRPTP λ* in einem rostral (hoch) zu kaudal (niedrig) verlaufenden Gradienten nachgewiesen werden. Die Regulation dieser räumlich und zeitlich sehr dynamischen Expression wurde in dieser Arbeit näher charakterisiert.

Die Entwicklung des Mittelhirns steht unter dem Einfluss verschiedener sezernierter Proteine. *Fgf8*-Expression begrenzt das Mittelhirn an seiner posterioren Seite, und Fgf8-Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Festlegung der anterior-posterioren Polarität des Mittelhirns. Die dorso-ventrale Polarität des Mittelhirns wird durch die einander entgegenwirkende Aktivität von BMP-Proteinen („Bone Morphogenetic Protein“) im dorsalen Neuralrohr und Sonic hedgehog (Shh) im ventralen Neuralrohr festgelegt (Liem *et al.*, 1995, 1997; Jessel & Sanes, 2000; Ishibashi & McMahon, 2002).

Die Signalwirkung des Morphogens Shh, welches in der Bodenplatte des Neuralrohrs exprimiert wird, ist sowohl für das Wachstum der dorsalen als auch der ventralen Region des Dienzephalons und des anterioren Mesenzephalons im 14-25 Somiten Stadium von großer Bedeutung (Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995; Ishibashi & McMahon, 2002). Da das Signal des sezernierten Shh jedoch nur über eine Distanz von etwa 300 μ m wirken kann, kann der Effekt von Shh auf die Proliferationsrate der dorsalen Region nur durch andere Moleküle vermittelt werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Expression von *Fgf15*, welches im ventralen Dien- und Mesenzephalon exprimiert wird, direkt oder indirekt von Shh abhängig ist (Ishibashi & McMahon, 2002). Auch in der Gliedknospe ist Shh für die Aufrechterhaltung der Expression mehrerer Fgfs nötig (Laufer *et al.*, 1994; Niswander *et al.*, 1994; Yang & Niswander, 1995; Zuniga *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2001). Die Expression von *Tcf4*, einem Mitglied der Lef/Tcf Familie und wichtiger Bestandteil des kanonischen Wnt-Signalweges, ist auch von dem Shh-Signal abhängig (Ishibashi & McMahon, 2002).

Watanabe & Nakamura (2000) hatten gezeigt, dass nach Fehlexpression von *Shh* im optischen Tektum die Expression dorsaler Genprodukte wie *En-2*, *Wnt1*, *Fgf8*, *Pax-2*, *Pax-5* und *Pax-7* unterdrückt wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Expression von *cRPTPλ* nach retroviraler Fehlexpression von *Shh* im Mesenzephalon E3.5 unterdrückt wird. Nach zufällig verteilten Infektionsereignissen durch *RCAS-Shh* zeigten sich fleckenartigen Bereiche, in denen keine Transkripte von *cRPTPλ* nachgewiesen werden konnten (Abb. 39).

Shh wirkt als ventralisierender Faktor bei der Regionalisierung des Neuralrohrs. Durch Induktion ventralspezifischer und Unterdrückung dorsalspezifischer Genprodukte, erlangt undifferenziertes Gewebe einen ventralen Charakter (Jessell, 2000; Wilson & Maden, 2005). *cRPTPλ* wird im dorsalen Mesenzephalon, also dem zukünftigen optischen Tektum, exprimiert. Überexpression von *Shh* im Mittelhirn unterdrückt die *cRPTPλ*-Expression und führt somit zu einem Verlust von dorsalem Charakter. Bei der Betrachtung der oben beschriebenen Ergebnisse stellt sich deshalb die Frage, ob die Expression von *cRPTPλ* im Tektum konzentrationsabhängig von *Shh* reguliert wird - also von dessen morphogener Wirkung abhängig ist. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits bei der Regionalisierung des Rückenmarks beschrieben (Jessell, 2000; Wilson & Maden, 2005). *Shh* wird von Zellen der Bodenplatte im ventralen Neuralrohr sezerniert, d.h. die Konzentration von *Shh* ist dort am höchsten. Die hohe *Shh*-Konzentration führt dazu, dass im ventralen Mesenzephalon die Expression von *cRPTPλ* unterdrückt wird (Abb. 53). Mit zunehmendem Abstand zur *Shh*-Quelle, also zum dorsalen Bereich des optischen Tektums hin, nimmt die Konzentration von *Shh* graduell ab. Dies hat zur Folge, dass die Expression von *cRPTPλ* dorsal weniger gehemmt wird und somit stärker exprimiert werden kann. Auffällig ist jedoch, dass *cRPTPλ* und *Shh* in der Bodenplatte des Neuralrohrs koexprimiert werden. Dies spricht dafür, dass die Regulation der *cRPTPλ*-Expression in der Bodenplatte des Neuralrohrs von anderen Faktoren als im Mittelhirn abhängig sein könnte.

Mesenzephalon

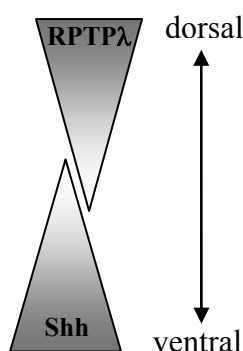


Abb. 53: Schematische Darstellung der zunehmenden dorsalen Expression von *RPTPλ* im Mesenzephalon in Relation zum Abstand zur *Shh*-Quelle.

Das sezernierte Glykoprotein Wnt1 wird von der Dachplatte des Dien- und Mesenzephalons gebildet und ist von zentraler Bedeutung für die Proliferation des Zwischen- und Mittelhirns (McMahon, 1990). Überexpression von *Wnt1* hat keinen Einfluss auf die Expression von *cRPTPλ* in der Mittel- / Hinterhirnregion (Abb. 19). β -Catenin, eine wichtige Komponente des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges wirkt als Transkriptionsfaktor und steuert zusammen mit Proteinen der TCF/LEF-Familie die Expression verschiedener Zielgene, was letztendlich zu einer verstärkten Zellproliferation im Mittelhirn führt (Cadigan & Nusse, 1997). Überexpression einer dominant-aktiven Variante von β -Catenin hatte keinen Einfluss auf die Expression von *cRPTPλ* (Abb. 33). Ebenso wenig führte Überexpression von dominant-aktivem β -Catenin zu einer ektopischen *Wnt1*-Expression (Abb. 36). Beim kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg im Mittelhirn scheint es sich also nicht um einen positiven Rückkopplungsprozess zu handeln.

Überexpression von *Lmx1b* am MHO induzierte eine Expression von *cRPTPλ* im kaudalen Mesenzephalon in unmittelbarer Nähe zum MHO (Abb. 24). Fehlexpression von *Lmx1b* im Mittelhirn hingegen induzierte keine ektopische Expression von *cRPTPλ* im anterioren und zentralen Mittelhirn (Abb. 37). *Lmx1b* reicht im Mittelhirn also nicht für eine Induktion von *cRPTPλ* aus. Und während Überexpression von *Engrailed-1* am MHO die Expression von *cRPTPλ* unterdrückte, führte eine Fehlexpression von *En-1* im Mittelhirn weder zu einer Induktion der *cRPTPλ*-Expression, noch unterdrückte es dort dessen Expression (Abb. 25, 38). Somit reicht auch *Engrailed-1* nicht für die Unterdrückung der *cRPTPλ*-Expression aus. Im Wildtyp können E2.5-E3.5 keine Transkripte von *Lmx1b* im Mesenzephalon nachgewiesen werden, und *En-1* wird dort in einem zunehmend rostral zu kaudal verlaufenden Gradienten exprimiert. Das Ergebnis, dass *Lmx1b* und *En-1* nicht die gleiche regulatorische Funktion auf *cRPTPλ* im Mittelhirn wie am MHO ausüben, können demnach mit den wildtypischen Expressionen vereinbart werden, da das Expressionsmuster von *cRPTPλ* in diesem Entwicklungszeitraum nicht mit dem von *Lmx1b* oder *En-1* im Mittelhirn überlappt.

Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die Expression von *cRPTPλ* am MHO und im Mesenzephalon unterschiedlich reguliert wird. *Sonic hedgehog* konnte im Mesenzephalon als hemmender Faktor für die Expression von *cRPTPλ* identifiziert werden. Es bleibt aber weiterhin die Frage offen, welche Faktoren dort an der Induktion von *cRPTPλ* beteiligt sind und ob Shh auch die Expression von *cRPTPλ* am MHO beeinflusst.

5.6. Funktion von *cRPTPλ* im Mittelhirn

In den Entwicklungsstadien HH 9-11 bilden sich im Hühnchen die drei primären Gehirneskel aus. Zu diesem Zeitpunkt wird *cRPTPλ* im Mesenzephalon stark exprimiert. In den Stadien 12-15, wenn das dorsale Mesenzephalon stark an Größe zunimmt, können dagegen keine Transkripte mehr von *cRPTPλ* im Mesenzephalon nachgewiesen werden. Die Expression von *cRPTPλ* und die Proliferationsrate im Mittelhirn könnten also korrelieren.

Um in den folgenden Experimenten die Größe des Mittelhirns zwischen Experiment und Kontrolle vergleichen zu können, wurde der Mittelhirnmarker *Meis2* verwendet. Überexpression von *Meis2* im Mittelhirn induzierte keine ektopische Expression von *cRPTPλ* (Abb. 35). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der wildtypischen Expression, da *Meis2* im Mittelhirn ab dem Stadium HH 12 exprimiert wird, wenn sich die Expression von *cRPTPλ* auf einen schmalen Streifen am MHO beschränkt. *Meis2* wird ab dem embryonalen Tag E2 im Mesenzephalon in einem dorso-ventral verlaufenden Gradienten, nicht aber entlang der dorsalen Mittellinie, exprimiert. Der Homeodomän Transkriptionsfaktor *Meis2* wirkt als Kotranskriptionsfaktor, der durch Bindung an andere Transkriptionsfaktoren deren DNA-Bindeaffinitäten oder -spezifitäten erhöhen kann (Mann & Affolter, 1998). Überexpression eines dominant negativ wirkenden Konstruktes von *Meis2* (einer Fusion von *Meis2* an die Repressordomäne des En-Proteins aus *Drosophila melanogaster*, *Meis2EnR*) im Mittelhirn hatte gezeigt, dass *Meis2* an der Induktion von *ephrinB1* beteiligt ist (Z. Agoston, Diplomarbeit 2005). *Meis2* übt daher eine wichtige Funktion bei der Regionalisierung des optischen Tektums und der Bildung der retinotektalen Karte aus.

Wenn *RPTPλ* im Mittelhirn im Stadium HH 10 mittels *in ovo* Elektroporation fehlexprimiert wird, so führt dies zu einer Fehlbildung des Mittelhirns. Mit Hilfe des Mittelhirnmarkers *Meis2*, kann beobachtet werden, dass das Mittelhirn elektroporierter Embryonen im Vergleich zur Kontrolle bedeutend kleiner erscheint (Abb. 41). Dieser Effekt tritt jedoch nur auf, wenn *RPTPλ* im Stadium HH 10, nicht jedoch im Stadium HH 13 überexprimiert wurde. Möglicherweise liegt dies darin begründet, dass die endogene Expression von *cRPTPλ* im Mittelhirn zwischen HH 12 und HH 15 rapide abnimmt. Durch Elektroporation von Embryonen des Stadiums HH 10 wird die Expression von *cRPTPλ* daher künstlich aufrechterhalten. Durch Elektroporation zu einem späteren Zeitpunkt, wird *cRPTPλ* jedoch in Zellen überexprimiert, die die endogene Expression bereits zurückgefahren haben und daher möglicherweise die Fähigkeit verloren haben, auf von *cRPTPλ* hervorgerufene intrazelluläre Signale zu reagieren. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass Fehlexpression von *RPTPλ*

im Stadium HH 12 im Mittelhirn nicht die Expression von *ephrinB1*, *Otx2* oder *FgfR1* beeinflusst (Abb. 43).

Wenn im Stadium HH 10 anstelle des *RPTPλ*-Gens, das Deletionskonstrukt *RPTPλΔJM* überexprimiert wird, welchem die Phosphatasedomänen und die Juxtamembrandomäne fehlen, so führt dies nicht zu einer Fehlbildung des Mittelhirns (Abb. 41). Die Juxtamembrandomäne von transmembranen Rezeptoren dient häufig als Bindestelle für Komponenten intrazellulärer Signalwege. So konnte z.B. schon von Yan *et al.* (2002) gezeigt werden, dass menschliches RPTPλ (PCP2) *in vitro* an β-Catenin bindet und dieses dephosphorylieren kann. Diese Bindung von PCP2 an β-Catenin ist nicht von einem bestimmten Phosphorylierungsstatus des β-Catenin Proteins abhängig (Yan *et al.*, 2002). Durch gerichtete Mutagenese wurde gezeigt, dass die erste Phosphatasedomäne von PCP2 für die Dephosphorylierung von β-Catenin nötig ist (Yan *et al.*, 2002). β-Catenin spielt eine entscheidende Rolle im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg, welcher für die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung wichtig ist (Zechner *et al.*, 2003; Panhuysen *et al.*, 2004).

