

# **Transgene Mausmodelle zur Untersuchung von Nervenzellwanderungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor  
der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Karsten Benzing  
geboren in Mainz

Mainz, 2002

*Ich danke...*

*... **Dieter E.**, meinem Betreuer am MPI für Hirnforschung, für ein spannendes Thema, viele Diskussionen und eine Menge wertvoller Ratschläge. Vor allem aber: für die Freiheit, die ich bei der Durchführung der Arbeit genossen habe.*

*... **Heinz W.**, Direktor der Abteilung Neuroanatomie, für das Interesse, die großzügige Unterstützung und für etliche stimulierende Gespräche.*

*... **Barbara W. und den Herren Professoren Z. und F.** für die Unterstützung durch ein Stipendium der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs "Neuronale Plastizität".*

*... **Gerlinde H., Uschi A. und Silke Z.** für die wertvolle technische Unterstützung bei molekularbiologischen Methoden, in der Zellkultur und bei der Mäusezucht.*

*... **Danilo L. und Andreas S.** für die Einweisung in und die tatkräftige Hilfe bei der Herstellung YAC-transgener Mäuse.*

*... und schließlich **meiner Frau Kaire** für ihre Geduld und ihren niemals nachlassenden Zuspruch.*

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	Motivation	5
1.2	ZNS: Entwicklung und Gliederung	6
1.3	Struktur und Funktion von Pax6	9
1.4	Neurogenese	12
1.5	Neuronale Wanderung	12
1.5.1	Gliophile Wanderung	13
1.5.2	Neurophile und tangentielle Wanderung	15
1.5.3	Mechanismen neuronaler Wanderung	19
1.6	Zielsetzung und experimentelles Vorgehen	22
1.6.1	Menschliche Pax6-Region als Promotor: $P_{hPax6}$	22
1.6.2	Reportergene	25
1.6.3	Elektroporation und organotypische Kultur	29
1.6.4	Zielsetzung: Zusammenfassung	29
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
2.1	Materialien	32
2.1.1	Geräte	32
2.1.2	Verbrauchsmaterial	33
2.1.3	Puffer, Lösungen und Kulturmedien	33
2.1.4	Oligonukleotide	35
2.1.5	Plasmidvektoren, Cosmide, YACs	37
2.1.6	Antikörper	43
2.1.7	Versuchstiere, Zelllinien, Hefe- und Bakterienstämme	43
2.2	Methoden	43
2.2.1	DNA-Standardmethoden	43
2.2.2	YACs/Saccharomyces cerevisiae	44
2.2.3	Säugetier-Zelllinien	46
2.2.4	Transgene Mäuse	47
2.2.5	Genexpressionsanalyse	53
2.2.6	Elektroporation der Medulla, Präparation und Kultur	56
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>59</b>
3.1	Inaktivierte GFP-Varianten	59
3.2	Transgene Mäuselinien	60
3.2.1	Herstellung und Überprüfung der Konstrukte	60
3.2.2	Mikroinjektionen	64
3.2.3	PCR-Screening von Gründertieren	64
3.2.4	Genereller Phänotyp der transgenen Linien	65
3.3	Expression von Pax6 und transgenem taulacZ während der Entwicklung	66
3.3.1	Deskriptive Methodik und Nomenklatur	67

3.3.2	Rückenmark	68
3.3.3	Medulla und Pons	70
3.3.4	Kleinhirn	77
3.3.5	Mesencephalon	79
3.3.6	Prosencephalon	79
3.3.7	Auge	88
<b>3.4</b>	<b>Darstellung neuronaler Wanderungen in vitro</b>	<b>92</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>98</b>
<b>4.1</b>	<b>Klonale Markierungskonstrukte</b>	<b>98</b>
<b>4.2</b>	<b>Expressionsmuster von mPax6 und <math>P_{hPax6}</math>-Transgenen</b>	<b>99</b>
4.2.1	Übereinstimmungen und Unterschiede im Expressionsverlauf	100
4.2.2	Regulation der Pax6-Expression	101
4.2.3	Pax6 exprimierende Zelltypen	104
4.2.4	Posttranskriptionelle Inhibition der tau- $\beta$ -Galactosidase	106
4.2.5	Einfluss von tau-Fusionsproteinen auf zelluläre Funktionen	107
<b>4.3</b>	<b>Tangentiale Wanderung in vitro</b>	<b>108</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>109</b>
4.4.1	Möglichkeiten mit $P_{hPax6}$ -taulacZ Mäusen	109
4.4.2	Möglichkeiten mit $P_{hPax6}$ -tTA-Mäusen	110
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>116</b>

## Abkürzungen

A	Adenin	Gly	Glycinreiche Domäne von Pax6
Abb.	Abbildung	GP	Grundplatte
ACx	Archicortex, mediales Pallium	HCC	Hypothalamischer Zellstrang [(engl.) hypothalamic cell chord]
AEP	Area entopeduncularis anterior	Hox	Homöobox oder Homöobox-enthaltendes Gen
AH	vorderer Hypothalamus	hPax6	menschliches Pax6
ATG	Startcodon für Proteinsynthese (DNA)	HY	Hypothalamus
Au	Auge	I	Erster Ventrikel
AuBl	Augenbläschen	II	Zweiter Ventrikel
AUG	Startcodon für Proteinsynthese (mRNA)	III	Dritter Ventrikel
AuSt	Augenstiel	Ir	Iris (Regenbogenhaut des Auges)
AVE	anteriores viszerales Endoderm	IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	ISH	In-situ-Hybridisierung von RNA
bHLH	basischer Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor	IV	Vierter Ventrikel
BMP	Bone Morphogenetic Protein-ähnlicher Wachstumsfaktor	IZ	Intermediärzone
bp	Basenpaare	kb	kilo-Basenpaare
BP	Bodenplatte	lacZ	β-Galactosidase-Gen (Element Z des lac-Operons von E. coli)
BrdU	Brom-Desoxyuridin	LGE	Eminentia ganglionaris lateralis, Anlage des Striatums
BrW	Brückenstrom (Wanderung zu den Brückenkernen)	loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase [(engl.) locus of <u>x</u> -(cross)-ing-over (des Phagen <u>P</u> 1)]
C	Cytosin	Ls	Linse des Auges
Cb	Cerebellum (Kleinhirn)	LYS2	LYS2-Gen aus S. cerevisiae
Cen	Centromer eines Chromosoms	Mes	Mesencephalon
CGE	Eminentia ganglionaris caudalis	MGE	Eminentia ganglionaris medialis, Anlage des Globus pallidus
CMV	Cytomegalievirus	MP	Mediales Pallium, Paläocortex
Cor	Cornea (Hornhaut des Auges)	mPax6	Maus-Pax6
Cre	Rekombinase aus dem E. coli Phagen P1	mRNA	messenger RNA
crW	Cuneoreticulärer Wanderungsstrom	MZ	Marginalzone
Cryo.	Gefrierschnitt	N	Neuronen
DB	Diagonales Band von Broca	N.	Nervus (Nerv)
Di	Diencephalon	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
DIC	Differenzial-Interferenzkontrast	NCL	Nucleus cuneatus lateralis
DMF	Dimethylformamid	NCx	Neocortex, dorsales Pallium
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NE	Neuroepithelschicht
DP	Dorsales Pallium, Neocortex	Nn.	Nervi (Nerven)
DT	Dorsaler Thalamus (Prosomer 2)	NP	Nucleus poutis
DZ	Differenzierungszone	NRL	Nucleus reticularis lateralis
E	Embryonaltag (Nacht der Befruchtung = E0, Tag darauf = E0.5)	NRTP	Nucleus reticularis tegmenti pontis
E. coli	Escherichia coli	OB	Olfaktorischer Bulbus (Riechkolben)
EGFP	(engl.) Enhanced GFP	OEK	Oberflächenektoderm
EGL	Äußere Körnerzellschicht (External granule cell layer)	OI	Oliva inferior
EMT	Eminentia thalami	OLW	Olivenstrom
engl.	englisch	OptV	Optischer Vesikel (Augenbläschen)
EP	Nucleus entopeduncularis	oRL	obere Rautenlippe
ET	Epithalamus, Anlage der Epiphyse (Pinealorgan)	P	Postnataltag (Tag der Geburt = P0)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-ähnlicher Wachstumsfaktor	p1 ... p6	Prosomer 1 bis Prosumer 6
FP	Flügelplatte	Pax	Paired box oder Paired box-enthaltendes Gen
G	Guanin	PCh	Plexus choroideus
GABA	γ-Aminobuttersäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
GFAP	Gliales Fibrilläres Saures Protein	PCx	Paläocortex, laterales Pallium
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein		

PE	Pigmentepithelschicht	TAA	Stopcodon (DNA)
PEP	Area entopeduncularis posterior	taulaacZ	durch intragenische Duplikation inaktivierte Variante von taulacZ
PFA	Paraformaldehyd	taulacZ	Fusionsprotein aus tau und $\beta$ -Galactosidase
$P_{hPax6}$	Pax6-Promotor	Tel	Telomer eines Chromosoms
PL	Purkinje-Zellschicht	TetR	Tetracyclin-kontrollierter Repressor aus E. coli
POA	Area postoptica posterior	TRE	(engl.) tTA responsive element
POP	Area postoptica posterior	tTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
Pros	Prosencephalon	U	Uracil
PST	Prolin-, Serin-, Threonin-reiche Region von Pax6	uRL	untere Rautenlippe
PT	Prätektum	vgl.	vergleiche
r1 ... r7	Rhombomer 1 bis Rhombomer 7	Vib.	Vibratonschnitt
Ret	Retina (Netzhaut des Auges)	vK	vordere Kammer des Auges
RG	Radiale Gliazelle	vM	ventrale Mittellinie
Rhomb	Rhombencephalon	VP	Ventrales Pallium
RL	Rautenlippe	VP16	Transkriptionsaktivierungsdomäne aus Herpes simplex-Virus
RNA	Ribonukleinsäure	VT	Ventraler Thalamus (Prosomer 3)
S.	Saccharomyces (Hefe)	VZ	Ventrikulärzone
SCH	Area suprachiasmatica	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
scW	seitlicher kortikaler Wanderungsstrom	YAC	(engl.) Yeast Artificial Chromosome = künstliches Hefechromosom
SD	Schnittdicke	ZI	Zona incerta
SE	Septum	ZL	Zona limitans intrathalamica
Sek. Pros	Sekundäres Prosencephalon	ZNS	Zentralnervensystem
Sey	„Small Eye“ Maus (Pax6-Mutante)		
SHH	Sonic Hedgehog		
SPV	Area supraoptica/paraventricularis		
SVZ	Subventrikulärzone		
T	Thymin		

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Nervenzellen wandern während ihrer Entwicklung. Sie entstehen im Zentralnervensystem (ZNS) in teilungsaktiven Schichten, die an das ventrikuläre System angrenzen. Von hier aus, ihrem „Geburtsort“, legen sie oft weite Strecken zurück, um in ihr Zielgebiet zu gelangen, wo sie ausdifferenzieren und ihre endgültige Gestalt annehmen. Diese Wanderungen finden bei Säugetieren während der Embryonalentwicklung im Mutterleib statt und sind daher einer direkten Beobachtung nur schwer zugänglich.

Gegenstand dieser Arbeit sind neuronale Wanderungen, die dadurch charakterisiert sind, dass der Transkriptionsfaktor Pax6 in den wandernden Neuronen oder in den Leitfasern, die die Wanderungsrichtung vorgeben, exprimiert wird. Fehlt dieser Transkriptionsfaktor, wie in der Pax6-Mausmutante „Small eye“, so sind die meisten dieser Wanderungen verändert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten transgene Mausmodelle, die eine weitere Aufklärung der Rolle von Pax6 in diesen Wanderungen ermöglichen, sowie ein Kultursystem zur Darstellung embryonaler Wanderungen außerhalb des Mutterleibs entwickelt werden.

Wie unten im Detail beschrieben wird, ist in den Pax6-Mutanten die Zellwanderung im Nervensystem gestört. Es ist eine naheliegende Vermutung, dass auch die Morphologie der Pax6-exprimierenden Zellen – als Hinweis auf einen veränderten zellulären Bewegungsapparat – verändert ist. Dies ist jedoch schwierig zu untersuchen: Pax6 ist als Transkriptionsfaktor im Kern der Zelle lokalisiert, während sich eine Beeinträchtigung der Motilität vermutlich zunächst in der Peripherie der Zelle morphologisch niederschlägt, beispielsweise indem die Fortsätze verkürzt oder verformt sind. Eine eindeutige Verbindung zwischen peripheren Veränderungen und der zentralen Pax6-Expression (oder ihrem Fehlen) zu etablieren, ist sehr aufwändig. Dies wird am Beispiel von Pax6-exprimierenden Zellen des sich entwickelnden Großhirns deutlich: um zu zeigen, dass Pax6 in radialen Gliazellen (einem Zelltyp mit besonders lang gestreckter Morphologie, der im folgenden näher beschrieben wird) exprimiert wird, musste das Telencephalon in einzelne Zellen dissoziiert werden bevor eine eindeutige Kolokalisation von Pax6 und einem Marker für radiale Gliazellen, RC2, gezeigt werden konnte (Götz et al. 1998). Die Morphologie der radialen Zellen geht bei einem derartigen Vorgehen natürlich verloren. Es besteht daher auch die Gefahr, dass subtile Veränderungen, die durch das Fehlen von Pax6 in den Mutanten bewirkt werden, nicht erkannt werden können.

Eine entscheidende Verbesserung der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungsmöglichkeiten wäre dadurch zu erreichen, dass in die Pax6-exprimierenden Zellen eine spezifische Markierung, die sich über die gesamte Ausdehnung der Zelle verteilt, eingeführt wird. Diese zusätzliche, periphere Markierung der Pax6-exprimierenden Zellen ließe sich einfach mit anderen Molekülen (wie dem Radiale-Glia-Marker RC2) kolokalisieren. Sie kann so Aufschluss darüber geben, in welchen Zelltypen Pax6 eine Rolle spielt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Mäuselinie hergestellt werden, die das Reportergen *tau-lacZ* unter der Kontrolle des Pax6-Promotors exprimiert. In diesen Mäusen wäre dann überall dort, wo Pax6 im Zellkern vorliegt, der Rest der Zelle über seine gesamte Ausdehnung mit der vom *tau-lacZ*-Transgen kodierten tau- $\beta$ -Galactosidase markiert. Die Expression des transgenen Markers sollte in dieser Linie unabhängig von der Expression von Pax6 erfolgen, damit sie auch in die Small-eye-Mutante eingekreuzt werden kann. So kann man feststellen, welche der mit Pax6 kolokalisierten Moleküle in der Mutante fehlen: dies sind gute Kandidaten für stromabwärts von Pax6 gelegene Effektormoleküle.

Durch solche Kolokalisierungsuntersuchungen von Pax6 mit anderen Molekülen lassen sich Hypothesen formulieren, welche Mechanismen für die Zellwanderung – oder andere Eigenschaften von Zellen – verantwortlich sind. Um diese Hypothesen zu überprüfen, ist es in der Regel erforderlich, einzelne Moleküle, die eine Rolle bei diesen Mechanismen spielen oder spielen könnten, gezielt auszuschalten oder ektopisch einzubringen. Gelingt es beispielsweise durch gezieltes Einführen eines derartigen Moleküls in die Small-eye-Mutante den mutanten Phänotyp – zumindest teilweise – zu retten, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein stromabwärts gelegenes Effektormolekül. Um nicht-zell-autonome Effekte auszuschließen, sollte dieses Molekül nur in den Pax6-positiven Zellen exprimiert werden, nicht jedoch in deren Umgebung.

Eine weitere transgene Mäuselinie, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden sollte, dient daher dazu, gezielt in Pax6-exprimierenden Zellen beliebige andere DNA-Konstrukte zu exprimieren. Dazu sollte unter der Kontrolle des Pax6-Promotors ein hochspezifischer Transkriptionsfaktor, der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA), exprimiert werden. Durch das Einführen von Reporter-DNA-Konstrukten, die eine Erkennungssequenz für tTA beinhalten, kann gezielt die Expression von neutralen Reportergenen oder funktionellen Effektorgenen gesteuert werden. Die Einführung der Reporter-DNA kann transient durch Gentransfer oder dauerhaft in transgenen Mäusen erfolgen. Nur in den Zellen, in denen sowohl Pax6 exprimiert wird als auch die Reporter-DNA vorliegt, kommt es dann zur Expression des Reportergens. Auf diese Weise lassen sich gezielt Veränderungen in Pax6-exprimierenden Zellen herbeiführen, während die Umgebung unverändert bleibt.

In eine erste Transreporterlinie sollte das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle einer tTA-Erkennungssequenz eingebracht werden. So sollte eine Fluoreszenzmarkierung der Pax6-exprimierenden Zellen erreicht werden, was eine Beobachtung ihres Wanderungsverhaltens *in vitro* ermöglicht. Dazu musste ein *In-vitro*-Kultursystem etabliert werden, das eine organotypische Entwicklung eines Hirnabschnitts außerhalb des Mutterleibs zumindest für einige Tage ermöglicht.

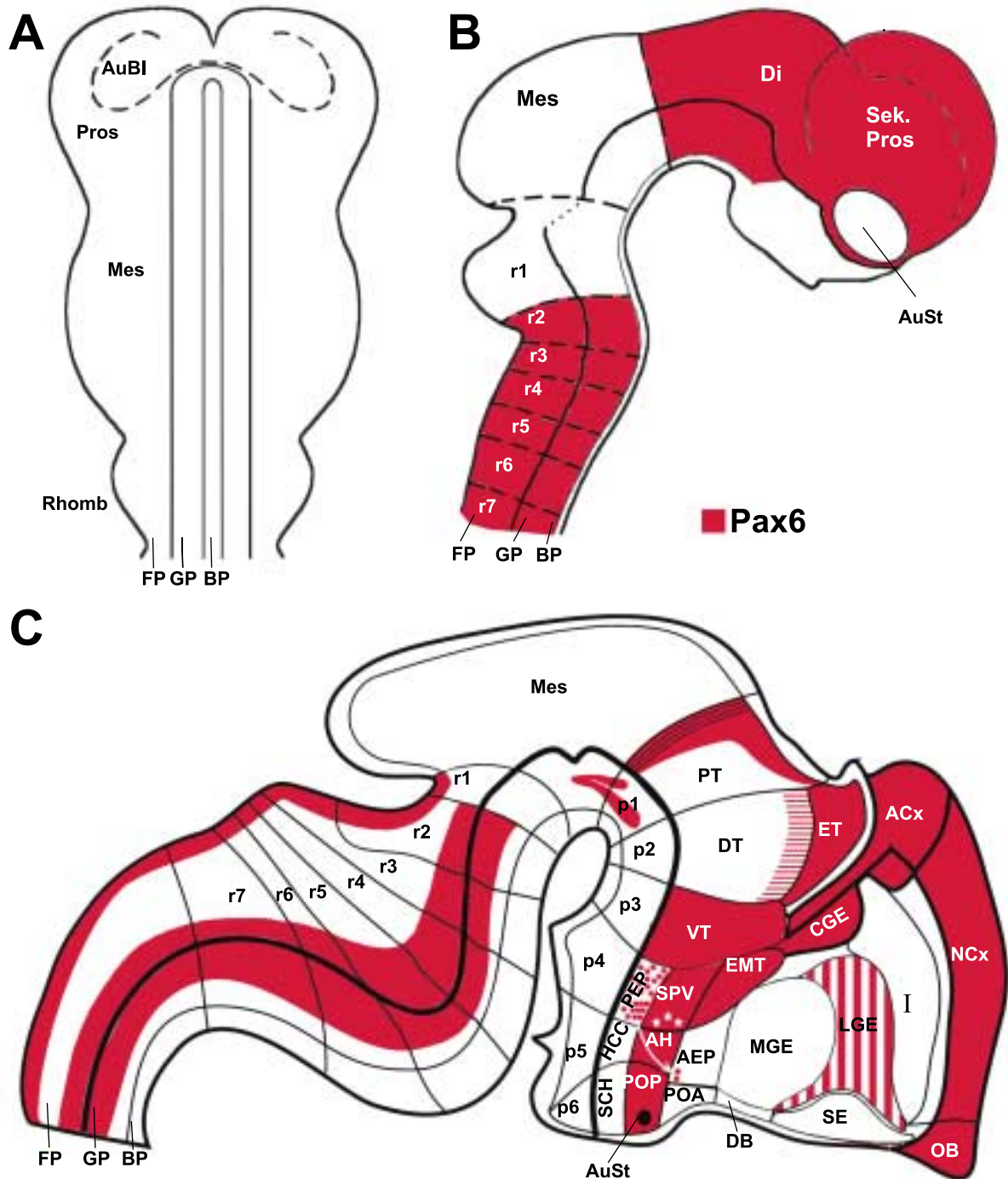
In der Einleitung soll ein knapper Überblick gegeben werden über die Entwicklung des ZNS unter besonderer Berücksichtigung der Rolle von Pax6. Aufgrund der Vielzahl von Musterbildungsprozessen, bei denen eine Rolle von Pax6 beschrieben wurde, kann nicht auf alle im Detail eingegangen werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Zellwanderungen im ZNS. Die hier beschriebenen transgenen Mausmodelle sind jedoch potentiell zur Aufklärung aller unter Beteiligung von Pax6 ablaufenden Prozesse nützlich.

## 1.2 ZNS: Entwicklung und Gliederung

Bei der Maus *Mus musculus* dauert die Trächtigkeit dauert zirka 19 Tage. In dieser Zeit entstehen alle Organe einschließlich des ZNS. Entwicklungsstadien werden nach dem Alter des Embryos unterschieden, das heisst nach Tagen, die seit der Empfängnis vergangen sind. Meist wird dabei Embryonaltag 0.5 (E0.5) als Mittag des auf die (nächtliche) Verpaarung folgendenden Tages definiert. Sofern Arbeiten zitiert werden, die andere Zählenschemata verwenden, wurden die Angaben umgerechnet. Häufig sind auch Arbeiten an anderen Modellorganismen zitiert, meist an der Ratte. Hier dauert die Trächtigkeit 21 bis 22 Tage; Näherungsweise entspricht die späte Entwicklung des ZNS ab E14 der Ratte etwa E12 der Maus, es tritt also eine Verzögerung von etwa zwei Tagen auf.

Das ZNS der Vertebraten entwickelt sich aus der Neuralplatte, einem entlang der dorsalen Mittellinie gelegenen verdickten Bereich des Ektoderms (Abb. 1 A). Aus der Neuralplatte gehen in einem als „Neurulation“ bezeichneten Prozess zunächst eine Vertiefung, die „Neuralrinne“, darauf folgend das Neuralrohr und später die verschiedenen ZNS-Teile hervor (Abb. 1 B).





**Abb. 1: Entwicklung des ZNS und Pax6-Expression**

**A:** ZNS im Neuralplatten-Stadium (Aufsicht). Entlang der antero-posterioren Achse ist die Unterteilung in die primären Hirnteile erkennbar (von anterior nach posterior): Vorderhirn (Prosencephalon; Pros) mit den Augenbläschen (AuBl), Mittelhirn (Mesencephalon; Mes) und Rautenhirn (Rhombencephalon; Rhomb), das ins Rückenmark übergeht. Auf der ventro-dorsalen Achse ist das ZNS in Bodenplatte (BP), Grundplatte (GP), Flügelplatte (FP) und Dachplatte (DP) unterteilt (siehe auch Abb. 18 A). **B:** Nach der Neurulation. Das Vorderhirnbläschen teilt sich in das Zwischenhirnbläschen (Diencephalon; Di) und das sekundäre Prosencephalon (Sek. Pros), welches mit den Augenbläschen über die Augensiele (AuSt) verbunden ist. Das Rautenhirn ist in Rhombomere (r1–r7) segmentiert. Pax6 wird in den markierten Hirnregionen exprimiert. **C:** E12.5. Das Vorderhirn wird in die Prosomere p1–p6 gegliedert. Zwischenhirn: Prosomere p1 (Prätektum; PT), p2 (dorsaler Thalamus; DT; und Epithalamus; ET) und p3 (ventraler Thalamus; VT). Hypothalamus: basale Regionen in p4–p6 (PEP, SPV, EMT, HCC, AH, AEP, SCH, POP, POA). Paarige Telencephalonhemisphären: übrigen Regionen von p4–p6. Im Gegensatz zum hier gezeigten ursprünglichen Prosomermmodell werden sie mittlerweile nicht mehr segmental unterteilt, sondern als longitudinale Bereiche aufgefasst (Puelles et al. 2000). Siehe auch Abb. 4. Das Expressionsmuster von Pax6 ist in diesem Stadium sehr komplex. Verändert nach Shimamura et al. (1995) und Stoykova et al. (1996).

Die Zellen des frühen Neuralrohrs haben eine gestreckte Morphologie und kontaktieren sowohl die ventrikuläre als auch die piale Oberfläche des Neuralrohrs. Während ihres schnell ablaufenden Zellteilungszyklus führen diese „Neuroepithelzellen“ eine sogenannte „interkinetische Kernwanderung“ aus, indem sie sich zwischen beiden Oberflächen hin und her bewegen, wobei die Zellteilung in der Nähe des Ventrikels erfolgt (Abb. 3 A; Sauer 1935). Die Zone proliferativer Aktivität wird als Ventrikulärzone bezeichnet (VZ in Abb. 3 A). Später wird sie von weiteren Schichten überlagert, in denen postmitotische Neuronen und Gliazellen ausdifferenzieren. Die äußere Schicht unterhalb der Pia wird als Marginalzone (MZ) bezeichnet. Für die Schichten, die sich zwischen Marginalzone und Ventrikulärzone ausbilden, werden in den Hirnteilen unterschiedliche Bezeichnungen verwendet. Eine – mehr oder weniger undifferenzierte – Schicht zwischen diesen beiden äußeren Schichten heißt oft Intermediärzone (IZ; Boulder Committee 1970).

Entlang der dorso-ventralen Achse kann das Neuralrohr anhand anatomischer Grenzen in Längszonen gegliedert werden: Die ventrale Hälfte der Seitenwand wird als Grundplatte (GP), ihre dorsale Hälfte als Flügelplatte (FP) und der sie trennende Einschnitt als Sulcus limitans bezeichnet (Abb. 1). Den ventralen Abschluß bildet die Bodenplatte (BP), den dorsalen die Dachplatte (DP). Diese Einteilung ist im Rückenmark besonders augenfällig und bleibt hier auch im erwachsenen Tier erhalten (Schema in Abb. 18 A). Auf der Grundlage von Genexpressionsmustern lässt sie sich in der Entwicklung bis an das anteriore Ende des ZNS fortsetzen (skizziert in Abb. 1 B, C; Shimamura et al. 1995). Sowohl Dach- als auch Bodenplatte sind Quellen sezernierter Signalproteine, die eine Funktion in der Musterbildung haben.

Entlang der antero-posterioren Achse werden im frühen Gehirn drei primäre Hirnbläschen abgegrenzt (Abb. 1 A): Vorderhirn (Prosencephalon; Pros), Mittelhirn (Mesencephalon; Mes) und Rautenhirn (Rhombencephalon; Rhomb). In der Maus bilden sich diese Unterteilungen bereits vor dem Verschluss des Neuralrohrs aus. Mit dem Fortschreiten der Entwicklung wird das Hirn durch weitere Einschnürungen unterteilt. Die segmentalen Einheiten im ZNS werden als „Neuomere“ bezeichnet (Vaage 1969).

Aus dem Rautenhirnbläschen gehen die Brücke (Pons), das Kleinhirn (Cerebellum) und das verlängerte Mark (Medulla oblongata, Myelencephalon) hervor (Abb. 5). Das Dach des Rautenhirnbläschens wird nicht von neuralem Gewebe, sondern der dünnen Tela chorioidea gebildet. Es hat in der Embryonalentwicklung eine rautenförmige Gestalt, die namensgebend für die ganze Hirnregion ist. Durch das Abknicken des Neuralrohrs in der Brückenbeuge kommen die oberen und unteren Schenkel dieser Raute aufeinander zu liegen und bilden so eine Struktur, die an einen Mund erinnert. Darauf anspielend wird der wulstartig verdickte und „umgekrempte“ Rand dieser Struktur als „Rautenlippe“ bezeichnet (His 1891).