Fehlexpression von *Wnt1* führt zu einer verstärkten Proliferationsrate im Mesenzephalon (Matsunaga *et al.*, 2002). Panhuysen *et al.* (2004) konnten zeigen, dass dies von einer Translokation von β-Catenin in den Zellkern begleitet ist, was bestätigt, dass dort der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg aktiv ist. Inaktivierung von β-Catenin oder *Wnt1* führt zu einer verringerten Proliferationsrate im Mittelhirn und im rostralen Hinterhirn (McMahon *et al.*, 1990; Brault *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass RPTPλ auch *in vivo* im embryonalen Mesenzephalon mit β-Catenin interagiert (Abb. 44). Hier liegt vermeintlich ebenfalls eine Bindung von β-Catenin an die Juxtamembrandomäne von cRPTPλ vor.

Das Ergebnis dieser Bindungsstudie führt zu der Hypothese, dass RPTPλ durch eine Bindung an β-Catenin das Wnt-Signal moduliert. So könnte nach künstlicher Aufrechterhaltung der Expression von *RPTPλ* im Mittelhirn, verstärkt β-Catenin an die Juxtamembrandomäne von RPTPλ gebunden werden. Dadurch könnte bedeutend weniger β-Catenin in den Zellkern wandern, wo es normalerweise mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie interagiert und so die Expression von Zielgenen induziert. In der Tat gehören eine Reihe von wichtigen Faktoren der Zellzykluskontrolle, wie z.B. Cyclin D1 oder c-myc, zu den direkten Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalweges. Durch diesen Mechanismus könnte cRPTPλ als „Bremse“ des kanonischen Wnt-Signalweges wirken und so zu einer verringerten Proliferationsrate führen (Abb. 54). Diese Hypothese müsste jedoch noch experimentell

getestet werden. Hierfür bieten sich BrdU-Puls Markierungsexperimente an, bei denen die Proliferationsrate durch kurzzeitigen Einbau des Nukleotidanalogs 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin quantifiziert werden kann. Parallel dazu sollte der Einfluss von *cRPTP λ* auf den programmierten Zelltod mit Hilfe des TUNEL-Test (Terminal-desoxyribosyl-transferase (TdT) – mediated nUTP Nick End Labeling) untersucht werden.

Eine künstliche Aufrechterhaltung der Expression von *RPTP λ* im Mittelhirn führt überraschenderweise auch zu einer abgeschwächten Expression von *β -Catenin* (Abb. 42). Dieser Effekt ist jedoch wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in einem verkleinerten Mittelhirn, wie es nach *RPTP λ* -Expression beobachtet wurde, auch weniger Transkripte von *β -Catenin* nachgewiesen werden können. Für diese Erklärung spricht auch das Ergebnis, dass eine Fehlexpression von *RPTP λ* im Stadium HH 12 zu keiner Veränderung des Expressionsmusters von *β -Catenin* führte (Daten nicht gezeigt).

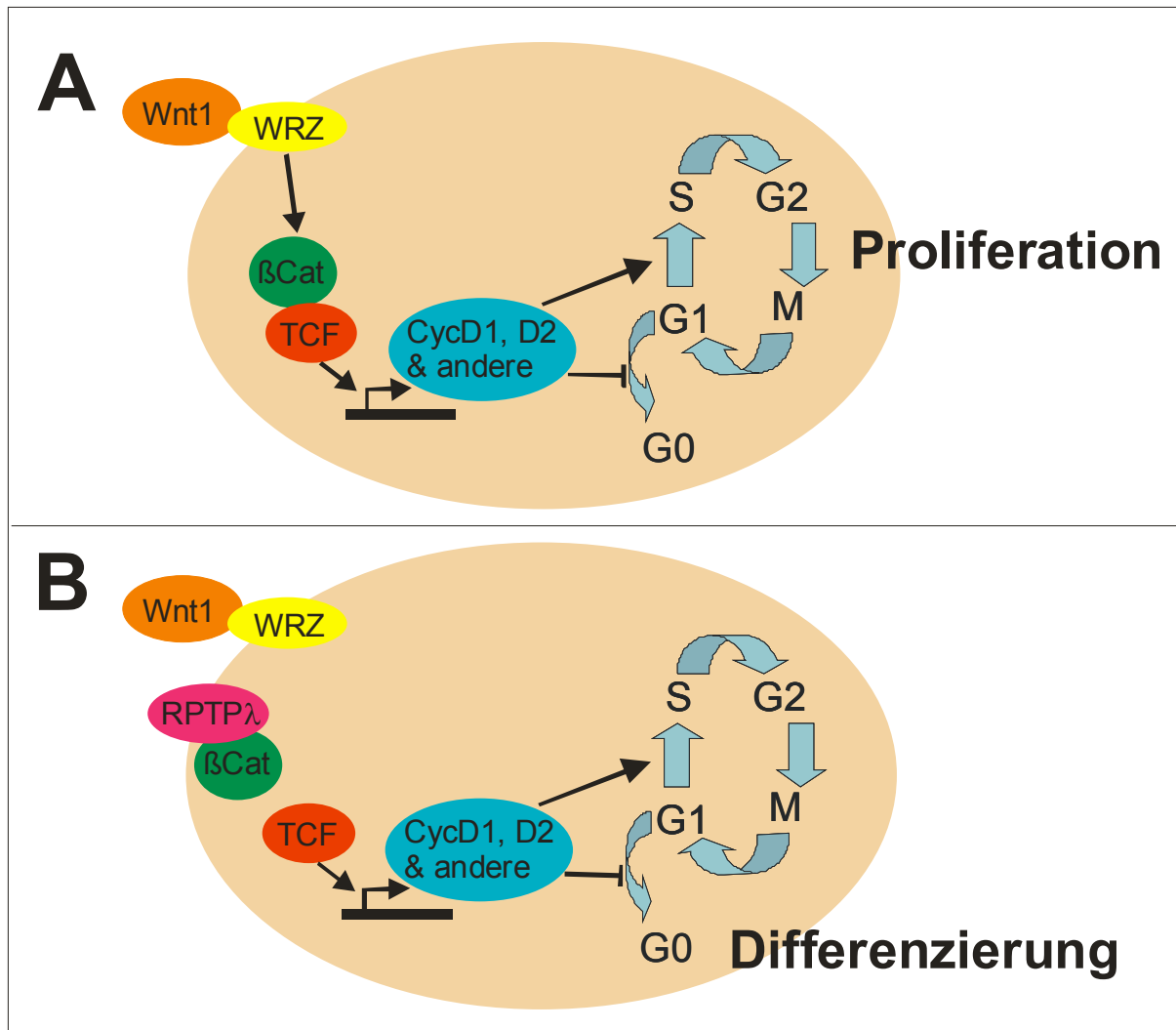


Abb. 54: Aufrechterhaltung der Expression von cRPTPλ E1.5 führt zu einer Fehlbildung des Mittelhirns. (A) Bindung von Wnt1 an den Frizzled-Rezeptor führt zu einer Akkumulation von β-Catenin im Zytoplasma. Stabilisiertes, unphosphoryliertes β-Catenin wandert in den Zellkern und interagiert dort mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, wodurch die Expression von Zielgenen induziert wird. Der Zellzyklus wird aktiviert. Modell: (B) Künstliche Aufrechterhaltung der Expression von *RPTPλ* im Mittelhirn, verstärkt die Bindung von β-Catenin an die Juxtamembrandomäne von *RPTPλ*. Somit kann bedeutend weniger β-Catenin in den Zellkern wandern. Der Zellzyklus ist inaktiv und es kommt verstärkt zur Zelldifferenzierung. (Modifiziert nach Megason & McMahon, 2002.) WRK = Wnt-Rezeptor Komplex

Wnts regulieren Zellproliferation und Differenzierung, und der Wnt-Signalweg beinhaltet Proteine, die sowohl direkt an der Transkription, als auch an der Zelladhäsion beteiligt sind. So wirkt z.B. β-Catenin zum einen als Kofaktor für die Transkription mit TCF/LEF im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg und zum anderen als strukturelles Adaptermolekül, welches mit dem Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin interagiert (Cadigan & Nusse, 1997; Bonvini *et al.*, 2001). β-Catenin spielt durch die Bindung an Cadherine eine entscheidende Rolle bei der strukturellen Organisation und Funktion von Cadherinen, indem es die

Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet (Jamora & Fuchs, 2002; Gumbiner, 2000). Die strukturelle und funktionelle Einheit des Cadherin-Catenin Komplexes wird durch Phosphorylierung an Tyrosinresten reguliert (Lilien *et al.*, 2002). Aktivierung von Tyrosin-Kinasen führt zu einem Verlust von Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion und zu einem Anstieg des Anteils an zytoplasmatischen β -Catenin (Piedra *et al.*, 2003; Roura *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu stabilisiert die Aktivierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) den Cadherin-Catenin Komplex und führt zu einer verstärkten Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion (Hellberg *et al.*, 2002; Nawroth *et al.*, 2002; Balsamo *et al.*, 1998; schematische Darstellung Abb. 55). Es muss jedoch beachtet werden, dass eine Tyrosin-Phosphorylierungsbedingte Freisetzung von β -Catenin aus dem Cadherin-Komplex nicht nur die Einheit und Funktion des Adhäsionskomplexes reguliert, sondern unter Umständen auch einen alternativen Mechanismus zur Aktivierung des β -Catenin Signals und des kanonischen Wnt-Signalweges darstellen könnte (zusammengefasst von Nelson & Nusse, 2004). So führte z.B. Überexpression von Cadherinen in Embryonen von *Xenopus laevis* und *Drosophila melanogaster* zu einem erhöhten Anteil von gebundenem β -Catenin an die Plasmamembran und war so nicht mehr in der Lage, in den Zellkern zu wandern (Heasman *et al.*, 1994; Sanson *et al.*, 1996).

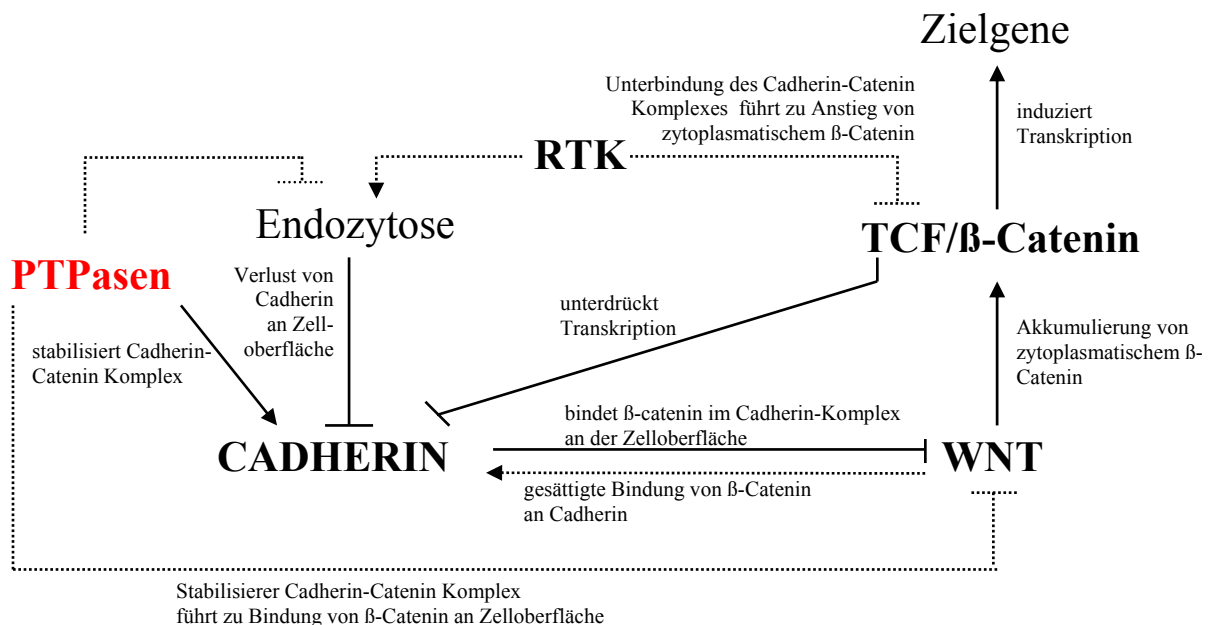


Abb. 55: Teile des Signalweges, welcher das Wnt/β-Catenin Signal und die Cadherin-vermittelte Adhäsion kontrolliert. (Modifiziert nach Nelson & Nusse, 2004.)

Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatasen gehören zu den Zell-Adhäsionsmolekülen und beeinflussen so unter anderem Zell-Differenzierung und Zell-Migration (Freemont, 1998). So

wurde z.B. schon gezeigt, dass PCP2, das menschliche Homolog von *cRPTP* λ , innerhalb der extrazellulären Domäne das Motiv HAV aufweist, welches bei der Familie der Cadherine für den Zell-Zell-Kontakt wichtig ist (Blaschuk *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1996). Interessanterweise scheint *N-Cadherin* am MHO und im Mittelhirn in derselben Zellpopulation wie *cRPTP* λ exprimiert zu werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren weist *cRPTP* λ ebenso wie das Zell-Adhäsionsmolekül CEPU-1 eine Ig-Domäne auf, welche Zell-Zell-Kontakt vermittelt. Das Ergebnis der Bindungsstudie von *RPTP* λ und β -Catenin sowie die Tatsache, dass die Expression von *cRPTP* λ und *N-Cadherin* am MHO überlappen, werfen deshalb die Frage auf, ob *RPTP* λ , β -Catenin und *N-Cadherin* einen trimeren Komplex bilden. So könnte *cRPTP* λ antagonistisch zu den Tyrosin-Kinasen wirken und dazu beitragen, dass Zell-Zell-Adhäsion verstärkt und der Anteil von zytoplasmatisch vorliegendem β -Catenin verringert wird (Abb. 56). Dies könnte z.B. experimentell durch Überexpression eines Deletionskonstruktes von *RPTP* λ untersucht werden, dem die extrazelluläre Domäne fehlt. Dieses Konstrukt sollte nicht mehr in der Lage sein, Zell-Zell-Interaktion zu vermitteln. Zudem kann auf diesem Wege überprüft werden, ob *RPTP* λ als Rezeptor fungiert, denn ohne die extrazelluläre Domäne könnte dieses Deletionskonstrukt von *RPTP* λ nicht mehr von außen aktiviert werden.

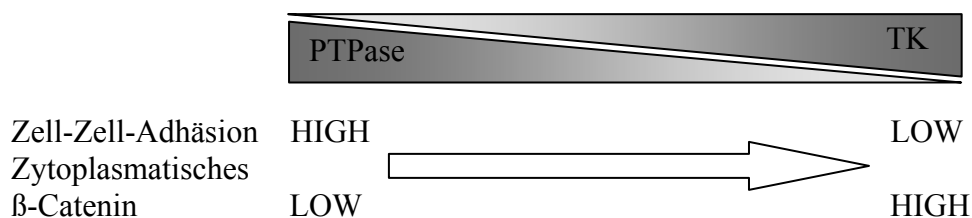


Abb. 56: Funktionelle Regulation des Cadherin-Catenin Komplexes durch die Balance der Aktivität von Tyrosin-Kinase und Tyrosin-Phosphatase. (Modifiziert nach Nelson & Nusse, 2004.)

Da Veränderungen im Expressionsmuster eines Zell-Adhäsionsmoleküls auch normale Epithel-Mesenchym-Interaktion unterbinden, führt dies auch zu einer strukturellen und funktionellen Fehlorganisation des Zellverbandes (zusammengefasst von Lukás & Dvorák, 2004). Dies ist z.B. ein Charakteristikum von Krebsentstehung. So ist die Entwicklung eines Tumors auch von fehlerhaften Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Interaktionen abhängig, welche mit Defekten im Zellzyklus einhergehen (z.B. Bártek *et al.*, 1999). Deshalb wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob eine Unterdrückung der Expression von *cRPTP* λ im Mittelhirn mittels siRNA eine Überproliferation zur Folge hat.

RPTP λ wird während der Embryonalentwicklung auch in den Somiten exprimiert (Aerne *et al.*, 2003, Aerne & Ish-Horowicz, 2004; in dieser Publikation wird *RPTP λ* als *RPTP ψ* bezeichnet). Die periodische Produktion der Somiten entlang der anterior-posterioren Achse benötigt in Vertebraten einen molekularen Oszillator, die sogenannte „segmentation clock“. Dieser Oszillator kann durch die zyklische Aktivität von regulatorischen Genen sichtbar gemacht werden (zusammengefasst von Maroto & Pourquié, 2001). Diese Oszillationen führen zu dynamischen wellenförmigen Domänen, die sich über das presomitische Mesoderm (PSM) von posterior nach anterior bewegen. Die zyklischen Expressionen der meisten oszillierenden Genprodukte sind vom Notch Signalweg abhängig. So sind es z.B. in der Maus *Hes1* und *Hes7*, transkriptionelle Zielgene des Notch Signalweges, welche für „helix-loop-helix“ Repressorproteine kodieren (Bessho *et al.*, 2003; Jouve *et al.*, 2000). Mutationen in diesen zyklischen Genen und anderen Komponenten des Delta/Notch Signalweges führen zu einer fehlerhaften Segmentation der Somiten. Aerne & Ish-Horowicz (2004) zeigten, dass *RPTP ψ/λ* im Zebrafisch eine entscheidende Rolle bei der Somitogenese zukommt. Hemmung der Aktivität von *RPTP ψ/λ* mit Hilfe der Injektion von *RPTP ψ/λ* spezifischen *Morpholino-antisense* Nukleotiden führte im Embryo zu einer Unterbrechung des segmentalen Musters und zu einem Verlust der Expression der zyklischen Gene *deltaC*, *her1* und *her7* im PSM (Aerne & Ish-Horowicz, 2004). *RPTP ψ/λ* ist demnach während der Somitogenese nötig, um die Transkription einiger Zielgene von Notch zu aktivieren. Es ist jedoch noch unklar, in welchem Umfang das Delta/Notch Signal für die Oszillation selbst benötigt wird, da sich in Notch-Mutanten die ersten Somiten normal ausbilden (Jiang *et al.*, 2000). Eine Möglichkeit besteht darin, dass das Notch-Signal nur für die Synchronisierung der Nachbarzellen im PSM wichtig ist und das eine vorgeschaltete „segmentation clock“ den zyklischen Notch-Signalweg beeinflusst (Jiang *et al.*, 2000). Aulehla *et al.* (2003) lieferte erste Hinweise darauf, dass es sich in der Maus bei dieser vorgeschalteten „segmentation clock“ um ein Signal von Wnt3a handeln könnte, dies konnte jedoch im Zebrafisch nicht bestätigt werden (Aerne *et al.*, 2004).

Aerne *et al.* (2004) konnten zeigen, dass *RPTP ψ/λ* auch eine Funktion während der Gastrulation zukommt. Embryonen, in denen *RPTP ψ/λ* unterdrückt wurde, besitzen eine kürzere und breitere Achse. Dieser Phänotyp ist in der Regel von nicht-kanonischen Wnt Signalwegen abhängig und wird durch Änderungen der Zell-Adhäsions-Eigenschaften hervorgerufen, z.B. durch verminderte Aktivität von Zelladhäsionsmolekülen, wie den Cadherinen (Kuhl *et al.*, 1996; Marsden & DeSimone, 2003).

Es zeigte sich also auch hier, dass RPTP λ /RPTP ψ zwei unterschiedliche Funktionen während der Somitogenese und der Gastrulation ausübt: es scheint den Wnt- beziehungsweise den Notch-Signalweg zu beeinflussen. Interessanterweise wird z.B. derzeit diskutiert, ob sich der Wnt- und Notch-Signalweg nicht gegenseitig beeinflussen (van Es & Clevers, 2005).

Auch die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass cRPTP λ die Aktivität zweier Signalwege am MHO bzw. dem Mittelhirn beeinflusst: Die Anwesenheit von cRPTP λ scheint einerseits durch einen noch unbekanntem Mechanismus zu verhindern, dass Fgf8 Signale die *Wnt1*-Expression stimulieren können (Abb. 30, 31, 34). Andererseits scheint cRPTP λ durch Bindung und „Wegfangen“ von β -Catenin direkt in den kanonischen Wnt-Signalweg einzugreifen (Abb. 41, 44). Auch die Fgf- und Wnt-Signalwege scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen, bzw. führen in den unterschiedlichen Zusammenhängen zu ähnlichen biologischen Antworten (z.B. Olander *et al.*, 2006; Takemoto *et al.*, 2006; Rimerman *et al.*, 2000). Im embryonalen Mesenzephalon sind der kanonische Wnt-Signalweg, sowie durch Aktivierung des Fgf-Rezeptors (vermutlich FgfR1 oder FgfR4) der PLC γ -Signalweg aktiv (Umbhauer *et al.*, 2000). Auch wenn die molekularen Mechanismen der Funktion von cRPTP λ am MHO, bzw. dem Mittelhirn noch weiterer Aufklärung bedürfen, so deuten die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass cRPTP λ möglicherweise als negativer „feedback“-Mechanismus für den kanonischen Wnt-Signallweg sowie den im Mesenzephalon aktiven Fgf-Signalweg wirken kann.

6. ANHANG

6.1. Sequenzvergleiche von *RPTPλ* in verschiedenen Spezies

Sequenzvergleiche von *RPTPλ* in verschiedenen Spezies wurden mit Hilfe von „BCM Search Launcher“ erstellt.⁴

hPTP-J	MARAQALVLALTFQL CAPETETPAAGCTFE EASDPAVPCEYSQAQ	45
hPCP-2	MARAQALVLALTFQL CAPETETPAAGCTFE EASDPAVPCEYSQAQ	45
mRPTPλ	MARAQALVLALTFQF CAPETETPAAGCTFE EASDPVVPCEFSQAQ	45
mFtp-1	MARAQALVLALTFQF CAPETETPAAGCTFE EASDPVVPCEFSQAQ	45
cRPTPλ	-----	0

Meprin/A5/PTPμ Motiv

hPTP-J	YDDFQWEQVRIHPGT RAPADLPHGSYLMVN TSQHAPGQRAHVIFQ	90
hPCP-2	YDDFQWEQVRIHPGT RAPADLPHGSYLMVN TSQHAPGQRAHVIFQ	90
mRPTPλ	YDDFQWEQVRIHPGT RTPEDLPHGAYLMVN ASQHTPGQRAHIIFQ	90
mFtp-1	YDDFQWEQVRIHPGT RTPEDLPHGAYLMVN ASQHAPGQRAHIIFQ	90
c RPTPλ	-----	0

hPTP-J	SLSENDTHCVQFSYF LYSRDGHSPGTLGVY VRVNGGPLGSAVWNM	135
hPCP-2	SLSENDTHCVQFSYF LYSRDGTG-GTLGVY VRVNGGPLASAVWNM	134
mRPTPλ	TLSENDTHCVQFSYF LYSRDGHSPGTLGVY VRVNGGPLGSAVWNM	135
mFtp-1	TLSENDTHCVQFSYF LYSRDGHSPGTLGVY VRVNGGPLGSAVWNM	135
cRPTPλ	-----	0

hPTP-J	TGSHGRQWHQAELAV STFWPNEYQVLFEAL ISPDRRGYMGLDDIL	180
hPCP-2	TGSHGRQWHQAELAV STFWPNEYQVLFEAL ISPDRRGYMGLDDIL	179
mRPTPλ	TGSHGRQWHQAELAV STFWPNEFQVLFEAL ISPDKGYIGLDDIL	180
mFtp-1	TGSHGRQWHQAELAV STFWPNEYQVLFEAL ISPDKGYIGLDDIL	180
cRPTPλ	--SHGRQWHQAELAV SLFWPSEYQVLFEAV ISSERRGYLGLDDIL	43

⁴ <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>

hPTP-J	LLSYPCAKAPHFSRL GDVEVNAGQNASFQC MAAGRAAEAERFLLQ	225
hPCP-2	LLSYPCAKAPHFSRL GDVEVNAGQNASFQC MAAG-EPMRQRFLLQ	223
mRPTPλ	LFSYPCAKAPHFSRL GDVEVNAGQNASFQC MAAGRAAEAHEFFLQ	225
mFtp-1	LFSYPCAKAPHFSRL GDVEVNAGQNASFQC MAAGRAAEAHEFFLQ	225
cRPTPλ	LLNYPCSKAPHFSRL GDVEVNAGQNATFQC VAAGKAAEAERFLMQ	88

Immunglobulin-ähnliche Domäne

hPTP-J	RQSGALVPAAGVRHI SHRRFLATFPLAAVS RAEQDLYRCVSQAPR	270
hPCP-2	RQSGALVPAG-AFGT SATGFLATFPLAAVS RAEQDLYRCVSQAPR	267
mRPTPλ	RQSGVLVPAAGVRHI SHRRFLATFPLASVG RSEQDLYRCVSQAPR	270
mFtp-1	RQSGVLVPAAGVRHI SHRRFLATFPLASVG RSEQDLYRCVSQAPR	270
cRPTPλ	RQSGEVVPAASVKHI SHRRFLATFQLDEVS KGEQDLYRCVTQSSR	133

hPTP-J	GAGVSNFAELIVKEP PTPIAPPQLLRAGPT YLIIQLNTNSIIGDG	315
hPCP-2	GG-VSNFAELIVKEP PTPIAPPQLLRAGPT YLIIQLNTNSIIGDG	311
mRPTPλ	GAGVSNFAELIVKEP PTPIAPPQLLRAGPT YLIIQLNTNSIIGDG	315
mFtp-1	GAGVSNFAELIVKEP PTPIAPPQLLRAGPT YLIIQLNTNSIIGDG	315
cRPTPλ	GSGVSNFAELIVKEP PTPIAPPQLLRAGST YLIIQLNTNSIIGDG	178

Fibronectin Typ III

hPTP-J	PIVRKEIEYRMARGP WAEVHAVSLQTYKLW HLDPDTEYEISVLLT	360
hPCP-2	PIVRKEIEYRMARGP WAEVHAVSLQTYKLW HLDPDTEYEISVLLT	356
mRPTPλ	PIVRKEIEYRMARGP WAEVHAVNLQTYKLW HLDPDTEYEISVLLT	360
mFtp-1	PIVRKEIEYRMARGP WAEVHAVNLQTYKLW HLDPDTEYEISVLLT	360
cRPTPλ	PIVRKEIEYRMTSGP WSEVHAVNMQTYKLW HLDPDTEYEISVLLT	223

hPTP-J	RPGDGGTGRPGPPLI SRTKCAEPMRAPKGL AFAEIQRQLTLQWE	405
hPCP-2	RPGDGGTGRWATPHQ P-HQMRAHEGPKGL AFAEIQRQLTLQWE	400
mRPTPλ	RPGDGGTGRPGPPLI SRTKCAEPTRAPKGL AFAEIQRQLTLQWE	405
mFtp-1	RPGDGGTGRPGPPLI SRTKCAEPTRAPKGL AFAEIQRQLTLQWE	405
cRPTPλ	RPGEGGTGKPGPPLI SRTKCAEPMRAPKGL AFSEIQSRQLTLQWE	268