Durch eine Reihe von Einschnürungen wird der tubuläre Anteil des Rautenhirns in 7 Segmente unterteilt, die als „Rhombomere“ bezeichnet werden (Abb. 1 B, C; Lumsden und Krumlauf 1996). Proliferierende Vorläuferzellen des Rhombencephalons können sich vor der Segmentierung über Rhombomergrenzen hinwegbewegen. Nachdem sich die Rhombomere ausgebildet haben finden jedoch keine derartigen Wanderungen mehr statt: Die Rhombomere bilden somit segmentale Proliferationseinheiten (Lumsden und Keynes 1989). Rhombomer 1 (r1) grenzt an den Isthmus Mesencephali an, r7 bildet den Abschluß der Medulla; das Innenohr entwickelt sich auf der Höhe von r5 und r6. Das Kleinhirn entwickelt sich aus dem dorsalen Anteil von Rhombomer 1 und den Körnerzellvorläufern aus der oberen Rautenlippe (Wingate und Hatten 1999).

Die Schließung des vorderen Endes des Neuralrohrs findet bei der Maus an E9 statt. Zu diesem Zeitpunkt haben sich die beiden Augenbläschen bereits aus den Seitenwänden des Vorderhirnbläschens ausgestülpt und sind noch über die Augenstiele (AuSt in Abb. 1 B, C) mit dem Vorderhirnbläschen

verbunden. In der weiteren Entwicklung unterteilt sich das Vorderhirnbläschen in ein Zwischenhirnbläschen (Diencephalon; Di) und ein sekundäres Vorderhirnbläschen (Sek. Pros), aus dem die paarigen Hemisphärenbläschen (Telencephalon; Tel) und der basale unpaare Anteil des Telencephalons (Telencephalon impar) hervorgehen.

In den aus dem Vorderhirnbläschen hervorgehenden Hirnteilen fehlen morphologische Orientierungspunkte wie Furchen und Vorsprünge weitgehend. Genexpressionsmuster legen jedoch auch für das Prosencephalon eine segmentale Organisation nahe. Die sechs Vorderhirnsegmente werden als „Prosomere“ bezeichnet, mit Prosomer 1 (p1) an der Grenze zum Mittelhirn und p6 am rostralen Ende des ZNS (Abb. 1 C). p1 – p3 bilden das Diencephalon, p4 – p6 das Telencephalon (Bulfone et al. 1993; Rubenstein et al. 1998). Auch wenn der segmentale Charakter dieser Einheiten nicht geklärt ist, hat das Prosomermodell als Grundlage für die Beschreibung und Diskussion der Vorderhirnentwicklung eine große Verbreitung erfahren, insbesondere die dort verwendeten Bezeichnungen für Hirnstrukturen. Diese Terminologie wird auch hier übernommen; die verwendeten Abkürzungen beruhen auf den englischen Termini (siehe Abkürzungsverzeichnis).

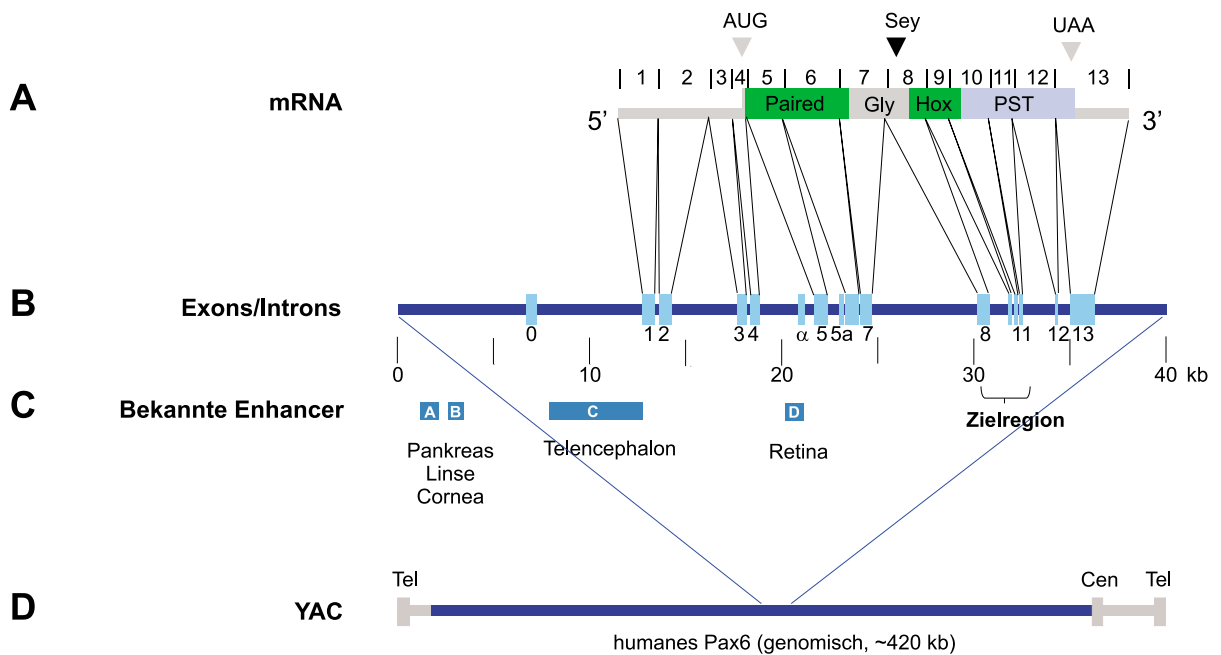
Aus den Diencephalon-Prosomeren p1 – p3 entwickeln sich der Thalamus (p2: dorsaler Thalamus; DT, p3: ventraler Thalamus; VT), die Epiphyse (Pinealorgan; aus dem Epithalamus; ET in p2) und das Prätectum (PT; p1). Der Hypothalamus entwickelt sich aus den basalen Anteilen von p4 – p6. Die Augenbläschen stülpen sich nach dem Prosomermodell aus p5 aus.

Die paarigen Telencephalonbläschen entwickeln sich aus der Flügelplatte von p4 – p6. Sie bestehen aus dem Mantel (Pallium), der das Dach des Telencephalons bildet, und dem Subpallium. In Abänderung ihres Prosomermodells schlagen Puelles et al. (2000) vor, dass das Pallium in 4 longitudinale Bereiche unterteilt ist, die sich von dorsocaudal nach ventrorostral erstrecken. Diese werden als mediales, dorsales, laterales und ventrales Pallium bezeichnet (MP, DP, LP und VP). Aus dem medialen Pallium entwickelt sich der Archicortex (ACx) mit dem Hippocampuskomplex, aus dem dorsalen Pallium der Isocortex oder Neocortex (NCx, auch einfacher „Cortex“), aus dem lateralen Pallium der Paläocortex (PCx) mit dem piriformen/olfaktorischen Cortex sowie Teile der Amygdala und aus dem ventralen Pallium das Klastrum und weitere Anteile der Amygdala. Die von den Autoren zuvor (Bulfone et al. 1993; Rubenstein et al. 1998) postulierte segmentale Zuordnung von ACx (p4), NCx (p5) und PCx/OB (p6) wird aufgegeben (in Abb. 1 C wird noch dieses veraltete Modell gezeigt).

Nach Puelles et al. (2000) besteht das Subpallium aus 3 primären Regionen: Striatum, Globus pallidus (Pallidum) und rostralem Telencephalonstiel. Im englischen Schrifttum wird die Bezeichnung „Eminentia ganglionaris“ (engl. „Ganglionic eminence“) für die Anlagen von Striatum und Pallidum verwendet. Aus der Eminentia ganglionaris lateralis (LGE) geht das Striatum, aus der Eminentia ganglionaris medialis (MGE) der Globus pallidus hervor (vgl. Abb. 4). Die Grenze zwischen Pallium und Subpallium befindet sich nach diesem Modell zwischen ventralem Pallium und Eminentia ganglionaris lateralis. Diese fällt nicht mit dem lateralen Sulcus zusammen, sondern ist etwas nach medial verschoben (Puelles et al. 2000). Die Eminentia ganglionaris lateralis kann aufgrund von Genexpressionsdaten wiederum selbst in einen dorsalen und einen ventralen Anteil unterteilt werden (Yun et al. 2001).

### 1.3 Struktur und Funktion von Pax6

Pax6 gehört zur Familie der Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren vom Paired-Typ. Es wurde in Tier-Spezies aus vielen Phyla isoliert, sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten. Alle bisher isolierten Pax6-Homologen haben eine N-terminale Paired-Domäne, die durch einen variablen Linker von einer weiteren DNA-Bindedomäne vom Homöodomänen-Typ getrennt ist, sowie eine C-terminale



**Abb. 2: Genomische Organisation von Pax6**

**A:** Die Pax6-messenger-RNA (mRNA) kodiert zwischen dem Startcodon AUG und dem Terminationscodon UAA ein 422 Aminosäuren langes Protein, das aus vier Domänen zusammengesetzt ist. Paired- und Homeodomäne (Hox) sind DNA-bindende Domänen, die hochspezifisch an bestimmte Sequenzen doppelsträngiger genomischer DNA binden. Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich eine Glycin-reiche Verbindungsdomäne (Gly). Am 3'-Ende liegt eine Prolin-, Serin- und Threonin-reiche Domäne (PST) mit transaktivierenden Eigenschaften. **B:** Die Pax6-mRNA enthält mindestens 13 Exons; alternatives Splicing ist an mehreren Stellen möglich mit alternativen Transkriptionsstarts im Exon 0 und im  $\alpha$ -Element sowie einem zusätzlichen Exon 5a, das zu veränderten Bindeeigenschaften der Paired-Domäne führt. Die Pax6-Exons erstrecken sich über einen etwa 30 kb langen Bereich. **C:** Teilweise innerhalb von Introns liegen die genetischen Kontrollelemente, die die Expression von Pax6 selbst kontrollieren. Vier Enhancer-Elemente (A-D) konnten eingegrenzt und mit der Expression von Pax6 in Pankreas, Linse, Cornea, Telencephalon beziehungsweise Retina korreliert werden. Durch Sequenzvergleich zwischen den genomischen Pax6-Sequenzen von Pufferfisch und Mensch wurde eine Zielregion um die Exons 8 – 11 identifiziert, in der sich aufgrund fehlender Sequenzhomologien vermutlich keine genetischen Kontrollelemente befinden. **D:** Das künstliche Hefechromosom (engl.: yeast artificial chromosome, YAC) Y593 enthält etwa 420 kb aus dem menschlichen Genom mit dem Pax6-Locus etwa in der Mitte. Für die Vermehrung in der Hefe enthält es ein Hefe-Zentromer (Cen) sowie Hefe-Telomere (Tel) an jedem Ende.

Prolin-, Serin- und Threonin-reiche (PST) Region (Abb. 2 A). Die PST-Region hat stark transaktivierende Eigenschaften. Die Expressionsmuster von Pax6 im ZNS ähneln sich in allen bislang untersuchten Vertebraten, mit Expression im Rückenmark, Rhombencephalon, Vorderhirn und im Auge (Callaerts et al. 1997). Auch die Phänotypen von Pax6-Mutationen ähneln sich.

Beim Menschen führen Mutationen im Pax6-Locus zu zwei Syndromkomplexen, die als Aniridia und Peters'sche Anomalie bezeichnet werden. Die Häufigkeit liegt zwischen 1:64000 und 1:96000. Zwei Drittel der Fälle sind familiär mit autosomal-dominantem Erbgang, der Rest sporadisch. Etwa 100 verschiedene Mutationen sind bislang bekannt (Brown et al. 1998). Der Phänotyp von Aniridia ist variabel und reicht von Unterentwicklung der Iris bis zu ihrem teilweisen oder kompletten Fehlen. Zusätzliche Komplikationen sind unter anderem schlechter Visus, Glaukome, Katarakte (Trübung der Linse, „grauer Star“) und eine Trübung der Hornhaut (Nelson et al. 1984). Bei der Peters'schen Anomalie

handelt es sich um eine angeborene Missbildung der vorderen Augenkammer. Es treten Trübungen der Hornhaut und Anheftungen der Iris an die Linse auf (Callaerts et al. 1997).

Small eye (Sey) ist eine semidominante Pax6-Mutation bei Mäusen und Ratten, die in heterozygoter Ausprägung zu kleineren Augen (der namensgebenden Veränderung) und in Homozygoten unter anderem zum kompletten Verlust der Augen führt (Hogan et al. 1986). Homozygote Tiere sterben spätestens 16 Stunden nach der Geburt aus bislang ungeklärtem Grund (Roberts 1967; Schmahl et al. 1993). Verschiedene spontane Mutationen von Sey sind unabhängig voneinander entstanden, die alle zu einem funktionellen Verlust von Pax6 und dem selben Phänotyp führen (Hill et al. 1991). Auch Pax6-Knockout-Mäuse zeigen den selben Phänotyp (St-Onge et al. 1997). In dieser Arbeit wurden Mäuse mit dem Small eye-Allel (Roberts 1967) verwendet; es wird als Pax6<sup>Sey</sup> abgekürzt, während die Wildtypallele die Bezeichnung Pax6<sup>+</sup> erhält. Wildtypmäuse sind also Pax6<sup>+/+</sup>, homozygote Small eye-Mäuse Pax6<sup>Sey/Sey</sup> und heterozygote Pax6<sup>Sey/+</sup>.