Fibronectin Typ III

hPTP-J	PLGYNVTRCHTYTVS LCYHYTLGSSHNQTI RECVKTEQGVSRYSYTI	450
hPCP-2	PLGYNVTRCHTYTVS LCYHYTLGSSHNQTI RECVKTEQGVSRYSYTI	445
mRPTPλ	PLGYNVTRCHTYAVS LCYRYTLGGSHNQTI RECVKMERGASRYTI	450
mFtp-1	PLGYNVTRCHTYAVS LCYRYTLGGSHNQTI RECVKMERGASRYTI	450
cRPTPλ	PLGYNLTRCHTYSVS LCYRYLVGSGLNQTF RECAKMERNANRYTI	313

hPTP-J	KNLLPYRNVHVRLVL TNPEGRKEGKEVTFQ TDEDVPSGIAAESLT	495
hPCP-2	KNLLPYRNVHVRLVL TNPEGRKEGKEVTFQ TDEDVPSGIAAESLT	490
mRPTPλ	KNLLPFRNIHVRLIL TNPEGRKEGKEVTFQ TDEDVPGGIAAESLT	495
mFtp-1	KNLLPFRNIHVRLIL TNPEGRKEGKEVTFQ TDEDVPGGIAAESLT	495
cRPTPλ	KNLLPYRNIHVKLIL SNPEGRKEGKEVTFQ TDEDVPGGIAESLT	358

Fibronektin Typ III

hPTP-J	FTPLEDMIFLKWEEP QEPNGLITQYEISYQ SIESSDPAVNVPGPR	540
hPCP-2	FTPLEDMIFLKWEEP QEPNGLITQYEISYQ SIESSDPAVNVPGPR	535
mRPTPλ	FTPLEDMIFLKWEEP QEPNGLITQYEISYQ SIESSDPAVNVPGPR	540
mFtp-1	FTPLEDMIFLKWEEP QEPNGLITQYEISYQ SIESSDPAVNVPGPR	540
cRPTPλ	FTPLEDMIFLKWEEP VEPNGLITQYEISYQ SIESSDPAVNVPGPR	403

hPTP-J	RTISKLRNETYHVFS NLHPGTTYLFSVRAR TGKGFQAALTEITT	585
hPCP-2	RTISKLRNETYHVFS NLHPGTTYLFSVRAR TGKGFQAALTEITT	580
mRPTPλ	RTISKLRNETYHVFS NLHPGTTYLFSVRAR TSKGFQAALTEITT	585
mFtp-1	RTISKLRNETYHVFS NLHPGTTYLFSVRAR TSKGFQAALTEITT	585
cRPTPλ	RTVSKLRNETYHVFS NLHPGTTYLFSVRAR TGKGFQALTEITT	448

hPTP-J	NISAPSFYADMPS LGESENTITVLLRPA QGRGAPISVYQVIVE	630
hPCP-2	NISAPSFYADMPS LGESENTITVLLRPA QGRGAPISVYQVIVE	625
mRPTPλ	NISAPSFYADMPS LGESENTITVLLRPA QGRGAPISVYQVVVE	630
mFtp-1	NISAPSFYADMPS LGESENTITVLLRPA QGRGAPISVYQVVVE	630
cRPTPλ	NISAPTFDYGDMPS LGESESTITVLLRPA QGRGAPISTYQVIVE	493

Fibronektin Typ III

hPTP-J	EERARRLRREPGGQD CFPVPLTFEALARG LVHYFGAELAASSLP	675
hPCP-2	EERARGCGG-TRWTG LLPSAIDL RGGAGPR LVHYFGAELAASSLP	669
mRPTPλ	EERPRRLRREPGAQD CFSVPLTFETALARG LVHYFGAELAASSLL	675
mFtp-1	EERPRRLRREPGAQD CFSVPLTFETALARG LVHYFGAELAASSLL	675
cRPTPλ	EDRPKKIKRELGGQE CFPVPLTFDDAMSRG SVHYFGAELPASSLT	538

hPTP-J	EAMPFTVGDNQTYRG FWNPPLEPRKAYLIY FQAASHLKG DTRLNC	720
hPCP-2	EAMPFTVGDNQTYRG FWNPPLEPRKAYLIY FQAASHLKG DTRLNC	714
mRPTPλ	EAMPFTVGDNQTYRG FWNPPLEPRKAYLIY FQAASHLKG DTRLNC	720
mFtp-1	EAMPFTVGDNQTYRG FWNPPLEPRKAYLIY FQAASHLKG DTRLNC	720
cRPTPλ	EAKPFTVGDNQTYS YWNPPLEPKAYLIY FQAMSNLKG DTRLNC	583

hPTP-J	IRIARKAACKESKRP LEVSRSEEMGLILG ICAGGLAVLILLGA	765
hPCP-2	IRIARKAACKESKRP LEVSRSEEMGLILG ICAGGLAVLILLGA	759
mRPTPλ	IRIARKAACKESKRP LEVSRSEEMGLILG ICAGGLAVLILLGA	765
mFtp-1	IRIARKAACKESKRP LEVSRSEEMGLILG ICAGGLAVLILLGA	765
cRPTPλ	IRIARKAACKESKRP LEVSRSEEMGLILG ICAGGLVVLILLGA	628

Transmembran-Domäne

hPTP-J	IIVIRKKGKPVNMTK ATVNYRQEKTHMMSA VDRSFTDQSTLQEDE	810
hPCP-2	IIVIRKKGKPVNMTK ATVNYRQEKTHMMSA VDRSFTDQSTLQEDE	804
mRPTPλ	IIVIRKKGKPVNMTK ATVNYRQEKTHMMSA VDRSFTDQSTLQEDE	810
mFtp-1	IIVIRKKGKPVNMTK ATVNYRQEKTHMMSA VDRSFTDQSTLQEDE	810
cRPTPλ	IIVIRKKGKPVNMTK ATINRHEKTHMMSA IDRSFTDQSTLQEDE	673

hPTP-J	RLGLSFMDTHGYSTR GDQRSGGVTEASSL GGSPRRPCGRKGSFY	855
hPCP-2	RLGLSFMDTHGYSTR GDQRSGGVTEASSL GGSPRRPCGRKGSFY	849
mRPTPλ	RLGLSFMDAPGYSPR GDQRSGGVTEASSL GGSPRRPCGRKGSFY	855
mFtp-1	RLGLSFMDAPGYSPR GDQRSGGVTEASSL GGSPRRPCGRKGSFY	855
cRPTPλ	RLGLSFMDTHNYSNR GDQRSSVVENESSL GGSPRRQCGRKGSFY	718

hPTP-J	HTGQLHPAVRVADLL QHINQMKTAEYGFY QEYESFFEGWDATKK	900
hPCP-2	HTGQLHPAVRVADLL QHINQMKTAEYGFY QEYESFFEGWDATKK	894
mRPTPλ	HTGQLHPAVRVADLL QHINQMKTAEYGFY QEYESFFEGWDATKK	900
mFtp-1	HTGQLHPAVRVADLL QHINQMKTAEYGFY QEYESFFEGWDATKK	900
cRPTPλ	HTGQLHPAVRVADLL QHINQMKTAEYGFY QEYESFFEGWDASKK	763

hPTP-J	KDKVKGSRQEPMPAY DRHRVKLHPMLGDPN ADYINANYIDGYHRS	945
hPCP-2	KDKVKGSRQEPMPAY DRHRVKLHPMLGDPN ADYINANYIDGYHRS	939
mRPTPλ	KDKLKGGRQEPVSAY DRHHVKLHPMLADPD ADYISANYIDGYHRS	945
mFtp-1	KDKLKGGRQEPVSAY DRHHVKLHPMLADPD ADYISANYIDGYHRS	945
cRPTPλ	KDKTKG-RQDHVSTY DRHRVKLHPLLDPN SDYINANYIDGYHRS	807

Phosphatase-Domäne

hPTP-J	NHFIATQGPKPEMVY DFWRMVWQEHCSIV MITKLVEVGRVKCSR	990
hPCP-2	NHFIATQGPKPEMVY DFWRMVWQEHCSIV MITKLVEVGRVKCSR	984
mRPTPλ	NHFIATQGPKPEMIY DFWRMVWQEQCASIV MITKLVEVGRVKCSR	990
mFtp-1	NHFIATQGPKPEMIY DFWRMVWQEQCASIV MITKLVEVGRVKCSR	990
cRPTPλ	NHFIATQGPKQEMVY DFWRMVWQEHCSIV MITKLVEVGRVKCSR	852

hPTP-J	YWPEDSDTYGDIKIM LVKTETLAEYVVRTF ALERRGYSARHEVRQ	1035
hPCP-2	YWPEDSDTYGDIKIM LVKTETLAEYVVRTF ALERRGYSARHEVRQ	1029
mRPTPλ	YWPEDSDMYGDIKIT LVKTETLAEYVVRTF ALERRGYSARHEVRQ	1035
mFtp-1	YWPEDSDMYGDIKIT LVKTETLAEYVVRTF ALERRGYSARHEVRQ	1035
cRPTPλ	YWPDDSEMYGDIKIT LVKSEMLAEYAVVRTF ALERRGYSARHEVKQ	897

PTP-J	FHFTAWPEHGVPHYA TGLLAFIRRVKASTP PDAGPIVIHCSAGTG	1080
hPCP-2	SHFTAWPEHGVPHYA TGLLAFIRRVKASTP PDAGPIVIHCSAGTG	1074
mRPTPλ	FHFTAWPEHGVPHYA TGLLAFIRRVKASTP PDAGPIVIHCSAGTG	1080
mFtp-1	FHFTAWPEHGVPHYA TGLLAFIRRVKASTP PDAGPIVIHCSAGTG	1080
cRPTPλ	FHFTSWPEHGVPHYA TGLLAFIRRVKASTP PDAGPIVIHCSAGTG	942

hPTP-J	RTGCYIVLDVMLDMA ECEGVVDIYNCVKTL CSRRVNMIQTEEQYI	1125
hPCP-2	RTGCYIVLDVMLDMA ECEGVVDIYNCVKTL CSRRVNMIQTEEQYI	1119
mRPTPλ	RTGCYIVLDVMLDMA ECEGVVDIYNCVKTL CSRRVNMIQTEEQYI	1125
mFtp-1	RTGCYIVLDVMLDMA ECEGVVDIYNCVKTL CSRRVNMIQTEEQYI	1125
cRPTPλ	RTGCYIVLDVMLDMA ECEGVVDIYNCVKTL CSRRINMIQTEEQYI	987

hPTP-J	FIHDAILEACLCGET TIPVSEFKATYKEMI RIDPQSNSSQLREEF	1170
hPCP-2	FIHDAILEACLCGET TIPVSEFKATYKEMI RIDPQSNSSQLREEF	1164
mRPTPλ	FIHDAILEACLCGET TIPVNEFRATYREMI RIDPQSNSSQLREEF	1170
mFtp-1	FIHDAILEACLCGET TIPVNEFKATYREMI RIDPQSNSSQLREEF	1170
cRPTPλ	FIHDAILEACLCGET SIPASEFKPTYKEMV RIEPQSNSSQLREEF	1032

hPTP-J	QTLNSVTPPLDVEEC SIALPRNRDKNRSM DVLPPDRCLPFLIST	1215
hPCP-2	QTLNSVTPPLDVEEC SIALPRNRDKNRSM DVLPPDRCLPFLIST	1209
mRPTPλ	QTLNSVTPPLDVEEC SIALPRNRDKNRSM DVLPPDRCLPFLISS	1215
mFtp-1	QTLNSVTPPLDVEEC SIALPRNRDKNRSM DVLPPDRCLPFLISS	1215
cRPTPλ	QTLNSVTPHLDVEEC SIALPRNRERNRSM DVLPPDRCLPFLISV	1077

Phosphatase-Domäne

hPTP-J	DGDSNNYINAALTDS YTRSAAFIVTLHPLQ STTPDFWRLVYDYGC	1260
hPCP-2	DGDSNNYINAALTDS YTRSAFMVTLHPLQ STTPDFWRLVYDYGC	1254
mRPTPλ	DGDPNNYINAALTDS YTRSAAFIVTLHPLQ STTPDFWRLVYDYGC	1260
mFtp-1	DGDPNNYINAALTDS YTRSAAFIVTLHPLQ STTPDFWRLVYDYGC	1260
cRPTPλ	DGDSNNYINAGLNDS YTKSAAFIVTLHPWR NHTDFWRCVRL----	1118

hPTP-J	TSIVMLNQLNQSNSA WPCLQYWPEPGRQQY GLMEVEFMSGTADED	1305
hPCP-2	TSIVMLNQLNQSNSA WPCLQYWPEPGRQQY GLMEVEFMSGTADED	1299
mRPTPλ	TSIVMLNQLNQSNSA WPCLQYWPEPGRQQY GLMEVEFVSGTANED	1305
mFtp-1	TSIVMLNQLNQSNSA WPCLQYWPEPGRQQY GLMEVEFVSGTANED	1305
cRPTPλ	-----	1118
<hr/>		
hPTP-J	LVARVFRVQNISRLQ EGHLLVRHFQFLRWS AYRDTTPDSKKAFLHL	1350
hPCP-2	LVARVFRVQNISRLQ EGDLLVRHFQFLRWS AYRDTTPDSKKAFLHL	1344
mRPTPλ	LVSrvFRVQNSSRLQ EGHLLVRHFQFLRWS AYRDTTPDSRKAFLHL	1350
mFtp-1	LVSrvFRVQNSSRLQ EGHLLVRHFQFLRWS AYRDTTPDSRKAFLHL	1350
cRPTPλ	-----	1118
<hr/>		
hPTP-J	LAEVDKWQAESGDGR TIVHCLNGGGRSGTF CACATVLEMIRCHNL	1395
hPCP-2	LAEVDKWQAESGDGR TIVHCLNGGGRSGTF CACATVLEMIRCHNL	1389
mRPTPλ	LAEVDKWQAESGDGR TVVHCLNGGGRSGTF CACATVLEMIRCHSL	1395
mFtp-1	LAEVDKWQAESGDGR TVVHCLNGGGRSGTF CACATVLEMIRCHSL	1395
cRPTPλ	-----	1118
<hr/>		
hPTP-J	VDVFFAAKTLRNYKP NMVETMDQYHFCYDV ALEYLEGLESR	1436
hPCP-2	VDVFFAAQTLRNYKP NMVETMDQYHFCYDV ALEYLEGLESR	1430
mRPTPλ	VDVFFAAKTLRNYKP NMVETMDQYHFCYDV ALEYLEALELR	1436
mFtp-1	VDVFFAAKTLRNYKP NMVETMDQYHFCYDV ALEYLEALELR	1436
cRPTPλ	-----	1118

Tab. 16: Sequenzvergleiche von *RPTP λ* in verschiedenen Spezies. Vergleich, der in dieser Arbeit identifizierten Sequenz von *cRPTP λ* mit dem humanen *PTP-J* (NCBI⁵: gi|7439345|), dem humanen *PCP-2* (NCBI: gi|1502343|), *RPTP λ* aus der Maus (NCBI: gi|6755246|) und *Ftp-1* aus der Maus (NCBI: gi|2627027|).

⁵ <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>

6.2. Expression der Konstrukte von *RPTPλ*

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte von *RPTPλ* trugen eine HA-Markierung. Diese Markierung ermöglichte auf Gefrierschnitten von Gewebe den Nachweis, dass *RPTPλ* richtig in die Membran prozessiert wurde. Dazu wurden 3 µg *RPTPλ-pMIW III* mit 0,8 µg *GFP-pMIW III* mit 5x10V Stromstößen in die Mittel- / Hinterhirnregion koelektroporiert (schematische Darstellung Abb. 46B). 24 Stunden nach der Elektroporation wurden die Embryonen fixiert. Gefrierschnitte von der MHR wurden mit α-GFP Antikörper/Alexa 488 (grün) und α-HA Antikörper/Alexa 594 (rot) angefärbt (Abb. 46A).

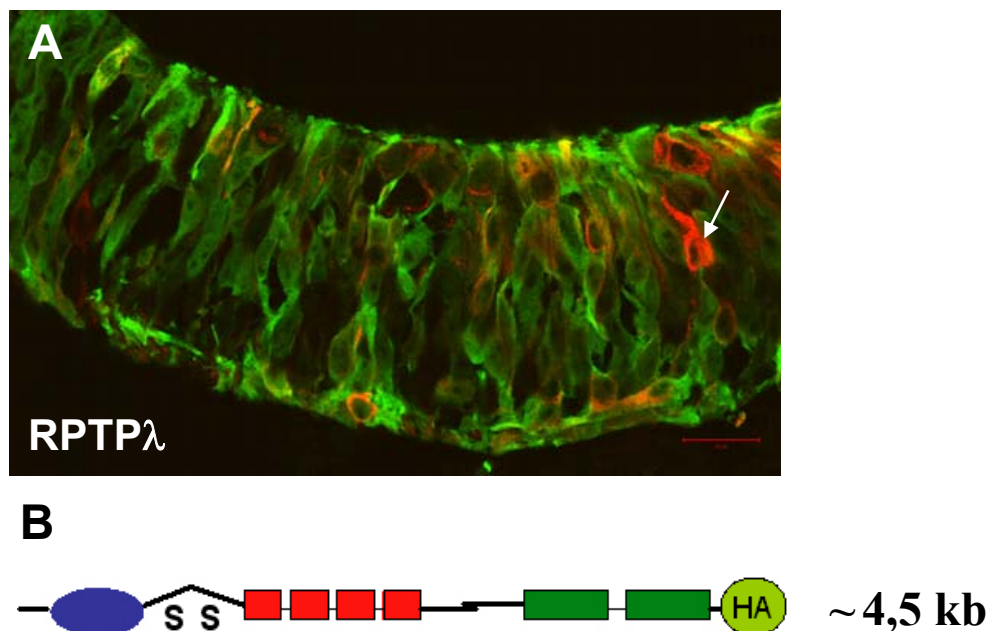


Abb. 57: RPTPλ wird nach *in ovo* Elektroporation richtig in die Membran prozessiert. (A) Expression der Kontrolle GFP (grün) und mRPTPλ (rot) unter den Elektroporationsbedingungen von 5x10V. Das Transmembranprotein RPTPλ wird nach Elektroporation in der MHR in die Membran integriert (Pfeil). (B) Schematische Darstellung von RPTPλ.

Auf gleiche Weise wurden 3 µg *RPTPλΔ2P-pMIW III* mit 0,8 µg *GFP-pMIW III* in die MHR koelektroporiert und die Gefrierschnitte wurden mit α-GFP Antikörper/Alexa 488 (grün) und α-HA Antikörper/Alexa 594 (rot) angefärbt (Abb. 47A). Somit wurde nachgewiesen, dass trotz Deletion der Phosphatasedomänen das Protein RPTPλΔ2P richtig in die Membran prozessiert wurde (schematische Darstellung Abb.47B).

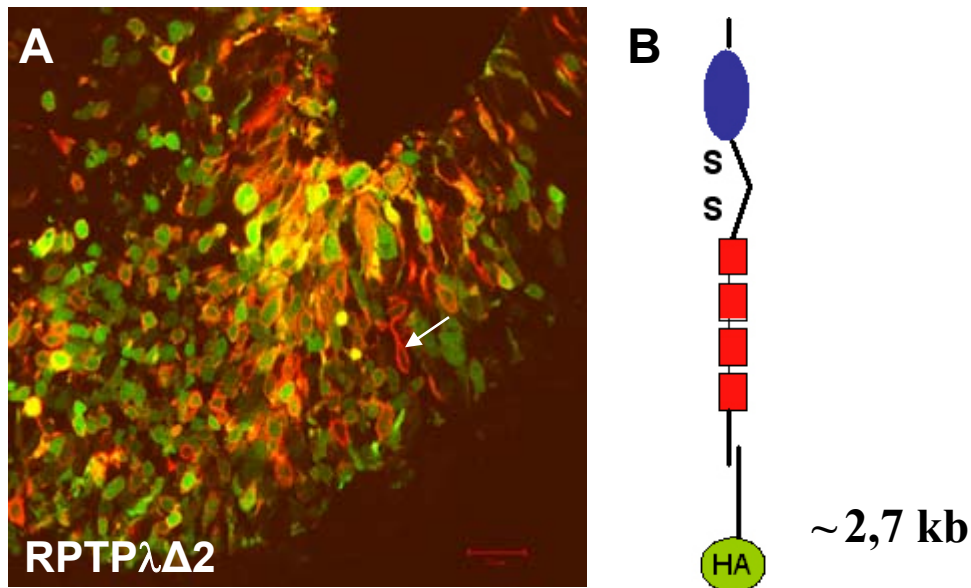


Abb. 58: RPTP $\lambda\Delta 2$ P wird nach Elektroporation in die Membran integriert. (A) Expression der Kontrolle GFP (grün) und mRPTP $\lambda\Delta 2$ P (rot) unter den Elektroporationsbedingungen von 5x10V. Das Transmembranprotein RPTP $\lambda\Delta 2$ P wird nach Elektroporation in der MHR in die Membran integriert (Pfeil). (B) Schematische Darstellung von RPTP $\lambda\Delta 2$ P.

Des Weiteren wurden 2,3 μ g *RPTP $\lambda\Delta JM$ -pMES* in die MHR koelektroporiert und die Gefrierschnitte wurden mit α -HA Antikörper/Alexa 594 (rot) angefärbt (Abb. 48A). Somit wurde nachgewiesen, dass trotz Deletion der Juxtamembrandomäne sowie der Phosphatasedomänen das Protein RPTP λJM richtig in die Membran prozessiert wurde (schematische Darstellung Abb.48B).

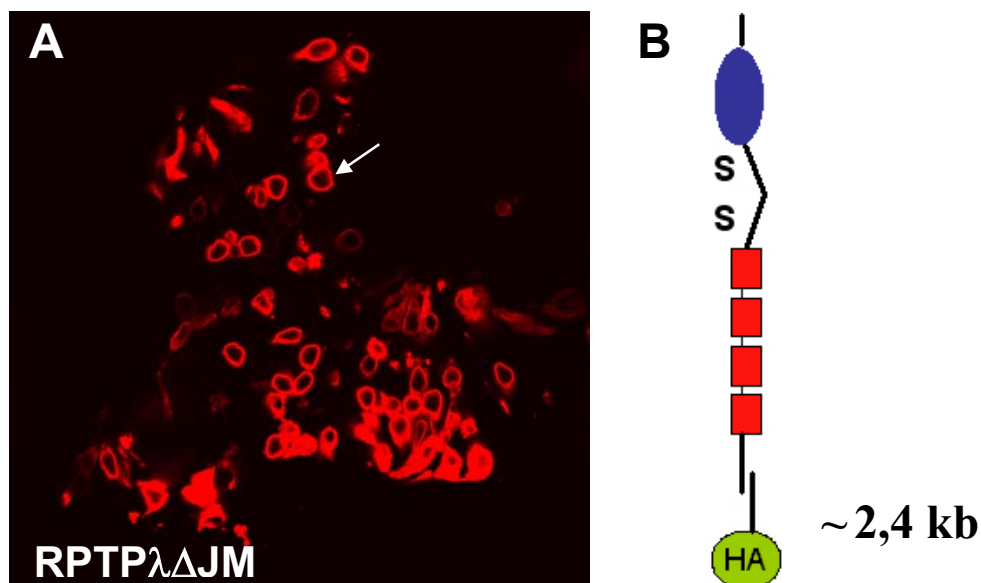


Abb. 59: RPTP $\lambda\Delta JM$ wird nach Elektroporation in die Membran integriert. (A) Expression von mRPTP $\lambda\Delta JM$ (rot) unter den Elektroporationsbedingungen von 5x10V. Das Transmembranprotein RPTP $\lambda\Delta JM$ wird nach Elektroporation in der MHR in die Membran integriert (Pfeil). (B) Schematische Darstellung von RPTP $\lambda\Delta JM$.

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997).** beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO Journal* 16: 3797-3804.
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Simeone, A. (1997).** Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Development* 124: 3639-3650.
- Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I., Busslinger, M. (1992).** Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Development* 6: 1589-1607.
- Adams, K.A., Maida, J.M., Golden, J.A., Riddle, R.D. (2000).** The transcription factor Lmx1b maintains *Wnt1* expression within the isthmic organizer. *Development* 127: 1857-1867.
- Aerne, B., Ish-Horowicz, D. (2004).** Receptor tyrosine phosphatase psi is required for Delta/Notch signalling and cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Development* 131: 3391-3399.
- Aerne, B., Stocker, A., Ish-Horowicz, D. (2003).** Chick receptor tyrosine phosphatase Psi is dynamically expressed during somitogenesis. *Gene Expression Patterns* 3: 325-329.
- Affolter, M., Bellusci, S., Itoh, N., Shilo, B., Thiery, J.P., Werb, Z. (2003).** Tube or not tube: remodeling epithelial tissues by branching morphogenesis. *Developmental Cell* 4: 11-18.
- Agoston, Z. (2005).** Die Rolle von Meis1 und Meis2 bei der Frühentwicklung des ZNS der Wirbeltiere. Diplomarbeit.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T. (2004).** Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117: 699-711.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., Alkalay, I. (2002).** Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & Development* 16: 1066-1076.
- Araki, I., Nakamura, H. (1999).** *Engrailed* defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development* 126: 5127-5135.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J. (1999).** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776.
- Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., Herrmann, B.G. (2003).** *Wnt3a* plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Developmental Cell* 4: 395-406.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998).** *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Aziz, N., Cherwinski, H., McMahon, M. (1999).** Complementation of defective colony-stimulating factor 1 receptor signaling and mitogenesis by Raf and v-Src. *Molecular and Cellular Biology* 19: 1101-1115.
- Bally-Cuif, L., Cholley, B., Wassef, M. (1995).** Involvement of Wnt-1 in the formation of the mes/metencephalic boundary. *Mechanisms of Development* 53: 23-34.
- Balsamo, J., Arregui, C., Leung, T., Lilien, J. (1998).** The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage. *Journal of Cell Biology* 143: 523-532.
- Bártek, J., Lukas, J., Bartkova, J. (1999).** Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *Journal of Pathology* 187: 95-99.