In der frühen Entwicklung weisen heterozygote Pax6<sup>Sey/+</sup>-Mäuse nur sehr geringfügige Abweichungen vom Wildtyp auf (Grindley et al. 1995; Mastick et al. 1997). Ihre veränderten Augen sind etwa ab E15.5 zu erkennen (Hill et al. 1991). Der markante Phänotyp der homozygoten Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäuse manifestiert sich etwa ab E9.5: die Augenvesikel sind übermäßig breit und der Sulcus telodiencephalicus, der das Prosencephalon in das Telencephalon und das Diencephalon teilt, bildet sich nicht aus (Grindley et al. 1997). In den Mutanten kontaktiert das Augenbläschen zwar das Ektoderm, es wird jedoch keine Linse induziert und in der Folge keine Augenanlage gebildet (Hogan et al. 1986; Grindley et al. 1995). Ein ähnlicher Mechanismus führt offenbar auch dazu, dass die Nasenplakoden nicht invaginieren (Hogan et al. 1986; Grindley et al. 1995). Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäuse entwickeln sich zwischen E10.5 und E14.5 langsamer als Pax6<sup>+/+</sup>-Embryonen, was sich an einer bis zu 20% kürzeren Scheitellänge zeigt. Diese Verzögerung ist jedoch vorübergehend – an E14.5 sind keine signifikanten Unterschiede in der Scheitellänge mehr feststellbar (Vitalis et al. 2000).

In fast allen Hirnteilen kommt es zu Missbildungen (Schmahl et al. 1993), von denen hier nur einige erwähnt werden. Im Ergebnisteil wird auf den Small-eye-Phänotyp näher eingegangen. Im Prosencephalon ist an E12.5 der dritte Ventrikel stark vergrößert und mit den Seitenventrikeln über ein breites Fenster verbunden. Rostrodorsale Anteile des ventralen Thalamus und der Eminentia thalami sind nach außen verlagert. Sie wachsen nicht nach rostroventral, um mit dem Striatum zu verschmelzen, sondern in eine laterale Richtung (Stoykova et al. 1996). Einige Hirnbereiche, beispielsweise der Hypothalamus, bleiben in ihrer Entwicklung zurück. Dies wird durch stärkeres Wachstum in anderen Hirnbereichen ausgeglichen: Bis E17.5 ist das Hirngewicht von Mutanten gleich dem der Wildtyp-Embryonen (Vitalis et al. 2000). Weiter treten in Small-Eye-Mäusen erhebliche Fehler in der axonalen Wegfindung im Diencephalon und im Hypothalamus auf. Viele Fasertrakte verlaufen daher fehlerhaft (Mastick et al. 1997; Kawano et al. 1999; Vitalis et al. 2000).

Pax6 spielt eine Rolle bei der Spezifizierung von ventralen Neuronenpopulationen im Rückenmark. In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen fehlen dorsale Motorneurone, während sich ventrale Populationen weiter nach dorsal ausbreiten. In Wildtyp-Mäusen werden verschiedene Klassen von ventralen Neuronen durch unterschiedliche Konzentrationen an Pax6 spezifiziert, das seinerseits wiederum durch das sezernierte Signalmolekül Sonic Hedgehog (Shh) kontrolliert wird (Ericson et al. 1997). Auch in vorderen Hirnteilen führt das Fehlen von Pax6 zu einer Ventralisierung, zum Beispiel im Thalamus (Grindley et al. 1997), im Subpallium (Stoykova et al. 2000) und im Pallium (Bishop et al. 2000). Da auch hier Shh als Morphogen wirkt, könnte es ähnlich wie im Rückenmark die Pax6-Expression steuern.

Nicht nur dorso-ventrale, auch antero-posteriore Musterbildungsprozesse sind in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen beeinträchtigt. So fehlt die scharfe Grenze zwischen p1 und dem Mesencephalon. Die Konstriktion des Neuralrohrs an dieser Grenze bildet sich nicht aus und die Expression von Markergenen ist verändert.

Dies kann interpretiert werden, als habe eine Transformation von p1 zu einer Region mit Eigenschaften des Mesencephalons stattgefunden (Grindley et al. 1997; Mastick et al. 1997).

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen läßt sich immunhistochemisch kein Pax6-Protein nachweisen. Die mRNA für Pax6<sup>Sey</sup> wird jedoch hergestellt. Da sie gegenüber der Wildtyp-mRNA im Pax6<sup>Sey</sup>-Allel nur eine Punktmutation aufweist (Abb. 2 A), läßt sie sich mit der selben Probe in In-situ-Hybridisierungen nachweisen. So kann untersucht werden, ob die Abwesenheit des funktionellen Pax6-Proteins durch direkte oder indirekte Rückkopplungseffekte Einfluss auf die Expression der Pax6-mRNA hat.

## 1.4 Neurogenese

Neurale Vorläuferzellen teilen sich außer in der Ventrikulärzone des Neuralrohrs auch in spezialisierten proliferativen Epithelien, zum Beispiel der Rautenlippe. Sie generieren – im wesentlichen in dieser zeitlichen Reihenfolge – die drei Hauptzelltypen des ZNS: Neuronen, Astrozyten und Oligodendrocyten (Abb. 3 B). Während spezialisierte Neuronen sich nicht mehr teilen, also „postmitotisch“ sind, können sich Gliazelltypen auch außerhalb der Ventrikulärzone teilen. Den Prozess, durch den aus undifferenzierten Zellen Neuronen werden, bezeichnet man als „Neurogenese“, den der Bildung von Gliazellen entsprechend als „Gliogenese“ (Boulder Committee 1970). Zu Beginn der Entwicklung sind die Zellen des Neuroepithels pluripotent, das heißt, sie können sowohl Neuronen als auch Astrozyten generieren, wie klonale Markierungsexperimente gezeigt haben (Price et al. 1987; Luskin et al. 1988; Price und Thurlow 1988). Im Lauf der Entwicklung wird das Potential von neuronalen Stammzellen immer mehr auf bestimmte Zelltypen eingeschränkt (Qian et al. 2000).

Da viele der Pax6-exprimierenden Zellen proliferieren, zum Beispiel im Telencephalon (Götz et al. 1998), im Diencephalon (Warren und Price 1997) und in der Retina (Marquardt et al. 2001), sind diese Pax6-exprimierenden Zellen neurale Vorläuferzellen. Pax6 hat auch eine funktionelle Bedeutung in diesen Vorläufern. In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ist die Proliferationsrate im Thalamus deutlich geringer (Warren und Price 1997). In der Retina führt eine Deletion von Pax6 ab E10.5, wenn sich das retinale Neuroepithel bereits gebildet hat, zu einer radikalen Einschränkung des Entwicklungspotentials der Vorläuferzellen ausschließlich auf Amakrinzellen (Marquardt et al. 2001).

Bei der Entscheidung, zu was sich postmitotische Zellen entwickeln, werden in Vertebraten offenbar ähnliche Mechanismen wie in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* benutzt: dort wird aus einer Gruppe von Vorläuferzellen, die durch Expression von neurogenen Genen definiert sind, durch intrazelluläre Kommunikation über das Delta-Notch-Signalsystem jeweils eine bestimmte Zelle dazu bestimmt, ein neuronales Schicksal anzunehmen. Durch Transkriptionsfaktoren aus der Klasse der basischen Helix-Loop-Helix-Proteine (bHLH) werden diese Entscheidungen konserviert. Die Orientierung der Teilungsspindel bei der Zellteilung ist wie bei *Drosophila* von Bedeutung für die Frage, ob die Tochterzellen weiter Vorläuferzellen bleiben oder als postmitotische Zellen ausdifferenzieren (Chenn und McConnell 1995; Zhong et al. 1996).

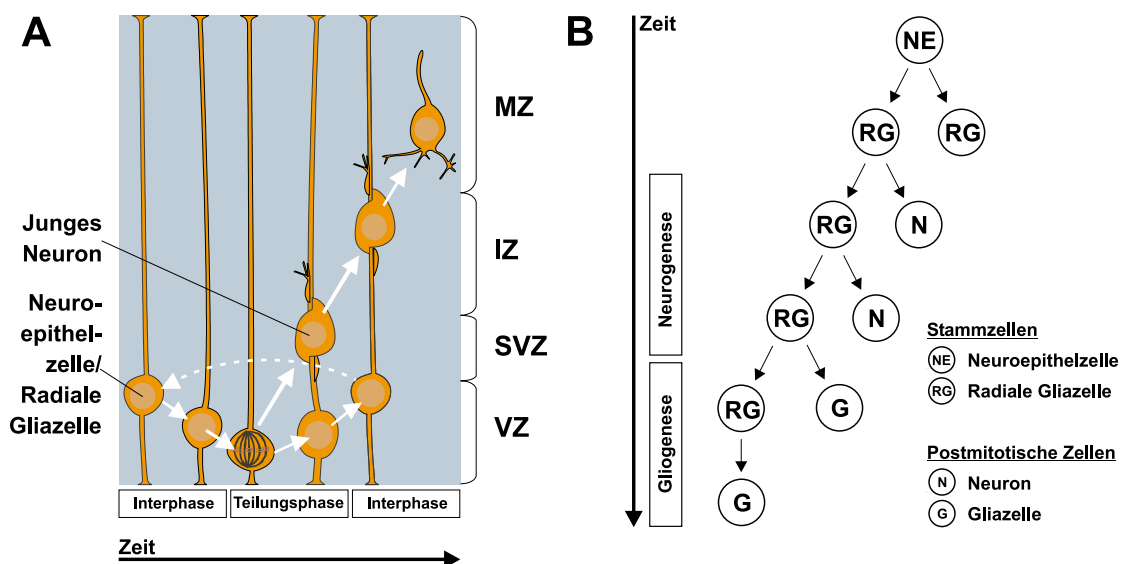
## 1.5 Neuronale Wanderung

Zwischen dem Ort ihrer Entstehung und ihrer endgültigen Position, an der sie ausdifferenzieren, müssen Neurone oft weite Strecken zurücklegen. Diese neuronalen Wanderungen lassen sich danach klassifizieren, ob sie entlang von glialen Fasern („gliophil“) oder neuronalen Fasern („neurophil“) erfolgen (Rakic 1990). Nach der Wanderungsrichtung kann man zwischen „radialen“ (mehr oder weniger senkrecht zur Oberfläche des Neuralrohrs) und „tangentialen“ (parallel zur Oberfläche des Neuralrohrs) Wanderungen unterscheiden.

## 1.5.1 Gliophile Wanderung

Der vorherrschende Typ neuronaler Wanderungen im Gehirn ist die gliophile Wanderung von jungen Neuronen entlang radialer Gliazellen (Abb. 3 A). Entdeckt wurde diese Art der Wanderung bei der Einwanderung der Körnerzellen von der Oberfläche des Kleinhirns in die innere Körnerzellschicht. Elektronenmikroskopische Rekonstruktionen und die Analyse von Golgi-imprägnierten Präparaten des Kleinhirns führten zu der generellen Hypothese, dass radiale Gliazellen ein System von Leitfasern bilden, entlang dessen gerichtete neuronale Wanderungen im Gehirn erfolgen (Rakic 1971) (Sidman und Rakic 1973). Diese Hypothese wurde durch die Untersuchung des cerebellären Modellsystems *in vitro* durch Zeitrafferaufnahmen (Edmondson und Hatten 1987) und *in vivo* (Gao und Hatten 1993) bestätigt. In allen Hirnteilen dominiert die gliophile Form der neuronalen Wanderung. Im Cortex wandern 80–90% der neuronalen Vorläuferzellen entlang glialer Fasern (Anton et al. 1996).

Radiale Gliazellen verlaufen nicht immer streng radial: so haben die Gliazellen, die aus dem cortico-striatalen Winkel an die Oberfläche des ventralen Cortex projizieren einen S-förmigen Verlauf. In ihrem Mittelteil liegen diese radialen Gliazellen in einem dicken Bündel auf der Oberfläche des Subpalliums auf, weshalb sie auch als „gliale Palisade“ bezeichnet werden, und sind parallel zur Oberflä-



**Abb. 3: Neurogenese und gliophile Wanderung**

**A:** Im Neuralrohr stehen neurale Stammzellen (Neuroepithelzellen und die aus ihnen hervorgehenden radialen Gliazellen) durch ihre langen Fortsätze sowohl mit der pialen (im Schema oben) als auch der ventrikulären Oberfläche im Kontakt. Hier wird eine einzelne, sich teilende Stammzelle über die Zeit verfolgt (von links nach rechts): Sie bewegt sich synchron zum Zellteilungszyklus innerhalb der Ventrikulärzone (VZ) auf und ab. Nach der Zellteilung bleibt die Tochterzelle, ein junges Neuron, in Verbindung mit der Mutterzelle. Das junge Neuron wandert entlang des Fortsatzes durch Subventrikulärzone (SVZ) und Intermediärzone (IZ) in die Marginalzone (MZ), wo es sich von der Leitfaser ablöst und ausdifferenziert. **B:** Schematischer Stammbaum der Hauptzelltypen des ZNS: Zunächst wird durch symmetrische Zellteilungen von Neuroepithelzellen (NE) der Vorrat an Stammzellen (radiale Gliazellen; RG) vergrößert. Während der Neurogenese entstehen Neurone (N) durch asymmetrische Zellteilung. Später werden von den radialen Gliazellen durch den selben Mechanismus vermehrt Gliazellen (G) generiert. Gegen Ende der Embryonalentwicklung wandeln sich die meisten radialen Gliazellen selbst in Astrocyten um, indem sie wie zuvor ihre Tochterzellen aus der Ventrikulärzone auswandern und ihre Fortsätze zurückbilden. In einigen Hirnbereichen bleiben radiale Gliazellen jedoch während des ganzen Lebens als proliferierende Stammzellen erhalten.

che des Cortex orientiert (Edwards et al. 1990; de Carlos et al. 1996). Für die entlang dieser Gliazellen wandernde große Zahl von Neuronen und Glia wird die Bezeichnung „seitlicher kortikaler Wanderungsstrom“ verwendet (Bayer et al. 1991).