- Beckmann, G., Bork, P. (1993).** An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends in Biochemical Science* 18: 40-41.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. (1996).** Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-642.
- Besco, J., Popesco, M.C., Davuluri, R.V., Frosthalm, A., Rotter, A. (2004).** Genomic structure and alternative splicing of murine R2B receptor protein tyrosine phosphatases (PTP κ , μ , ρ and PCP-2). *BMC Genomics* 5: 14.
- Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., Kageyama, R. (2003).** Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes Development* 17: 1451-1456.
- Bixby, J.L. (2001).** Ligands and signaling through receptor-type tyrosine phosphatases. *IUBMB Life* 51: 157-163.
- Blanchetot, C., den Hertog, J. (2000).** Multiple interactions between receptor protein-tyrosine phosphatase (RPTP) alpha and membrane-distal protein-tyrosine phosphatase domains of various RPTPs. *Journal of Biological Chemistry* 275: 12446-12452.
- Blaschuk, O.W., Pouliot, Y., Holland, P.C. (1990).** Identification of a conserved region common to cadherins and influenza strain A hemagglutinins. *Journal of Molecular Biology* 211: 679-82.
- Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A.S., Hondermarck, H., Nurcombe, V., le Bourhis, X. (2000).** FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Review* 11: 295-302.
- Bouchard, M., Grote, D., Craven, S.E., Sun, Q., Steinlein, P., Busslinger, M. (2005).** Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Development* 132: 2633-43.
- Bonvini, P., An, W.G., Rosolen, A., Nguyen, P., Trepel, J., Garcia de Herreros, A., Dunach, M., Neckers, L.M. (2001).** Geldanamycin Abrogates ErbB2 Association with Proteasome-resistant β -Catenin in Melanoma Cells, Increases β -Catenin-E-Cadherin Association, and Decreases β -Catenin-sensitive Transcription. *Cancer Research* 61: 1671-1677.
- Brady-Kalnay, S.M., Mourton, T., Nixon, J.P., Pietz, G.E., Kinch, M., Chen, H., Brackenbury, R., Rimm, D.L., Del Vecchio, R.L., Tonks, N.K. (1998).** Dynamic interaction of PTP μ with multiple cadherins in vivo. *Journal of Cell Biology* 141: 287-296.
- Brady-Kalnay, S.M., Rimm, D.L., Tonks, N.K. (1995).** Receptor protein tyrosine phosphatase PTP μ associates with cadherins and catenins in vivo. *Journal of Cell Biology* 130: 977-986.
- Brady-Kalnay, S.M., Tonks, N.K. (1995).** Protein tyrosine phosphatases as adhesion receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 650-657.
- Braisted, J.E., McLaughlin, T., Wang, H.U., Friedman, G.C., Anderson, D.J., O'Leary, D.D. (1997).** Graded and lamina-specific distributions of ligands of EphB receptor tyrosine kinases in the developing retinotectal system. *Developmental Biology* 191: 14-28.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D.H., McMahon, A.P., Sommer, L., Boussadia, O., Kemler, R. (2001).** Inactivation of the β -catenin gene by *Wnt1*-Cre-mediated deletion results in dramatic malformation and failure of craniofacial development. *Development* 128: 1253-1264.
- Broccoli, V., Boncinelli, E., Wurst, W. (1999).** The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature* 401: 164-168.
- Bruhn, S.L., Cepko, C.L. (1996).** Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *Journal of Neuroscience* 16: 1430-1439.

- Burden-Gulley, S.M., Brady-Kalnay, S.M. (1999).** PTPmu regulates N-cadherin-dependent neurite outgrowth. *Journal of Cell Biology* 144: 1323-1336.
- Bürglin, T. (1997).** Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Research* 25: 4173-4180.
- Cadigan, K.M., Nusse, R. (1997).** Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development* 11: 3286-3305.
- Camus, A., Davidson, B. P., Billiards, S., Khoo, P., Rivera-Perez, J. A., Wakamiya, M., Behringer, R. R. and Tam, P. P. (2000).** The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo. *Development* 127: 1799-1813.
- Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., Martin, G.R. (2003).** The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130: 2633-2644.
- Chen, C.M., Cepko, C.L. (2000).** Expression of Chx10 and Chx10-1 in the developing chicken retina. *Mechanisms of Development* 90: 293-297.
- Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., Flanagan, J.G. (1995).** Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82: 371-381.
- Christen, B., Slack, J.M. (1999).** Spatial response to fibroblast growth factor signalling in *Xenopus* embryos. *Development* 126: 119-125.
- Corson, L.B., Yamanaka, Y., Lai, K.M., Rossant, J. (2003).** Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130: 4527-4537.
- Crossley, P.H., Martin, G.R. (1995).** The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121: 439-451.
- Crossley, P.H., Martinez, S., Martin, G.R. (1996a).** Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380: 66-68.
- Crossley, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A., Martin, G.R. (1996b).** Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84: 127-136.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., Basilico, C. (2005).** Mechanisms underlying differential responses to FGF signalling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 233-247.
- Danielian, P.S., McMahon, A.P. (1996).** Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 383: 332-334.
- DeVore, D.L., Horvitz, H.R., Stern, M.J. (1995).** An FGF receptor signaling pathway is required for the normal cell migrations of the sex myoblasts in *C. elegans* hermaphrodites. *Cell* 83: 611-620.
- Dickinson, M.E., Krumlauf, R., McMahon, A.P. (1994).** Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120: 1453-1471.
- Doherty, P., Walsh, F.S. (1994).** Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Current Opinion in Neurobiology* 4: 49-55.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., Bonhoeffer, F. (1995).** In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82: 359-370.

- Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., Moon, R.T. (1995).** Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Molecular Cell Biology* 15: 2625-2634.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., Mc-Mahon, J.A., McMahon, A.P. (1993).** Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-1430.
- Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., Martínez, S. (2003).** Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Research Reviews* 43: 179-191.
- Engelkamp, D., Rashbass, P., Seawright, A., van Heyningen, V. (1999).** Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 126: 3585-3596.
- Ernsberger, U., Patzke, H., Rohrer, H. (1997).** The developmental expression of choline acetyltransferase (ChAT) and the neuropeptide VIP in chick sympathetic neurons: evidence for different regulatory events in cholinergic differentiation. *Mechanisms of Development* 68: 115-126.
- Feldheim, D.A., Kim, Y.I., Bergemann, A.D., Frisen, J., Barbacid, M., Flanagan, J.G. (2000).** Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25:563-74.
- Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., Engelhardt, J.F. (2002).** Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *Journal of Biological Chemistry* 277: 33398-410.
- Finkelstein, R., Perrimon, N. (1990).** The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development. *Nature* 346: 485-8.
- Freemont, A.J. (1998).** Adhesion molecules. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 51: 175-184.
- Frisen, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D., Barbacid, M. (1998).** Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20: 235-243.
- Fuchs, M., Wang, H., Ciossek, T., Chen, Z., Ullrich, A. (1998).** Differential expression of MAM-subfamily protein tyrosine phosphatases during mouse development. *Mechanisms of Development* 70: 91-109.
- Funahashi, J., Okafuji, T., Ohuchi, H., Noji, S., Tanaka, H., Nakamura, H. (1999).** Role of *Pax-5* in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Developmental Growth Differentiation* 41: 59-72.
- Fürthauer, M., Lin, W., Ang, S.L., Thisse, B., Thisse, C. (2002).** Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Nature Cell Biology* 4: 170-174.
- Gabay, L., Seger, R., Shilo, B.Z. (1997).** In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* 227: 1103-1106.
- Gaiano, N., Fishell, G. (2002).** The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annual Review of Neuroscience* 25: 471-490.
- Gardner, V.A., Barald, K.F. (1992).** Expression patterns of Ebgrailed-like proteins in the chick embryo. *Development Dynamics* 193: 370-388.
- Garda, A.L., Echevarria, D., Martínez, S. (2001).** Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmus organizer. *Mechanisms of Development* 101: 111-118.

- Gebbink, M.F., Zondag, G.C., Wubbolts, R.W., Beijersbergen, R.L., van Etten, I., Moolenaar, W.H. (1993).** Cell-cell adhesion mediated by a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 268: 16101-16104.
- Gil, O.D., Zanazzi, G., Struyk, A.F., Salzer J.L. (1998).** Neurotrimin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via haemophilic and heterophilic interactions. *Journal of Neuroscience* 18: 9312-9325.
- Gumbiner, B.M. (2000).** Regulation of cadherin adhesive activity. *Journal of Cell Biology* 148: 399-404.
- Guy, G.R., Wong, E.S., Yusoff, P., Chandramouli, S., Lo, T.L., Lim, J., Fong, C.W. (2003).** Sprouty: how does the branch manager work? *Journal of Cell Science* 116: 3061-3068.
- Haj, F., McKinnell, I., Stoker, A. (1999).** Retinotectal ligands for the receptor tyrosine phosphatase CRYPalpha. *Molecular and Cellular Neuroscience* 14: 225-240.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L. (1992).** A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental Dynamics* 195: 231-272.
- Han, K., Manley, J.L. (1993).** Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *EMBO Journal* 12: 2723-2733.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., Nishida, E. (2002).** Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature Cell Biology* 4: 850-858.
- Hanks, M.C., Loomis, C.A., Harris, E., Tong, C.X., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A., Joyner, A.L. (1998).** *Drosophila engrailed* can substitute for mouse *Engrailed1* function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* 125: 4521-4530.
- Hartmann, C., Tabin, C.J. (2000).** Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 127: 3141-3159.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., Kageyama, R. (2004).** Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131: 5539-50.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1998).** Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 28: 1509-12.
- He, X., Saint-Jeannet, J.P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I., Varmus, H. (1997).** A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* 275: 1652-1654.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C.Y., Wylie, C. (1994).** Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79: 791-803.
- Hellberg, C.B., Burden-Gulley, S.M., Pietz, G.E., Brady-Kalnay, S.M. (2002).** Expression of the receptor protein-tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin-dependent adhesion in human prostate carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 277: 11165-11173.
- Hidalgo-Sánchez, M., Millet, S., Simeone, A., Alvarado-Mallart, R.M., (1999).** Comparative analysis of *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*, *Fgf8* and *Wnt1* gene expressions during the formation of the chick midbrain/hindbrain domain. *Mechanisms of Development* 81: 175-178.
- Hildago-Sánchez, M., Simone, A., Alvarado-Mallart, R.M., (1999).** *Fgf8* and *Gbx2* induction concomitant with *Otx2* repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development* 126: 3191-3203.

- Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., O'Leary, D.D.M. (2002).** EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* 35: 475-487.
- Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A.J., Nye, J.S., Conlon, R.A., Mak, T.W., Bernstein, A., van der Kooy, D. (2002).** Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes & Development* 16: 846-858.
- Hoffmann, K.M., Tonks, N.K., Barford, D. (1997).** The crystal structure of domain 1 of receptor protein-tyrosine phosphatase mu. *Journal of Biological Chemistry* 272: 27505-27508.
- Hollyday, M., McMahon, J.A., McMahon, A.P. (1995).** Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mechanisms of Development* 52: 9-25.
- Honjo, T. (1996).** The shortest path from the surface to the nucleus: RBP-J κ /Su(H) transcription factor. *Genes Cells* 1: 1-9.
- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F., Waterman, M.L. (2001).** Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature Genetics* 28: 53-7.
- Hurley, M.M., Marcello, K., Abreu, C., Kessler, M. (1996).** Signal transduction by basic fibroblast growth factor in rat osteoblastic P1a cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 1256-1263.
- Ichijo, H., Fujita, S., Matsuno, T., Nakamura, H. (1990).** Rotation of the tectal primordium reveals plasticity of target recognition in retinotectal projection. *Development* 110: 331-42.
- Ingham, P.W., McMahon, A.P. (2001).** Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development* 15: 3059-3087.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Irving, C., Mason, I. (1999).** Regeneration of isthmus tissue is the result of a specific and direct interaction between rhombomere 1 and midbrain. *Development* 126: 3981-3989.
- Ishibashi, M., McMahon, A.P. (2002).** A sonic hedgehog-dependent signalling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Development* 129: 4807-4819.
- Itasaki, N., Ichijo, H., Hama, C., Matsuno, T., Nakamura, H. (1991).** Establishment of rostrocaudal polarity in tectal primordium: engrailed expression and subsequent tectal polarity. *Development* 113:1133-44.
- Itasaki, N., Nakamura, H. (1992).** Rostrocaudal polarity of the tectum in birds: correlation of en gradient and topographic order in retinotectal projection. *Neuron* 8:787-98.
- Itasaki N, Nakamura H. (1996).** A role for gradient en expression in positional specification on the optic tectum. *Neuron* 16:55-62.
- Jamora, C., Fuchs, E. (2002).** Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 4: E101-108.
- Jessell T.M. (2000).** Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature Reviews Genetics* 1: 20-29.
- Jessell, T.M., Sanes, J.R. (2000).** Development. The decade of the developing brain. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 599-611.

- Jiang, Y.J., Aerne, B.L., Smithers, L., Haddon, C., Ish-Horowicz, D., Lewis, J. (2000).** Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* 408: 475-479.
- Jiang, Y.P., Wang, H., D'Eustachio, P., Musacchio, J.M., Schlessinger, J., Sap, J. (1993).** Cloning and characterization of R-PTP-kappa, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family with a proteolytically cleaved cellular adhesion molecule-like extracellular region. *Molecular Cell Biology* 13: 2942-2951.
- Johnson, K.G., Van Vactor, D. (2003).** Receptor protein tyrosine phosphatases in nervous system development. *Physiological Reviews* 83: 1-24.
- Johnson, D.E., Williams, L.T. (1993).** Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advanced Cancer Research* 60: 1-41.
- Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-Horowicz, D., Pourquié, O. (2000).** Notch signalling is required for cyclic expression of the *hairy*-like gene *HES1* in the presomitic mesoderm. *Development* 127: 1421-1429.
- Joyner, A.L., Liu, A., Millet, S. (2000).** *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 736-741.
- Jungbluth, S., Phelps, C., Lumsden, A. (2001).** CEPU-1 expression in the early embryonic chick brain. *Mechanisms of Development* 101: 195-197.
- Kageyama, R., Nakanishi, S. (1997).** Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Current Opinion in Genetic Development* 7: 659-665.
- Katahira, T., Sato, T., Sugiyama, S., Okafuji, T., Araki, I., Funahashi, J., Nakamura, H. (2000).** Interaction between *Otx2* and *Gbx2* defines the organizing center for the optic tectum. *Mechanisms of Development* 91: 43-52.
- Kikuchi, A. (2000).** Regulation of β -Catenin Signaling in the Wnt Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268: 243-248.
- Kimura, J., Katahira, T., Araki, I., Nakamura, H. (2004).** Possible role of *Hes5* for the rostrocaudal polarity formation of the tectum. *Developmental Growth & Differentiation* 46: 219-27.
- Kimura, Y., Katoh, A., Kaneko, T., Takahama, K., Tanaka, H. (2001).** Two members of the IgLON family are expressed in a restricted region of the developing chick brain and neural crest. *Developmental Growth & Differentiation* 43: 257-63.
- Kokel, M., Borland, C.Z., DeLong, L., Horvitz, H.R., Stern, M.J. (1998).** *clr-1* encodes a receptor tyrosine phosphatase that negatively regulates an FGF receptor signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development* 12: 1425-1437.
- Krauss, S., Concordet, J.-P., Ingham, P.W. (1993).** A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hedgehog* is expressed in tissues with polarising activity in zebrafish embryos. *Cell* 75: 1431-1444.
- Kubo, F., Takeichi, M., Nakagawa, S. (2003).** *Wnt2b* controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* 130: 587-598.
- Kuhl, M., Finnemann, S., Binder, O., Wedlich, D. (1996).** Dominant negative expression of a cytoplasmically deleted mutant of XB/U-cadherin disturbs mesoderm migration during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Mechanisms of Development* 54: 71-82.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T. (2000).** The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in Genetics* 16: 279-283.

- Kunz, M., Herrmann, M., Wedlich, D., Gradl, D. (2004).** Autoregulation of canonical Wnt signaling controls midbrain development. *Developmental Biology* 273: 390-401.
- Kypta, R.M., Su, H., Reichardt, L.F. (1996).** Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *Journal of Cell Biology* 134: 1519-1529.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laufer, E., Nelson, C.E., Johnson, R.L., Morgan, B.A., Tabin, C. (1994).** Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signalling cascade and feedback loop to intergrade growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79: 993-1003.
- LaVail, J.H., Cowan, W.M. (1971).** The development of the chick optic tectum. II. Autoradiographic studies. *Brain Research* 28: 421-441.
- Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R., Pouyssegur, J. (1996).** Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry* 271: 20608-20616.
- Lee, S.M., Danielian, P.S., Fritsch, B., McMahon, A.P. (1997).** Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development* 124: 959-969.
- Lewis, P.M., Dunn, M.P., McMahon, J.A., Logan, M., Martin, J.F., St-Jacques, B., McMahon, A.P. (2001).** Cholesterol modifications of sonic hedgehog is required for long-range signalling activity and effective modulation of signalling by Ptc1. *Cell* 105: 599-612.
- Li, J.Y., Joyner, A.L. (2001).** Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development* 128: 4979-4991.
- Lilien, J., Balsamo, J., Arregui, C., Xu, G. (2002).** Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. *Developmental Dynamics* 224: 18-29.
- Liem, K.F. Jr., Tremml, G., Jessel, T.M. (1997).** A role for the roof plate and its resident TGF β -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91: 127-138.
- Liem, K.F. Jr., Tremml, G., Roelink, H., Jessel, T.M. (1995).** Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82: 969-979.
- Liu, A., Joyner, A.L. (2001a).** EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development* 128: 181-191.
- Liu, A., Joyner, A.L. (2001b).** Early anterior / posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annual Reviews of Neuroscience* 24: 869-896.
- Liu, A., Li, J.Y.H., Bromleigh, C., Lao, Z., Niswander, L.A., Joyner, A.L. (2003).** FGF17 and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Development* 130: 6175-6185.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X. (2002).** Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108: 837-847.
- Lodge, A.P., McNamee, C.J., Howard, M.R., Reed, J.E., Moss, D.J. (2001).** Identification and characterization of CEPU-Se-A secreted isoform of the IgLON family protein, CEPU-1. *Molecular and Cellular Neurosciences* 17: 746-60.

- Logan, A., Logan, S.D. (1991).** Studies on the mechanisms of signalling and inhibition by pertussis toxin of fibroblast growth factor-stimulated mitogenesis in Balb/c 3T3 cells. *Cellular Signalling* 3: 215-223.
- Logan, C., Wizenmann, A., Drescher, U., Monschau, B., Bonhoeffer, F., Lumsden, A. (1996).** Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic engrailed expression. *Current Opinion in Biology* 6: 1006-1014.
- Lukás, Z., Dvorák, K. (2004).** Adhesion Molecules in Biology and Oncology. *Acta Vet. Brno* 73: 93-104.
- Lumsden, A., Krumlauf, R. (1996).** Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274: 1109-15.
- MacArthur, C.A., Lawshe, A., Shankar, D.B., Heikinheimo, M., Shackelford, G.M. (1995).** FGF-8 isoforms differ in NIH3T3 cell transforming potential. *Cellular Growth & Differentiation* 6: 817-825.
- Maeda, R., Ishimura, A., Mood, K., Park, E.K., Buchberg, A.M., Daar, I.O. (2002).** *Xpbx1b* and *Xmeis1b* play a collaborative role in hindbrain and neural crest gene expression in *Xenopus* embryos. *PNAS U.S.A.* 99: 5448-5453.
- Mann, F., Ray, S., Harris, W., Holt, C. (2002).** Topographic mapping in dorsoventral axis of the *Xenopus* retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. *Neuron* 35: 461-473.
- Mann, R.S., Affolter, M. (1998).** Hox proteins meet more partners. *Current Opinion in Genetics and Development* 8: 423-429.
- Marg, A., Sirim, P., Spaltmann, F., Plagge, A., Kauselmann, G., Buck, F., Rathjen, F.G., Brummendorf, T. (1999).** Neurotractin, a novel neurite outgrowth-promoting Ig-like protein that interacts with CEPU-1 and LAMP. *Journal of Cell Biology* 145: 865-876.
- Marsden, M., DeSimone, D.W. (2003).** Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*. *Current Biology* 13: 1182-1191.
- Marti, E., Takada, R., Bumvrot, D.A., Sasaki, H., McMahon, A.P. (1995).** Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* 121: 2537-2547.
- Martínez-Barbera, J.P., Signore, M., Boyl, P.P., Puelles, E., Acampora, D., Gogoi, R., Schubert, F., Lumsden, A., Simeone, A. (2001).** Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2. *Development* 128: 4789-4800.
- Martinez-Morales, J.-R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P., Wittbrodt, J. (2005).** Differentiation of the Vertebrate Retina Is Coordinated by an FGF Signaling Center. *Developmental Cell* 8: 565-574.
- Martínez, S. (2001).** The isthmic organizer and brain regionalization. *International Journal of Developmental Biology* 44: 367-371.
- Martínez, S., Alvarado-Mallart, R.M. (1990).** Expression of the homeobox chicken gene in chick/quail chimeras with inverted mes-metencephalic grafts. *Developmental Biology* 139: 432-436.
- Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L., Martin, G.R. (1999).** FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development* 126: 1189-200.
- Martínez, S., Marin, F., Nieto, M.A., Puelles, L. (1995).** Induction of ectopic Engrailed expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental boundaries as barriers. *Mechanisms of Development* 51: 289-303.
- Maroto, M., Pourquié, O. (2001).** A molecular clock involved in somite segmentation. *Current Topics in Developmental Biology* 51: 221-248.

- Maruoka, Y., Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Itoh, N., Hogan, B.L., Furuta, Y. (1998).** Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 74: 175-177.
- Massague, J., Blain, S.W., Lo, R.S. (2000).** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309.
- Matsunaga, E., Katahira, T., Nakamura, H. (2002).** Role of Lmx1b and Wnt1 in mesencephalon and metencephalon development. *Development* 129: 5269-5277.
- McMahon, A.P., Bradley, A. (1990).** The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-1085.
- McMahon, A.P., Joyner, A.L., Bradley, A., McMahon, J.A. (1992).** The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69: 581-595.
- Megason, S.G., McMahon, A.P. (2002).** A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129: 2087-2098.
- Meyers, E.N., Lewandoski, M., Martin, G.R. (1998).** An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics* 18: 136-141.
- Millen, K.J., Wurst, W., Herrup, K., Joyner, A.L. (1994).** Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Wnt-2 mutants. *Development* 120: 695-706.
- Miller J.R. (2002).** The Wnts. *Genome Biology* 3: reviews 3001.1.-3001.15.
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D.J., Losos, K., Harris, E., Joyner, A.L. (1999).** A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401: 161-164.
- Mittal, V. (2004).** Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature Reviews Genetics* 5: 355-365.
- Miyagawa, T., Amanuma, H., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (1996).** Specification of posterior midbrain region in zebrafish neuroepithelium. *Genes Cell* 1: 369-377.
- Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., Yasuda, K. (1999).** Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development Growth & Differentiation* 41: 335-344.
- Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M.R., Loschinger, J., Pasquale, E.B., Siever, D.A., Verderame, M.F., Muller, B.K., Bonhoeffer, F., Drescher, U. (1997).** Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO Journal* 16:1258-67.
- Moore, Keith L. and T.V.N. Persaud. (1993).** *The Developing Human*, 5th ed. p. 135. W.B. Saunders co., Philadelphia.
- Müller, T., Choidas, A., Reichmann, E., Ullrich, A. (1999).** Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10173-10183.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M. (1988).** Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmatic domain. *EMBO Journal* 7: 3679-3684.
- Nakamura, H., Takagi, S., Toshiaki, T., Matsui, K. A., Fujisawa, H. (1988).** The prosencephalon has the capacity to differentiate into the optic tectum: Analysis by chick-specific monoclonal antibodies in quail-chick chimeric brains. *Development Growth & Differentiation* 30: 717-725.

- Nam, H.J., Poy, F., Krueger, N.X., Saito, H., Frederick, C.A. (1999).** Crystal structure of the tandem phosphatase domains of RPTP LAR. *Cell* 97: 449-457.
- Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., Kloep, S., Samulowitz, U., Fachinger, G., Golding, M., Shima, D.T., Deutsch, U., Vestweber, D. (2002).** VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO Journal* 21: 4885-4895.
- Nelson, W.J., Nusse, R. (2004).** Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science Review* 303: 1483-1487.
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G.R., Tickle, C. (1994).** A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 371: 609-612.
- Nusse, R. (1992).** The Wnt gene family in tumorigenesis and in normal development. *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology* 43: 9-12.
- Nusse, R., Varmus, H.E. (1982).** Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99-109.
- Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N., Takada, S. (2002).** FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes & Development* 16: 870-879.
- Ohuchi, H., Kimura, S., Watamoto, M., Itoh, N. (2000).** Involvement of fibroblast growth factor (FGF)18-FGF8 signaling in specification of left-right asymmetry and brain and limb development of the chick embryo. *Mechanisms of Development* 95: 55-66.
- Olander, S., Nordstrom, U., Patthey, C., Edlund, T. (2006).** Convergent Wnt and FGF signaling at the gastrula stage induce the formation of the isthmic organizer. *Mechanisms of development* 122: 166-176.
- Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R. (1989).** The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO Journal* 8: 1711-1717.
- Panhuysen, M., Vogt Weisenhorn, D.M., Blanquet, V., Brodski, C., Heinzmann, U., Beisker, W., Wurst, W. (2004).** Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Molecular and Cellular Neuroscience* 26: 101-111.
- Papkoff, J. (1995).** Identification and biochemical characterization of secreted Wnt-1 protein from P19 embryonal carcinoma cells induced to differentiate along the neuroectodermal lineage. *Oncogene* 9: 313-317.
- Park, S., Frisen, J., Barbacid, M. (1997).** Aberrant axonal projections in mice lacking EphA8 (Eek) tyrosine protein kinase receptors. *EMBO Journal* 16: 3106-14.
- Peifer, M., Wieschaus (1990).** The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin *Cell* 63: 1167-1178.
- Perron, M., Harris, W.A. (2000).** Retinal stem cells in vertebrates. *BioEssays* 22: 685-688.
- Petrone, A., Sap, J. (2000).** Emerging issues in receptor protein tyrosine phosphatase function: lifting fog or simply shifting? *Journal of Cell Science* 113: 2345-2354.
- Petropoulos, C.J., Hughes, S.H. (1991).** Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells. *Journal of Virology* 65: 3728-3737.

- Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H.G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A., Dunach, M. (2003).** p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Molecular and Cellular Biology* 23: 2287-2297.
- Rattis, F.M., Voermans, C., Reya, T. (2004).** Wnt signaling in the stem cell niche. *Current opinion in Hematology* 11: 88-94.
- Reh, T.A., Levine, E.M. (1998).** Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *Journal of Neurobiology* 36: 206-220.
- Reichert H, Simeone A. (1999).** Conserved usage of gap and homeotic genes in patterning the CNS. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 589-95.
- Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E.C., Crossley, P.H., Stainier, D.Y., Brand, M. (1998).** Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* 125: 2381-2395.
- Rhinn, M., Dierich, A., Le Meur, M., Ang, S. (1999).** Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development* 126: 4295-4304.
- Riddle, R.D., Johnson, R., Laufer, E., Tabin, C. (1993).** Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.
- Rimerman, R.A., Gellert-Randleman, A., Diehl, J.A. (2000).** Wnt1 and MEK1 cooperates to promote cyclin D1 accumulation and cellular transformation. *Journal of Biological Chemistry* 275: 14736-14742.
- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D., Morrow, J.S. (1995).** Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *PNAS U.S.A.* 92: 8813-8817.
- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A. (1995).** Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81: 445-455.
- Rommel, C., Hafen, E. (1998).** Ras--a versatile cellular switch. *Current Opinion in Genetic Development* 8: 412-418.
- Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., Clevers, H. (1999).** Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 285: 1923-6.
- Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. (2003).** CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research* 31: 3763-3766.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M., Henikoff, S. (1998).** Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research* 26: 1628-1635.
- Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A., Dunach, M. (1999).** Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 274: 36734-36740.
- Ruiz i Altaba, A. (1998).** Deconstructing the organizer. *Nature* 391: 348-349.
- Salic, A., Lee, E., Mayer, L., Kirschner, M.W. (2000).** Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell* 5: 523-532.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1992).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24: 104-108.
- Sanson, B., White, P., Vincent, J.P. (1996).** Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 383: 627-630.
- Sato, T., Araki, I., Nakamura, H. (2001).** Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Development* 128: 2461-2469.
- Sato, T., Joyner, A.L., Nakamura, H. (2004).** How does Fgf signaling from the isthmus organizer induce midbrain and cerebellum development? *Development Growth & Differentiation* 46: 487-494.
- Sato, T., Nakamura, H. (2004).** The Fgf8 signal causes cerebellar differentiation by activating the Ras-ERK signaling pathway. *Development* 131: 4275-4285.
- Scherr, M., Morgan, M.A., Eder, M. (2003).** Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Current medicinal chemistry* 10: 245-256.
- Schlessinger, J. (2000).** Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225.
- Scholpp, S., Groth, C., Lohs, C., Lardelli, M., Brand, M. (2004).** Zebrafish fgfr1 is a member of the fgf8 synexpression group and is required for fgf8 signalling at the midbrain-hindbrain boundary. *Development genes and evolution* 214: 285-295.
- Schulte, D., Cepko, C.L. (2000).** Two homeobox genes define the domain of EphA3 expression in the developing chick retina. *Development* 127: 5033-5045.
- Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C., Kornberg, T.B. (1995).** Analysis of *cubitus interruptus* regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks. *Development* 121: 1626-1625.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D. (2003).** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M., Gruss, P. (1997).** Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *PNAS U.S.A.* 94: 14518-14523.
- Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kuhl, M., Schaeffer, H.J., Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M., Birchmeier, W. (2002).** The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes & Development* 16: 2073-2084.
- Selkoe, D., Kopan, R. (2003).** Notch and presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual Review of Neuroscience* 26: 565-597.
- Serrano, N., Maschat, F. (1998).** Molecular mechanism of *polyhomeotic* activation by Engrailed, *EMBO Journal* 17: 3704-3713.
- Shamim, H., Mahmood, R., Logan, C., Doherty, P., Lumsden, A., Mason, I. (1999).** Sequential roles for Fgf4, En1 and Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain. *Development* 126: 945-959.
- Shinya, M., Koshida, S., Sawada, A., Kuroiwa, A., Takeda, H. (2001).** Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development* 128: 4153-4164.
- Siegler, M.V.S., Jia, X.X. (1999).** Engrailed negatively regulates the expression of cell adhesion molecules Connectin und Neuroglian in embryonic *Drosophila* nervous system. *Neuron* 22: 265-276.

- Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B., Moon, R.T. (1997).** Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Developmental Biology* 182: 114-120.
- Smolich, B.D., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Papkoff, J. (1993).** Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Molecular Biology of Cell*. 4: 1267-1275.
- Sokol, S., Christian, J.L., Moon, R.T., Melton, D.A. (1991).** Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* 67: 741-752.
- Sommer, L., Rao, M., Anderson, D.J. (1997).** RPTP δ and the novel protein tyrosine phosphatase RPTP ψ are expressed in restricted regions of the developing central nervous system. *Developmental Dynamics* 208: 48-61.
- Spaltmann, F., Brümmendorf, T. (1996).** CEPU-1, a Novel Immunoglobulin Superfamily molecule, Is Expressed by Developing Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience* 16: 1770-1779.
- Spemann, H., Mangold, H. (1924).** Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilh. Roux Arch. Entw. Mech., Organ.* 100: 599-638.
- Su, W.C., Kitagawa, M., Xue, N., Xie, B., Garofalo, S., Cho, J., Deng, C., Horton, W.A., Fu, X.Y. (1997).** Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* 386: 288-292.
- Suda, Y., Matsuo, I., Aizawa, S. (1997).** Cooperation between *Otx1* and *Otx2* genes in developmental patterning of rostral brain. *Mechanisms of Development* 69: 125-141.
- Suemori, H., Kadodawa, Y., Goto, K., Araki, I., Kondoh, H., Nakatsuji, N. (1990).** A mouse embryonic stem cell line showing pluripotency of differentiation in early embryos and ubiquitous beta-galactosidase expression. *Cell Differentiation in Development* 29: 181-186.
- Sugiyama, S., Funahashi, J., Nakamura, H. (2000).** Antagonizing activity of chick *Grg4* against tectum-organizing activity. *Developmental Biology* 221: 168-80.
- Sun, Q.L., Wang, J., Bookman, R.J., Bixby, J.L. (2000).** Growth cone steering by receptor tyrosine phosphatase delta defines a distinct class of guidance cue. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16: 686-695.
- Sun, X., Meyers, E.N., Lewandoski, M., Martin, G.R. (1999).** Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes & Development* 13: 1834-1846.
- Sutherland, D., Samakovlis, C. and Krasnow, M. A. (1996).** Branchless encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87: 1091-1101.
- Swartz, M.E., Eberhart, J., Pasquale, E.B., Krull, C.E. (2001).** EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. *Development* 128: 4669-4680.
- Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H. (2006).** Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development* 133: 297-306.
- Tetsu, O., McCormick, F. (1999).** Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-6.
- Thanos, S., Mey, J. (2001).** Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Research Reviews* 35: 205-45.
- Thiery, J.P. (2002).** Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 2: 442-454.

- Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1990).** Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346: 847-850.
- Thomas, K.R., Musci, T.S., Neumann, P.E., Capecchi, M.R. (1991).** *Swaying* is a mutant allele of the proto-oncogene *Wnt1*. *Cell* 67: 969-976.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L., Moon, R.T. (1996).** Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *Journal of Cell Biology* 133: 1123-1137.
- Trokovic, R., Trokovic, N., Hernesniemi, S., Pirvola, U., Vogt Weisenhorn, D.M., Rossant, J., McMahon, A.P., Wurst, W., Partanen, J. (2003).** FGFR1 is independently required in both developing mid- and hindbrain for sustained response to isthmic signals. *EMBO Journal* 22: 1811-1823.
- Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T., Dawid, I.B. (2002).** Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nature Cell Biology* 4: 165-169.
- Umbhauer, M., Penzo-Méndez, A., Clavilier, L., Boucaut, J.-L., Riou, J.-F. (2000).** Signaling specificities of fibroblast growth factor receptors in early *Xenopus* embryo. *Journal of Cell Science* 133: 2865-2875.
- Urbanek, P., Fetka, I., Meisler, M.H., Busslinger, M. (1997).** Cooperation of Pax2 and Pax5 in midbrain and cerebellum development. *PNAS U.S.A.* 94: 5703-5708.
- van Es, J.H., Clevers, H. (2005).** Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends in Molecular Medicine* 11: 496-502.
- Van Hateren, N., Belsham, A. Randall, V., Borycki, A.G. (2005).** Expression of avian Groucho-related genes (Grgs) during embryonic development. *Gene Expressions Patterns* 5: 817-23.
- Van Raay, T., Moore, K.B., Iordanova, I., Steele, M., Jamrich, M., Harris, W.A., Vetter, M.L. (2005).** Frizzled 5 Signaling Governs the Neural Potential of Progenitors in the Developing *Xenopus* Retina. *Neuron* 46: 23-36.
- Vieira, C., Garcia-Lopez, R., Martínez, S. (2006).** Positional regulation of *Pax2* expression pattern in mesencephalic and diencephalic alar plate. *Neuroscience* (in press).
- Vogel-Höpker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L., Rapaport, D.H. (2000).** Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mechanisms of Development* 94: 25-36.
- Walter, J., Henke-Fahle, S., Bonhoeffer, F. (1987).** Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development* 101: 909-13.
- Walchli, S., Colinge, J., Hooft van Huijsduijnen, R. (2000).** MetaBlasts: tracing protein tyrosine phosphatase gene family roots from Man to *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* genomes. *Gene* 253: 137-143.
- Wallingford, J.B., S.E. Fraser, Harland, R.M. (2002).** Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Developmental Cell* 2: 695-706.
- Walshe, J., Mason, I. (2000).** Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. *Mechanisms of Development* 90: 103-110.
- Wang, H., Lian, Z., Lerch, M.M., Chen, Z., Xie, W., Ullrich, A. (1996).** Characterization of PCP-2, a novel receptor protein tyrosine phosphatase of the MAM domain family. *Oncogene* 12: 2555-2562.

- Wang, B., Kishihara, K., Zhang, D., Hara, H., Nomoto, K. (1997).** Molecular cloning and characterization of a novel human receptor protein tyrosine phosphatase gene, hPTP-J: down-regulation of gene expression by PMA and calcium ionophore in Jurkat T lymphoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231: 77-81.
- Wang, J., Bixby, J.L. (1999).** Receptor tyrosine phosphatase-delta is a homophilic, neurite-promoting cell adhesion molecular for CNS neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 14: 370-384.
- Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L., Martinez, S., Martin, G.R. (1997).** Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid-hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function. *Development* 124: 2923-2934.
- Watanabe Y., Nakamura, H. (2000).** Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by sonic hedgehog. *Development* 127: 1131-1140.
- Willert, J., Epping, M., Pollack, J., Brown, P., Nusse, R. (2002).** A Transcriptional Response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC developmental biology* 2: 8.
- Wilson, L., Maden, M. (2005).** The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology* 282: 1-13.
- Wodarz, A., Nusse, R. (1998).** Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell. Developmental Biology* 14: 59-88.
- Wurst, W., Auerbach, A.B., Joyner, A.L. (1994).** Multiple development defects in Engrailed-1 mutant mice: an early md-hindbrain deletion and patterning defects in forelimb and sternum. *Development* 120: 2065-2075.
- Wurst, W., Bally-Cuif, L. (2001).** Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nature Reviews / Neuroscience* 2: 99-108.
- Xu, J., Liu, Z., Ornitz, D.M. (2000).** Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* 127: 1833-1843.
- Yan, H.X., He, J.Q., Dong, H., Zhang, P., Zeng, J.Z., Cao, H.F., Wu, M.C., Wang, H.Y. (2002).** Physical and Functional Interaction between Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase PCP-2 and β -Catenin. *Biochemistry* 41: 15854-15860.
- Yang, Y., Niswander, L. (1995).** Interaction between the signalling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80: 939-947.
- Yates, P.A., Roskies, A.L., McLaughlin, T., O'Leary, D.D. (2001).** Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *Journal of Neuroscience* 21: 8548-63.
- Ye, W., Bouchard, M., Stone, D., Liu, X., Vella, F., Lee, J., Nakamura, H., Ang, S.L., Busslinger, M., Rosenthal, A. (2001).** Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8. *Nature neuroscience* 4: 1175-1181.
- Yoneya, T., Yamada, Y., Kakeda, M., Osawa, M., Arai, E., Hayashi, K., Nishi, N., Inoue, H., Nishikawa, M. (1997).** Molecular cloning of a novel receptor-type protein tyrosine phosphatase from murine fetal liver. *Gene* 194: 241-247.
- Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B. 3rd., Birchmeier, W., Birchmeier, C. (2003).** beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Developmental Biology* 258: 406-18.

Zondag, G.C., Koningstein, G.M., Jiang, Y.P., Sap, J., Moolenaar, W.H., Gebbink, M.F. (1995). Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases mu and kappa. A critical role for the novel extracellular MAM domain. *Journal of Biological Chemistry* 270: 14247-14250.

Zondag, G.C., Reynolds, A.B., Moolenaar, W.H. (2000). Receptor protein-tyrosine phosphatase RPTPmu binds to and dephosphorylates the catenin p120(ctn). *Journal of Biological Chemistry* 275: 11264-11269.

Zuniga, A., Haramis, A.P., McMahon, A.P., Zeller, R. (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401: 598-602.