Während der Wanderung besitzen die Neurone eine bipolare Morphologie mit einem führenden Fortsatz (engl. „leading process“) und einem nachfolgenden Fortsatz (engl. „trailing process“). Sie bleiben während der gesamten Wanderung in engem Kontakt zur radialen Gliazelle und bilden keine Kontakte zu der Vielzahl kreuzender neuronaler und glialer Fasern aus. Gelegentlich scheinen Neurone jedoch zu einer anderen radialen Gliazelle zu wechseln, was dafür spricht, dass der Adhäsionsmechanismus nicht für einzelne Zellen spezifisch ist (Rakic et al. 1974). Mehrere wandernde Neurone benutzen offenbar nacheinander die selbe Gliafaser (Rakic 1990). Im Cortex wandern spät geborene Neurone an den früh geborenen Neuronen vorbei in die oberflächlichen Schichten. Dies führt zu einer Schichtung mit früh geborenen Neuronen in den tiefen, spät geborenen in den oberflächlichen Schichten des Cortex (Angevine und Sidman 1961; Rakic 1974).

### 1.5.1.1 Radiale Gliazellen

Radiale Gliazellen sind ein auffälliger Zelltyp in fast allen Regionen des ZNS; sie sind in Golgi-impregnierten Präparaten oft angefärbt und wurden daher früh beschrieben (Magini 1888; Ramon y Cajal 1890, zitiert nach Bentivoglio und Mazzarello 1999). Das bipolare Soma der radialen Gliazellen, die auch „Pfeilerzellen“, „Faserglia“, „epitheliale Zellen“, „radiale Zellen“ oder „fetale Ependymzellen“ genannt werden, befindet sich in der Ventrikulärzone und entsendet einen ventrikulären und einen aufsteigenden Fortsatz (Abb. 3 A; Chanas-Sacre et al. 2000). Radiale Gliazellen unterscheiden sich von Neuronen ultrastrukturell und in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften. Sie sind elektrisch zu anderen Zellen über Gap junctions gekoppelt, haben einen geringen Eingangswiderstand und keine spannungsabhängigen Membrankanäle (LoTurco et al. 1991; Bittman et al. 1997; Noctor et al. 2001).

Ihre auffällige Gestalt und ihre Rolle als Leitfasern hat lange den Blick dafür verstellt, dass radiale Gliazellen selbst neurale Stammzellen sind. Sie werden sehr früh generiert – in Rückenmark und Telencephalon der Maus lassen sie sich ab E9 nachweisen (Misson et al. 1988) – und sind mitotisch aktiv, wie Doppelmarkierungen mit BrdU und einem Gliazellmarker zeigen (Misson et al. 1988). Sie vollführen interkinetische Kernwanderungen (Alvarez-Buylla et al. 1998) und sind in der Lage, sich wie Stammzellen asymmetrisch zu teilen (Kamei et al. 1998). Durch die ektopische Zuführung von Notch1, einem Faktor, der neuronale Differenzierung inhibiert und den Stammzellvorrat vergrößert, wird im Telencephalon die Zahl der radialen Gliazellen erhöht (Gaiano et al. 2000). Durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung können markierte radiale Gliazellen aus kortikalen Zelldissoziaten isoliert werden (Malatesta et al. 2000); aus den isolierten Zellen entwickeln sich in Kultur Klone, die sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Zellen enthalten können. Dieses breite Potential ist eine notwendige Bedingung für Stammzellen. Die Zusammensetzung der Klone ist vom Entwicklungsstadium abhängig, an dem die Zellen entnommen wurden, und entspricht der Abfolge in vivo: an E14 und E16, wenn im Cortex hauptsächlich Neuronen generiert werden, enthalten die Zellklone viele Neurone; an E18, wenn die Gliogenese einsetzt, sind es viele Gliazellen (Malatesta et al. 2000).

Der In-vivo-Nachweis, dass radiale Gliazellen des Cortex proliferierende neurale Stammzellen sind, gelang in klonalen Markierungsexperimenten in Ratten an E15 und E16 (Noctor et al. 2001). Mit dem retroviral kodierten Vitalfarbstoff GFP, der die gesamte Zelle inklusive feiner Fortsätze füllt, wurden Zellklone angefärbt, die jeweils eine radiale Gliazelle und eine oder mehrere neuronale Zellen enthielten. Doppelmarkierung mit dem Zellteilungsmarker BrdU bestätigte, dass in diesen Klonen ausschließlich die radialen Gliazellen proliferieren (Noctor et al. 2001). Dies ist im Einklang mit früheren Experimenten, bei denen im optischen Tektum des Hühnchens und im Striatum der Ratte retroviral



markierte Zellklone stets eine radiale Gliazelle neben einer unterschiedlichen Zahl von Neuronen und Astrozyten gefunden wurde (Gray und Sanes 1992; Halliday und Cepko 1992). Die radialen Gliazellen vollführen während der Teilung eine interkinetische Wanderung; ihre Fortsätze werden während der Mitose extrem dünn, scheinen jedoch nicht eingezogen zu werden. Ihre neuronalen Tochterzellen wandern entlang der radialen Fortsätze der Mutterzelle aus der Ventrikulärzone in die distalen Schichten des Cortex (Noctor et al. 2001).

Cortikale radiale Gliazellen exprimieren Pax6, und Pax6 spielt eine wichtige Rolle für ihre korrekte Differenzierung (Götz et al. 1998). In homozygoten Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ist die Morphologie der radialen Gliazellen verändert, ihr Zellzyklus ist kürzer, und man findet eine höhere Zahl an radialen Gliazellen. Die Wanderung von Neuronen des seitlichen kortikalen Wanderungsstroms entlang der erwähnten langen, S-förmigen radialen Gliazellen scheint besonders gestört, denn in der Mutanten sammeln sich entlang dieses Pfads sehr viel mehr Zellen an als im Wildtyp, und sie wandern in einem breiten Strom bis an die ventrale Oberfläche des Cortex, offenbar ohne die typische cortikale Schichtung zu generieren (Brunjes et al. 1998; Stoykova et al. 2000).

Bei den meisten bislang untersuchten Säugetieren sind radiale Gliazellen eine transiente Population von Zellen. Nach Vollendung der neuronalen Wanderung wandeln sie sich zu Astrozyten um oder sterben apoptotisch (Schmechel und Rakic 1979; Pixley und de Vellis 1984; Voigt 1989). In einigen Hirnteilen differenzieren sie zu spezialisierten nicht-neuralen Zellen, zum Beispiel den Bergmann-Gliazellen des Kleinhirns oder den Müller-Gliazellen der Retina (Rakic 1990). In einigen Vertebraten wie dem Kanarienvogel bleiben radiale Gliazellen während des gesamten Lebens bestehen und dienen hier als Leitfasern für die Wanderung von neuen Neuronen, die noch im adulten Tier generiert werden (Alvarez-Buylla et al. 1988a; Alvarez-Buylla et al. 1988b). Vermutlich dienen sie als Stammzellen, denn Mitosen von radialen Gliazellen und das Entstehen von jungen Neuronen sind miteinander korreliert (Alvarez-Buylla et al. 1990).

## 1.5.2 Neurophile und tangentielle Wanderung

Ähnlich wie die Wanderung von Körnerzellen in die tieferen Schichten des Kleinhirns für gliophile Wanderungen sind die Wanderungen von neuronalen Vorläuferzellen aus der unteren Rautenlippe prototypisch für neurophile Wanderungen; diese werden unten beschrieben (Kapitel 1.5.2.2 „Tangentiale Wanderungen von der unteren Rautenlippe“). Auf dem Weg zu ihren Zielgebieten wandern die jungen Neuronen nicht radial, sondern tangential zur Orientierung des Neuralrohrs, und dies entlang von axonalen Fortsätzen. Zu quer verlaufenden radialen Gliazellen oder neuronalen Fortsätzen bilden sie keine Adhäsionskontakte aus. Auch die neurophil wandernden Neurone haben eine bipolare Gestalt und ähnliche ultrastrukturelle Charakteristika wie gliophil wandernde Neurone (Rakic 1990).

In vielen Hirnteilen findet man tangentielle Wanderungen. Als Substrat für diese Wanderungen werden oft axonale Fasern vermutet (Rakic 1990; Hatten 1999). Neurone, die das Hormon LHRH sezernieren, wandern vom Vomeronasalorgan in das basale Telencephalon entlang des Vomeronasalnerven (Yoshida et al. 1995). Im Rückenmark wandern verschiedene Zellpopulationen tangential, sowohl in dorso-ventraler als auch in ventro-dorsaler Richtung. Der Anteil der tangentialen Wanderungen ist in späten Entwicklungsstadien höher als in der frühen Entwicklung (Leber und Sanes 1995). So wandert beispielsweise eine Populationen von cholinergen Zellen („U-förmige“ Zellen) entlang von kommissuralen Axonen ab E16 (Ratte) in tangentialer Richtung (Phelps et al. 1996).

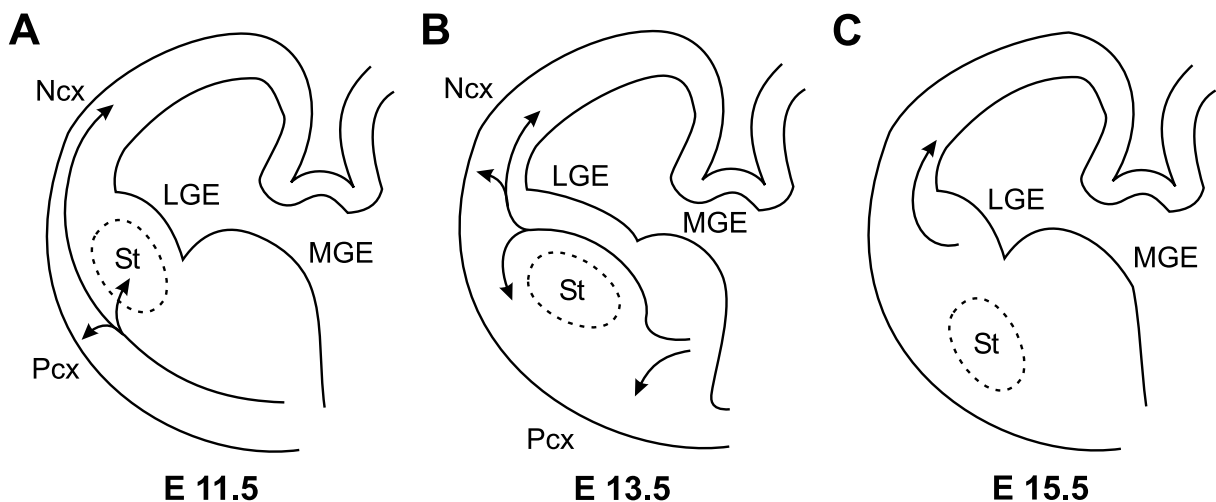
Einige Neuronentypen wandern sequentiell sowohl gliophil als auch neurophil („biphil“; Rakic 1990). Die Körnerzellen des Kleinhirns wandern ohne gliale Leitfasern von der oberen Rautenlippe über die Kleinhirnoberfläche, bevor sie postnatal entlang von Bergmann-Gliafasern in die tiefen Schichten wandern (Bonnievie und Brodal 1946; Hynes et al. 1986).

### 1.5.2.1 Tangentiale Wanderungen im Telencephalon

Der Neocortex (Cortex) der Säuger wird sowohl durch radiale als auch tangentielle Wanderungen von Neuronen besiedelt (Soula et al. 2001). Exzitatorische glutamaterge Projektionsneurone werden wie oben beschrieben durch radiale Wanderung generiert. Daneben sind einige tangentielle Wanderungen für die Entstehung und die Funktion des Cortex bedeutsam.

Die frühesten postmitotischen Neurone im Cortex der Ratte werden an E11 bis E12 geboren (Raedler und Raedler 1978; Valverde et al. 1995). Diese sogenannten „cortikalen Pionierneurone“ bedecken an E12 das gesamte cortikale Neuroepithel; ihre Axone projizieren durch die Marginalzone und erreichen an E13 (Ratte) die Eminentia ganglionaris. Sie sind damit die ersten cortikalen Efferenzen und stellen mit ihren Axonen ein Substrat für tangentielle Wanderungen bereit (Meyer et al. 1998). Nach den cortikalen Pionierneuronen wird zwischen E12 und E14 (Ratte) in einem Areal um die späteren Riechkolben herum (Area retrobulbaris) eine Neuronenpopulation geboren, die offenbar in einer subpialen, tangentialen Wanderung den ganzen Cortex besiedelt und die sogenannte „subpiale Körnerzellschicht“ (vgl. Abb. 4 A) bildet. Aus den subpialen Körnerzellen gehen unter anderem Reelin-exprimierende Cajal-Retzius-Zellen hervor, die für die gliophile Wanderung eine große Bedeutung haben (Gadisseux et al. 1992; Meyer et al. 1998).

Inhibitorische GABAerge Interneurone wandern auf tangentialen Pfaden aus basalen Telencephalonregionen ein. Dies zeigen In-vitro-Markierungsexperimente (de Carlos et al. 1996; Tamamaki et al. 1997) und der Phänotyp von  $Dlx-1^{-/-}/Dlx2^{-/-}$ -Mäusen, bei denen die Differenzierung von Neuronen der Eminentia ganglionaris medialis (MGE) und lateralis (LGE) gestört ist: obwohl in diesen Mäusen die



**Abb. 4: Tangentiale Wanderungen vom Subpallium ins Pallium**

Das Pallium (hier Neocortex – NCx – und Paläocortex – PCx) wird durch verschiedene tangentielle Wanderungen von Neuronen aus dem Subpallium (Eminentia ganglionaris lateralis – LGE – und medialis – MGE) besiedelt. Diese Wanderungen erfolgen offenbar entlang von corticofugalen Axonen und sind somit neurophil. Vermutlich stammen die meisten, wenn nicht alle GABAergen Interneurone des Palliums aus dem Subpallium. **A:** Ab E11.5 wandern die ersten Neurone aus der MGE entlang der Efferenzen cortikaler Pionierneurone in der Marginalzone in den Neocortex, den Paläocortex und das Striatum ein. Einige von ihnen differenzieren zu Cajal-Retzius-Zellen. **B:** Ab E13.5 folgen die Neurone aus der MGE einer anderen Route, die das Striatum dorsal umgeht. In beiden Stadien wirkt das Striatum durch die Expression von Semaphorinen abstoßend auf die wandernden Neurone. **C:** Etwa ab E15.5 wandern auch Neurone aus der LGE in das Pallium ein. Einige von ihnen lassen sich in der Ventrikulärzone nieder, wo sie später in der Entwicklung stark proliferieren. Verändert nach Marín et al. (2001) und (Parnavelas 2000).

cortikale radiale Wanderung normal verläuft, fehlen die GABAergen-Interneurone (Anderson et al. 1997a; Anderson et al. 1997b). In der Nkx2.1-Mutante kommt es zu einer Respezifikation der MGE zur LGE. Später ist in Nkx2.1<sup>-/-</sup>-Mäusen die Zahl der corticalen Interneurone um etwa die Hälfte reduziert, was zeigt, dass die MGE eine Rolle bei der Generierung dieser Interneurone spielt (Sussel et al. 1999). Umgekehrt wird in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ein Teil der LGE zu MGE-ähnlichem Gewebe umgewandelt (Stoykova et al. 2000; Yun et al. 2001). Im Cortex der Pax6-Mutanten findet man zirka 1.6fach mehr GABAerge Neurone als im Wildtyp (Chapouton et al. 1999).

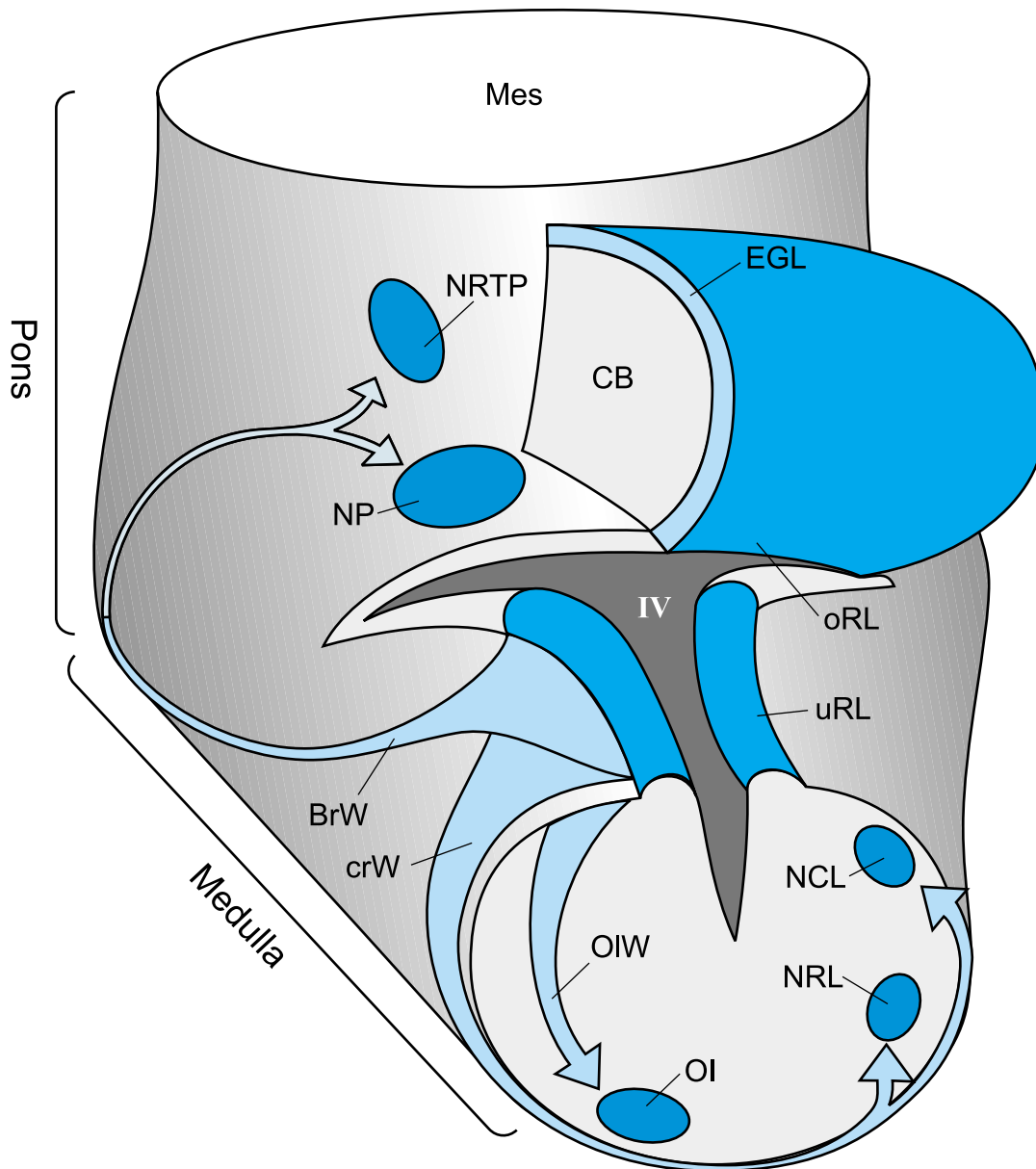
In-vitro-Experimente an Telencephalon-Sliceulturen der Maus zeigen zwei tangential Wanderungen in den Cortex (Abb. 4; Anderson et al. 2001; Marin et al. 2001): ab E11.5 wandern Neuronen aus der MGE entlang der Intermediärzone; ab E14.5 wandern auch aus der LGE Zellen (Abb. 4 C). Allerdings sind die LGE-Neuronen weniger zahlreich und oft in der corticalen Subventrikulärzone lokalisiert. Der größte Teil sowohl der LGE- als auch der MGE-Zellen differenziert zu GABAergen Interneuronen. Einige frühe MGE-Zellen entwickeln sich offenbar zu Cajal-Retzius-Zellen, denn sie wandern – offenbar nach Abschluss der tangentialen Wanderung – radial in die cortikale Marginalzone ein und exprimieren Reelin (Lavdas et al. 1999). Einige LGE-Zellen scheinen auch in die Ventrikulärzone einzuwandern, wo sie später in der Entwicklung offenbar stark proliferieren (Anderson et al. 2001; Nadarajah et al. 2000). In immunhistochemischen Präparaten werden viele GABAerge Zellen ab E19 (Ratte) im Corpus callosum gefunden, was darauf hindeutet, dass sie möglicherweise über die Mittellinie hinweg wandern (DeDiego et al. 1994).

Als Substrat für die Wanderung der Neuronen aus dem basalen Telencephalon werden corticofugale Fasern vorgeschlagen. Es könnte sich dabei zunächst um die Axone der corticalen Pionierneurone handeln, denn in der Ratte wandern einige Zellen, vermutlich die frühen MGE-Neurone, an E14 tangential in der Marginalzone, wo auch die Axone der corticalen Pionierneurone verlaufen (Denaxa et al. 2001).

Im Subpallium bildet sich oberhalb der Ventrikulärzone eine sekundäre proliferative Schicht, die Subventrikulärzone (SVZ). Sie generiert neben einer großen Zahl von Gliazellen auch Neuronen, von denen zumindest die spät geborenen tangential entlang von Axonen der Intermediärzone wandern (Gray et al. 1990). In der Subventrikulärzone besteht während des gesamten Lebens eine Population von proliferativen Stammzellen. Diese wandern in Singvögeln gliophil saisonabhängig in den Cortex (Alvarez-Buylla et al. 1988a). In adulten Säugetieren wandern SVZ-Zellen neurophil kontinuierlich in die Riechkolben, wo sie zu GABAergen Interneuronen werden (Luskin 1993; Lois und Alvarez-Buylla 1994). Diese Wanderung wird als „rostraler Wanderungsstrom“ bezeichnet (Altman 1969). Die wandernden Neuronen bilden dicht gepackte „Ketten“, die ausschließlich aus Neuronen bestehen und von einer Schicht von Gliazellen umhüllt werden. Daher wird dieser Typ neuronaler Wanderung als „Kettenwanderung“ bezeichnet (Lois et al. 1996). Die Neurone des rostralen Wanderungsstroms exprimieren Pax6 (Walther und Gruss 1991).

### 1.5.2.2 Tangentiale Wanderungen von der unteren Rautenlippe

Die Rautenlippe ist ein proliferatives Neuroepithel am dorsalen Rand der Flügelplatte des Rhombencephalons. Aus der oberen Rautenlippe (oRL) bildet sich die äußere Körnerzellschicht (EGL) des Kleinhirns (CB), aus der wiederum die Körnerzellen hervorgehen (Abb. 5; Schaper 1897; Miale und Sidman 1961; Gao und Hatten 1994; Mathis et al. 1997). Aus der unteren Rautenlippe (uRL) gehen einige Kerngebiete in der Brücke (Pons) und in der Medulla hervor (Abb. 5; Harkmark 1954). Diese Kerngebiete sind im adulten Tier durch ihre afferenten Verbindungen zum Kleinhirn gekennzeichnet. Sie werden deshalb zum „präzerebellären System“ zusammengefasst (Altman und Bayer 1997). Die



**Abb. 5: Tangentiale Wanderungen von der Rautenlippe**

Im Rhombencephalon verläuft rings um das dünne Dach des vierten Ventrikels (IV) eine wulstartig verdickte Proliferationszone, die Rautenlippe. Sowohl die untere Rautenlippe (uRL) am dorsalen Rand der Medulla als auch die obere Rautenlippe (oRL) am ventralen Rand des Kleinhirns (CB) sind Ursprungsorte tangentialer, neurophiler Wanderungen. Fast alle Neurone aus der Rautenlippe exprimieren vor und während ihrer Wanderung Pax6. Von der oberen Rautenlippe aus besiedeln Körnerzellen die gesamte Oberfläche des Kleinhirns und bilden die äußere Körnerzellschicht (EGL). Von der unteren Rautenlippe gehen nacheinander drei Wanderungsströme aus. Als erstes wandern um E10.5 die Neurone des Olivenstroms (OIW) zur ipsilateralen unteren Olive (OI). Nur in dieser Wanderung wird Pax6 nicht exprimiert. Zwischen E12.5 und E13.5 wandern Neurone des cuneo-reticulären Wanderungsstroms (crW) rings um das Neuralrohr herum, kreuzen dabei die Mittellinie und lassen sich in den contralateralen Nuclei reticularis lateralis (NRL) und cuneatus lateralis (NCL) nieder. Als letztes verlassen die Neurone des Brückenstroms (BrW) um E14.5 die untere Rautenlippe, wandern außen um die Brückenbeuge herum und lassen sich im ipsilateralen Brückenkern (Nucleus pontis, NP) und im Nucleus reticularis tegmenti pontis (NRTP) nieder.

Verändert nach Altman und Bayer 1997.

verschiedenen Neuronenpopulationen aus der unteren Rautenlippe haben unterschiedliche Geburtszeitpunkte (Pierce 1973) und, damit korreliert, unterschiedliche Wanderungspfade (Alcantara et al. 2000).

**Olivenstrom (OlW).** Neurone werden an E9.5 bis E11.5 postmitotisch (Pierce 1973) und wandern durch die graue Materie der Medulla ipsilateral auf direktem Weg in die untere Olive (Oliva inferior; OI). Diese Zellen wurden bereits von Wilhelm His erkannt und als „Olivenstreifen“ bezeichnet (His 1891). In Abgrenzung zu den unten beschriebenen oberflächlichen Wanderung wird sie auch als „tiefe“ (Essick 1912; Harkmark 1954), als „innere hintere präzerebelläre“ Wanderung oder einfacher als „Olivenstrom“ (Altman und Bayer 1987a) bezeichnet.

**Cuneoreticulärer Strom (crW).** Junge Neurone werden zwischen E10.5 und E13.5 postmitotisch mit einem Maximum an E12 (Pierce 1973), verlassen die untere Rautenlippe zwischen E12.5 und E13.5, wandern ringsherum um das Neuralrohr am äußersten Rand der Medulla, unterhalb der Pia und den Endfüßen radialen Gliazellen. Sie kreuzen auf dem Weg zu ihren kontralateralen Zielgebieten, dem Nucleus reticularis lateralis (NRL; Altman und Bayer 1978) und dem Nucleus cuneatus lateralis (NCL; auch: Nucleus cuneatus accessorius, Nucleus cuneatus externus; Monakow) die ventrale Mittellinie (Altman und Bayer 1980). Diese Wanderung wird als „posteriore externe präzerebelläre Wanderung“ oder als „cuneoreticulärer Strom“ bezeichnet (Altman und Bayer 1987b). Die Mittellinie erreichen die wandernden Zellen innerhalb von weniger als einem Tag. An E17 werden keine wandernden Neuronen mehr subpial angetroffen (Ono und Kawamura 1989).

**Brückenstrom (BrW).** Durch die starke Proliferation in der unteren Rautenlippe bildet sich eine Ausstülpung der unteren Rautenlippe, die sich nach rostral unter das Velum medullare und den sich entwickelnden Plexus chorioideus schiebt. Das Volumen dieses sekundären (oder vorderen) präzerebellären Neuroepithels nimmt für einige Tage zu, bevor es durch die auswandernden Neurone wieder reduziert wird (Altman und Bayer 1997). Junge Neurone verlassen das vordere präzerebelläre Neuroepithel zwischen E12.5 und E16.5 mit einem Maximum an E14.5 bis E15.5 (Pierce 1973) und bilden einen weiteren externen Wanderungsstrom, der zur Brücke führt („anteriore externe präzerebelläre Wanderung“ oder „Brückenstrom“). Diese Neuronen wandern um die Medulla und die Brücke herum in anteroventraler Richtung und bilden die Brückenkerne (Nuclei pontis; NP) im Brückenfuß und den Nucleus reticularis tegmenti pontis (NRTP) in der Brückenhaube. Wie die Neuronen des cuneoreticulären Stroms wandern sie unterhalb der Endfüße glialer Zellen (Altman und Bayer 1987c). Transplantationsuntersuchungen deuten darauf hin, dass im Hühnchen an der Bildung des lateralen Brückenkerns auch die obere rhombische Lippe beteiligt ist (Wingate und Hatten 1999), während der mediale Brückenkern wie in der Maus aus Zellen der unteren rhombischen Lippe gebildet wird (Tan und Le Douarin 1991).

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ist die Zahl der Zellen im Brückenstrom und in den Brückenkernen auf weniger als 10% des Wildtypniveaus reduziert (Engelkamp et al. 1999). Der cuneoreticuläre Strom ist in homozygoten Mutanten stark desorganisiert (D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten). Ursache für die beobachteten Störungen scheint ein Wanderungsdefekt zu sein. Die Vorläuferzellen proliferieren in der Mutante normal und sterben auch nicht apoptotisch. Sie verlassen jedoch die Rautenlippe nicht, sondern akkumulieren vielmehr am Ort ihrer Entstehung. So ist in der Mutante an E16.5 die untere Rautenlippe vergrößert (Engelkamp et al. 1999).

### 1.5.3 Mechanismen neuronaler Wanderung

Ursprünglich sind Neurone epitheliale bipolare Zellen, deren axonaler Teil aus der ventrikulären und deren somato-dendritischer Teil aus der basolateralen Domäne hervorgeht (Bradke und Dotti 2000). Sowohl der axonale als auch der somato-dendritische Teil können für Wanderungen benutzt werden,

indem sie als führender Fortsatz (engl. „leading process“) ausgestülpt werden. Welcher Teil benutzt wird, ist von der Art der Leitfasern abhängig: Bei neurophilen Wanderungen wird der axonale Teil als „Wachstumskegel“, bei gliophilen Wanderungen der somato-dendritische Teil als „dendritischer Wachstumskegel“ oder „dendritische Spitze“ (engl. „dendritic tip“) vorangeschoben (Lambert und Goffinet 2001). Entsprechend findet man auch unterschiedliche Ausstattungen an Signalrezeptor- und Adhäsionsmolekülen, die auf den Fortsätzen exprimiert werden und für die Wanderung eine Rolle spielen. Eine Reihe von Molekülen der extrazellulären Matrix haben ebenfalls einen Einfluss auf die Wanderung, wie In-vitro-Versuche zeigen (Hatten 1999).

Die prinzipielle Organisation des Cytoskeletts von wandernden Neuronen entspricht der von anderen wandernden Zellen, mit einem Aktin-Netzwerk unterhalb der Spitze des führenden Fortsatzes, das anziehende und abstoßende Umgebungssignale integriert (Luo 2000), Mikrotubuli, deren positiver Pol zum führenden Fortsatz zeigt und einem Mikrotubuli-organisierendem Zentrum in der Nähe des Kerns (Rakic et al. 1996).

Im führenden Fortsatz werden fingerförmige Fortsätze, Filopodien, und netzartige cytoplasmatische Schleier, Lamellipodien, ausgestreckt, die Adhäsionskontakte zum Substrat ausbilden. Diese Prozesse werden von Rho-GTPasen kontrolliert, die die Polymerisation und Reorganisation von Aktin-Mikrofilamenten steuern (Horwitz und Parsons 1999). Umgebungssignale werden über Rezeptoren für verschiedene Klassen von Signalproteinen aufgenommen und über spezialisierte Proteine an die Rho-GTPasen weitergegeben (Müller 1999). Diese Umgebungssignale können diffusibel oder membrangebunden sein und ihre Wirkung über große Entfernungen oder nur in der unmittelbaren Umgebung ausüben.

Signalproteine aus den folgenden Klassen sind an der axonalen Zielsteuerung beteiligt (Müller 1999): (1) Semaphorine bilden eine Familie mit mindestens 30 verschiedenen Mitgliedern. Sie wirken hauptsächlich abstoßend, sowohl kontaktvermittelt als auch als diffusible Moleküle. Ihre Rezeptoren sind Neuropiline und Plexine. (2) Netrine sind diffusible Moleküle, die zum Beispiel in der Mittellinie exprimiert werden. In Vertebraten wurden 3 Netrine identifiziert, deren anziehende oder abstoßende Wirkung von der Rezeptorausstattung der Wachstumskegel abhängig ist. DCC allein als Rezeptor reagiert positiv auf Netrin, Koexpression von Unc5 wandelt dies zu einer negativen Reaktion um. (3) Das abstoßende extrazelluläre Matrixprotein Slit und sein Rezeptor Roundabout (Robo/Rig) sind Teil eines Systems, das beim Kreuzen der Mittellinie verwendet wird. Slit aktiviert Robo bei Erreichen der Mittellinie, das seinerseits den Netrin-Rezeptor DCC inaktiviert und so dazu führt, dass der Wachstumskegel seine Sensitivität für das Netrin-Signal der Mittellinie verliert (Stein und Tessier-Lavigne 2001). (4) Ephrine und Eph-Rezeptoren sind eine diverse Familie von Rezeptortyrosinkinasen, die durch kontaktvermittelte Mechanismen beim Aufbau topographischer Karten mitwirken. (5) Bei verschiedenen Molekülen aus der Klasse der Immunglobulin/Fibronectin-Zelladhäsionsmoleküle wird eine Rolle bei der axonalen Zielsteuerung vermutet, zum Beispiel bei TAG-1 und L1.

Der prinzipielle Unterschied zwischen neuronaler Wanderung und dem Auswachsen von Neuriten liegt darin, dass bei der Wanderung auf die Bildung des Fortsatzes das Nachziehen des Kerns und Somas folgt. Für die Mikrotubuli-assoziierten Proteine Lis1 und Dcx wird aufgrund des Phänotyps ihrer Mutanten eine Rolle bei dieser sogenannten „Nukleokinese“ angenommen (Lambert und Goffinet 2001; Feng und Walsh 2001). In Cdk5-defizienten Mäusen ist die Nukleokinese selektiv in gliophilen Wanderungen beeinträchtigt, während beispielsweise GABAerge Interneurone noch in den Cortex einwandern (Gilmore et al. 1998; Kwon und Tsai 2000). Die Kinase Cdk5 könnte eine Verbindung zwischen dem Aktin-Cytoskelett und den Mikrotubuli in der dendritischen Spitze darstellen; an dieser Übergangszone ist Cdk5 stark konzentriert (Nikolic et al. 1998).

**Wanderung im frühen Neuralrohr.** Die kortikalen Pionierneurone erreichen die Marginalzone ohne Wanderung im eigentlichen Sinne. Sie bilden keinen führenden Fortsatz aus, sondern verlieren in der zu diesem Zeitpunkt nur wenige Zellkörper dicken Ventrikulärzone lediglich den Kontakt zum Ventrikel und führen eine Nukleokinese durch (Meyer et al. 1998). Die Neuronen der subpialen Körnerzellschicht haben eine sternförmige Gestalt mit mehreren Fortsätzen. Ihre Bewegung folgt keinen glialen Fasern und ihre Geschwindigkeit ist sehr langsam (Derer 1974; Shoukimas und Hinds 1978).

**Neurophile Wanderung.** Im Kleinhirn sind die Zelladhäsionsmoleküle TAG-1, NCAM, L1, N-Cadherin und  $\beta$ 1- und  $\alpha$  $\beta$ 5-Integrine sowie die ECM-Moleküle Vitronectin und Tenascin mit der frühen, neurophilen Wanderungsphase der Körnerzellen assoziiert (Hatten 1999). Viele dieser Moleküle haben bekannte Funktionen beim Axonwachstum (Tessier-Lavigne und Goodman 1996; Müller 1999).

Pax6-positive Brückenstromneurone sind für viele der bekannten Marker für frühe Axone negativ (GAP-43, MAP-2, Neurofilament 200, SNAP-25), exprimieren aber die Adhäsionsmoleküle TAG-1 und NCAM sowie den Netrin-Rezeptor DCC. Für ihre Wanderung sind der Chemoattraktor Netrin-1, der in der ventralen Mittellinie exprimiert wird, und der Rezeptor DCC notwendig, denn sowohl in Netrin-1<sup>-/-</sup> als auch in DCC<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlen die Brückenkerne (Yee et al. 1999). Allerdings verlassen auch in diesen Mutanten die wandernden Zellen die untere Rautenlippe, was zeigt, dass das Netrin-DCC-Signalsystem allein nicht ausreichend für ihre Wanderung ist (Yee et al. 1999). Bei Ankunft in den Brückenkernen exprimieren die Neuronen den negativen Netrin-Rezeptor Unc5h3 (Engelkamp et al. 1999). Nicht nur die an E14 auswachsenden Brückenstromneurone sondern auch die ebenfalls Pax6-positiven, an E12 auswachsenden Neurone des cuneoreticulären Stroms reagieren positiv auf Netrin-1 (Alcantara et al. 2000). Sie lassen sich aufgrund ihrer Markerexpression von den Neuronen des Brückenstroms nicht unterscheiden (D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten).

In den Brückenstromneuronen scheint die Expression des Zelladhäsionsmoleküls TAG-1 durch Netrin-1 heraufreguliert zu werden (Alcantara et al. 2000). TAG-1-Immunreaktivität ist häufig in Netrin-empfindlichen Axonen und Fortsätzen lokalisiert (Shirasaki et al. 1996). Es soll auch für die Einwanderung der kortikalen Interneurone aus dem basalen Telencephalon erforderlich sein (Denaxa et al. 2001).

Bei den Wanderungen von GABAergen Interneuronen in den Cortex und in die Riechkolben wird das abstoßend wirkende Protein Slit in den angrenzenden Geweben exprimiert. Es verhindert so vermutlich, dass die wandernden Neurone ihre Bahn verlassen (Zhu et al. 1999; Wu et al. 1999). Diese wandernden Interneurone exprimieren auch Neuropilin-Rezeptoren, die ein Einwandern in das Semaphorin-exprimierende Striatum verhindern (Marin et al. 2001). Von den wandernden Interneuronen des Riechkolbens wird eine modifizierte Variante des neuronalen Adhäsionsmoleküls NCAM exprimiert. Ohne die Modifikation, die aus der Addition von Polysialinsäure besteht, ist die Einwanderung der Interneurone gestört und die Riechkolben sind kleiner als normal (Tomasiewicz et al. 1993; Cremer et al. 1994; Ono et al. 1994). Die Neuronenketten werden von einer Lage glialer Zellen umhüllt (Lois et al. 1996). In Kultur zeigen Explantate aus der vorderen Subventrikulärzone ebenfalls Kettenwanderung. Durch Komplementsystem-vermittelte Lyse der glialen Zellen wird das Wanderungsverhalten nicht beeinträchtigt, was zeigt, dass die glialen Zellen für die Kettenwanderung nicht notwendig sind (Wichterle et al. 1997).

**Gliophile Wanderung.** Gliophil wandernde Körnerzellen bilden zur Gliafaser einen spezialisierten „Wanderungskontakt“, wie ultrastrukturelle Untersuchungen von kultivierten Zellen zeigen (Gregory et al. 1988). Sie besitzen auch mindestens ein spezifisches Adhäsionsprotein, „Astrotactin“, mit dessen Hilfe sie sich an gliale Fasern anheften. Astrotactin wird außer im Kleinhirn auch im Cortex und im Hippocampus exprimiert (Zheng et al. 1996).

Das sezernierte Glycoprotein Reelin dient als „Stopp-Signal“ für viele gliophil wandernde Neuronen (Pearlman und Sheppard 1996). Es wird von frühen Neuronen – im Cortex sind es die Cajal-Retzius-Zellen, im Kleinhirn die äußeren Körnerzellen (Miyata et al. 1996) – in den Extrazellulärraum abgegeben und ist für die korrekte Schichtung nachfolgender, gliophil wandernder Neurone erforderlich (D’Arcangelo et al. 1995). Über zwei Membranrezeptoren für Lipoproteine, VLDLR und ApoER2 (Trommsdorff et al. 1999), und möglicherweise auch über das Integrin  $\alpha3\beta1$  (Anton et al. 1999) wird das Reelin-Signal empfangen. Intrazellulär wird es über Disabled weitergeleitet, dessen Mutationen „scrambler“ und „yotari“ einen ähnlichen Phänotyp wie die Reelin-Mutante „reeler“ haben (Howell et al. 1997; Sheldon et al. 1997; Ware et al. 1997).

Die externe limitierende Membran an der Grenze zwischen neuroektodermalem und mesodermalem Gewebe ist eine mechanische Barriere für wandernde Neurone (Lambert und Goffinet 2001). Sie besteht aus den Endfüßen radialer Gliazellen, der Basallamina und den mesodermalen Zellen der Pia mater. Defekte in einem der drei Bestandteile führen zur Invasion der Marginalzone und neuronalen Wanderungsströmen in den Hirnhäuten (Hartmann et al. 1999).

## 1.6 Zielsetzung und experimentelles Vorgehen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten transgene Mäuse hergestellt werden, die (1) eine verbesserte Beobachtung bestimmter neuronaler Wanderungen, (2) eine Analyse der Funktion des Transkriptionsfaktors Pax6 sowie (3) eine funktionelle Beeinflussung anderer, an den Wanderungen beteiligter Moleküle erlauben. In verschiedenen transgenen Linien sollten unter Kontrolle des Pax6-Promotors zum einen das histochemisch einfach nachweisbare Enzym  $\beta$ -Galactosidase, zum anderen der hochspezifische Transaktivator tTA als Reportergene exprimiert werden. Als erste tTA-kontrollierte Transreporterlinie sollte eine GFP-Linie hergestellt werden. Von lacZ und GFP sollten auch Varianten generiert werden, in der nicht alle Pax6-exprimierenden Zellen, sondern nur einzelne Zellen und ihre klonalen Nachkommen markiert sind. Um eine Analyse sowohl vor dem Wildtyp-, dem heterozygoten Pax6<sup>Sey/+</sup>- als auch dem homozygoten Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Hintergrund zu ermöglichen, sollte eine zusätzliche Kopie des Pax6-Promotors zur Expression der Reportergene verwendet werden.

### 1.6.1 Menschliche Pax6-Region als Promotor: P<sub>hPax6</sub>

Die gewebs- und entwicklungsspezifische Expression von Pax6 wird durch eine Vielzahl von cis- und trans-Elementen, Enhancern und Silencern, kontrolliert. Einige dieser Elemente wurden isoliert und zur Expression von Markergenen in Zelllinien und transgenen Mäusen verwendet (Xu und Saunders 1997; Kammandel et al. 1999; Xu et al. 1999). Jedes der bislang untersuchten Kontrollelemente ist nur für einen Teil des komplexen Expressionsmusters von Pax6 verantwortlich. Dabei wurde kein Kontrollelement identifiziert, das die Expression in der Rautenlippe und den tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons kontrolliert. Das komplette Expressionsmuster von Pax6 konnte mit isolierten Enhancerelementen bislang nicht reproduziert werden. Ursache dafür ist unter anderem, dass einige genetische trans-Kontrollelemente sehr weit vom Pax6-Locus entfernt liegen, und daher noch nicht kloniert wurden. Beim Menschen führen über 100 kb von der transkribierten Region entfernte chromosomale Bruchpunkte zu einem Aniridia-Phänotyp (Fantès et al. 1995).

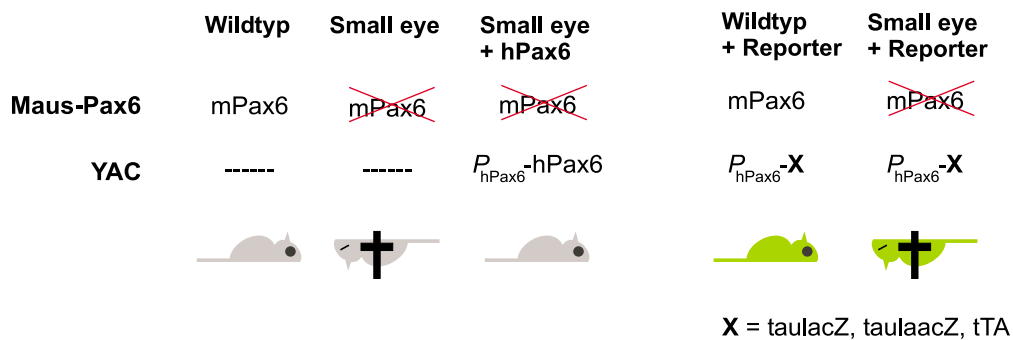
Während also einzelne Elemente nur eine partielle Expression kontrollieren, kann durch Transfer von 420 kb aus der menschlichen genomischen Pax6-Region in transgene Mäuse eine Expression von Pax6 in allen kritischen Geweben erreicht werden: Wenn das menschliche Pax6-Transgen in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäuse eingekreuzt wird, sind diese Mäuse lebensfähig und phänotypisch fast normal (Abb. 6: „Small eye + hPax6“; Schedl et al. 1996). Da bei ihnen beide Maus-Pax6-Allele (mPax6) mutiert



sind, lässt sich schlussfolgern, dass die menschliche Pax6-Kopie (hPax6) alle lebensnotwendigen Funktionen von mPax6 ausfüllen kann. Es ist daher anzunehmen, dass auch das Expressionsmuster von hPax6 mit dem von mPax6 weitgehend übereinstimmt. Dies wurde allerdings nicht direkt durch mRNA- oder Protein-Expressionsanalysen gezeigt.

In dieser Arbeit wurde daher die menschliche genomische Pax6-Region verwendet, um eine gewebs- und entwicklungsspezifische Expression von Reportergenen zu erreichen. Die hPax6-Region wird in diesem Zusammenhang als „Pax6-Promotor“ ( $P_{hPax6}$ ) bezeichnet. Bei diesem Vorgehen werden – wie geplant – die beiden Maus-Allele von Pax6 nicht berührt.

Um Reportergene in den hPax6-Locus einzuführen, muss ein Teil des Locus entfernt und durch die Reportergene ersetzt werden. Um das komplexe Expressionsmuster von Pax6 dabei nicht zu beeinflussen, muss eine Zielregion identifiziert werden, in der sich möglichst keine genetischen Kontrollelemente befinden. Bislang wurden positive Kontrollelemente (Enhancer) in vier Bereichen der Pax6-Region identifiziert (Abb. 2 C; Kammandel et al. 1999). Gute Hinweise auf die Lage von weiteren genetischen Kontrollelementen liefert der Vergleich der Pax6-Region zwischen verschiedenen Spezies. Neben der Protein-kodierenden Sequenz werden auch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf der Ebene der DNA-Sequenz stark konserviert. Zumindest evolutionär alte Kontrollelemente können daher durch Interspeziesvergleiche identifiziert werden. Zur Verfügung standen zum Analysezeitpunkt die menschliche genomische Sequenz (Lander et al. 2001) und die des Pufferfisches *Fugu rubripes* (Miles et al. 1998). Durch einen Vergleich dieser beiden Sequenzen wurde eine Region um die Exons 8 – 11 identifiziert, in denen nur die kodierende Sequenz, nicht jedoch Intronsequenzen konser



**Abb. 6: Transgene Mäuse mit dem künstlichen Hefechromosom Y593**

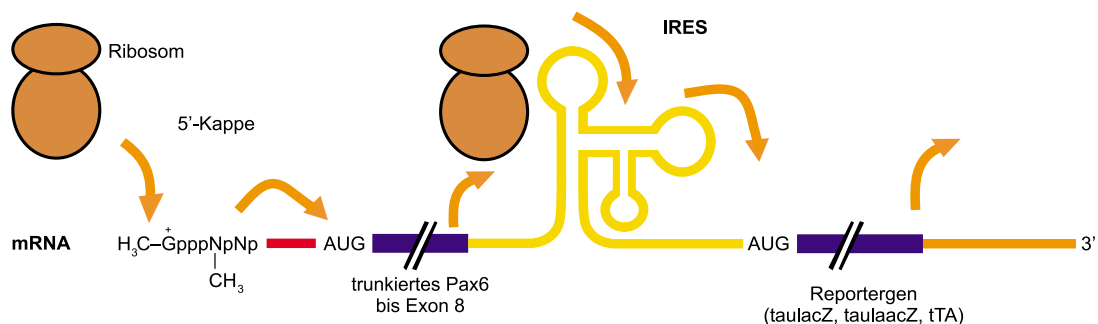
**Wildtyp:** Wildtyp-Mäuse enthalten zwei Kopien des Mäuse-Wildtyp-Allels (mPax6) am Pax6-Locus. Ihr Phänotyp ist normal (im Schema durch eine Maus mit normalem Auge angedeutet). **Small eye:** Homozygote Small-eye-Mäuse haben nur Pax6<sup>sey</sup>-Allele und damit kein funktionelles Pax6. Bei diesen Mäusen entwickeln sich unter anderem keine Augen und sie sterben bei der Geburt (beides angedeutet). **Small eye + hPax6:** Bringt man in Small-eye-Mäuse das künstliche Hefechromosom (YAC) Y593 ein, so lässt sich der Phänotyp retten. Y593 enthält etwa 420 kb aus der Pax6-Region des menschlichen Genoms (siehe Abb. 2). Am Maus-Pax6-Locus befindet sich bei diesen Mäusen das defekte Pax6<sup>sey</sup>-Allel. Das auf dem YAC kodierte menschliche Pax6 (hPax6) übernimmt alle lebensnotwendigen Funktionen von Pax6. Die Expression von hPax6 wird von den menschlichen Pax6-Promotorelementen ( $P_{hPax6}$ ) kontrolliert. **Wildtyp + Reporter:** Diesen auf dem YAC enthaltenen menschlichen Pax6-Promoter kann man verwenden, um Reportergene (X) in Pax6-positiven Zellen zu exprimieren. Dazu muss der YAC so verändert werden, dass er statt Pax6 das Reportergen kodiert. Dieser YAC wird dann zur Herstellung transgener Mäuse verwendet. Da die Maus-Pax6-Allele unverändert bleiben, sind diese Mäuse phänotypisch normal. **Small eye + Reporter:** Durch Einkreuzen in Small-eye-Mäuse können auch Tiere mit dem Reportergen gezüchtet werden, bei denen beide mPax6-Allele mutiert sind. Da das Reportergen auch hier in Pax6-positiven Zellen exprimiert wird, kann einfach analysiert werden, in welcher Weise diese Zellen verändert sind.

viert waren (Abb. 2 B; D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten). Daher sollten Reportergene in diese Region durch homologe Rekombination eingebracht werden.

Es war nicht beabsichtigt, ein Fusionsprotein aus der Paired-Domäne von Pax6 und dem Reporter herzustellen. Daher sollte eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) aus dem Encephalomyokarditisvirus (EMCV) eingefügt werden. Aufgrund ihrer mRNA-Sekundärstruktur bewirkt die IRES die Bindung von Ribosomen und die Translation von Proteinen, wenn das Startcodon (AUG) sich in bestimmten Positionen hinter der IRES befindet (Abb. 7; Pelletier und Sonenberg 1988). Die EMCV-IRES wurde in transgenen Mäusen bereits eingesetzt, um die Expression von Reportergenen zu erreichen (Kim et al. 1992; Mountford et al. 1994). Dabei wurden keine Toxizität und keine gewebsspezifischen Effekte auf die Genexpression gefunden (Mountford und Smith 1995).

Durch die Einfügung der internen ribosomalen Eintrittsstellen würden also von der transgenen mRNA zwei Proteine kodiert: ein Rest des menschlichen Pax6-Proteins, das nach der Paired-Domäne abbricht, und ein vollständiges Reporterprotein. Das verstümmelte Pax6-Protein entspricht etwa dem Rest, der auch in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen hergestellt wird. Das kurze Restprotein hat mit hoher Wahrscheinlichkeit keine dominant negative Funktion, denn der Phänotyp verschiedener Pax6-Mutationen ist, soweit bekannt, identisch, und somit unabhängig von der genauen Lage der Mutation und der Länge des daraus resultierenden verstümmelten Proteins (Callaerts et al. 1997; Singh et al. 1998).

Als Vehikel für die Vervielfältigung und Modifikation der hPax6-Region wird ein künstliches Hefechromosom (engl. „Yeast Artificial Chromosome“, YAC) verwendet, das etwa 420 kb aus dem menschlichen Genom beinhaltet (Abb. 2 D; Schedl et al. 1996). In dieses YAC Y593 sollten in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durch homologe Rekombination verschiedene Reportergene eingeführt werden (Abb. 10) . Anschließend sollte das YAC aufgereinigt und durch Oocyten-Mikroinjektion in die Keimbahn von Mäusen eingebracht werden. YACs enthalten zwar alle für die Replikation und stabile Erhaltung als Hefechromosom notwendigen Elemente, können in Säugetieren jedoch nur – wie andere Transgene auch – als Teil eines Wirtschromosoms stabil in das Genom integriert werden.



**Abb. 7: Funktionsweise einer IRES**

In der Regel binden Ribosome an die 5'-Kappe der mRNA. Anschließend suchen sie die mRNA in 5'-3'-Richtung ab, bis sie das erste Startcodon (AUG) finden. Dort beginnen sie mit der Proteinsynthese. Nach Erreichen des Stopcodons fallen sie von der mRNA ab. Hinter dem Stopcodon befindliche Sequenzen werden durch diesen Mechanismus nicht translatiert. Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ermöglicht die Translation eines zweiten Polypeptids von einer mRNA. Durch ihre spezielle Sekundärstruktur führt sie zur direkten Bindung von Ribosomen an ein Startcodon in unmittelbarer Nähe der IRES, und die darauf folgende Sequenz wird translatiert. In dieser Arbeit sollte in die kodierende Sequenz des menschlichen Pax6-Gens im Bereich des Exons 8 eine IRES eingefügt werden. Dahinter sollten verschiedene Reportergene kodiert werden. Statt des intakten Pax6-Gens würden von dieser mRNA ein verstümmeltes, inaktives Pax6-Allel und das intakte Reporter-gen kodiert.

## 1.6.2 Reportergene

Indem ein Reportergen hinter einen Promotor und genetische Kontrollelemente eingefügt wird, lässt sich deren gewebs- und entwicklungspezifische Aktivität nachweisen. Reportergene sollten ein stabiles Produkt kodieren, das die normale Funktion des Gewebes oder der Zelle, in der es exprimiert wird, nicht beeinträchtigt und darüber hinaus auch mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann.

### 1.6.2.1 Tau- $\beta$ -Galactosidase

Das lacZ-Gen aus *Escherichia coli*, das für die Glycosidhydrosylase  $\beta$ -D-Galactosidase ( $\beta$ -Galactosidase, E.C. 3.2.1.23) kodiert, ist aufgrund seiner umfassenden genetischen und biochemischen Charakterisierung ein häufig gebrauchtes Reportergen (MacGregor et al. 1991).  $\beta$ -Galactosidase ist ein tetrameres Enzym aus vier identischen Untereinheiten von je 135 kDa (Jacobson et al. 1994; Kouhara et al. 1995). Seine Aktivität kann mit verschiedenen chromogenen und fluorogenen Substraten nachgewiesen werden. Für histochemische Färbungen wird als Substrat häufig 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid (X-Gal) verwendet. Etwa  $10^3$   $\beta$ -Galactosidase-Moleküle je Zelle sind für eine Anfärbung mit X-Gal erforderlich (MacGregor et al. 1991).

In transgenen Mäusen führt die Expression von lacZ unter der Kontrolle verschiedener Promotoren zu keinen bekannten Beeinträchtigungen. Unter anderem der Promotor der neuronalen Enolase (Forss-Petter et al. 1990) oder des  $\beta$ -Amyloidproteins (Wirak et al. 1991) wurden zur Expression im ZNS verwendet.

$\beta$ -Galactosidase diffundiert – vermutlich aufgrund seiner Größe – nur unvollständig in die Fortsätze von Neuronen und radialen Gliazellen.<sup>1</sup> lacZ kann an seinem N-Terminus mit anderen Polypeptiden fusioniert werden, die zu einer Lokalisation in bestimmten Zellkompartimenten führen, zum Beispiel dem Nucleus (Bonnerot und Nicolas 1993a). Um eine Anfärbung von Neuriten auf ihrer ganzen Länge zu erreichen, hat sich ein Fusionsprotein zwischen dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau (aus dem Hausrind *Bos taurus*) und lacZ als nützlich erwiesen (taulacZ; Callahan und Thomas 1994). Es wurde verwendet, um in transgenen Mäusen die Axone von olfaktorischen Projektionsneuronen über ihre gesamte Länge anzufärben (Mombaerts et al. 1996; Rodriguez et al. 1999).

Um Pax6-exprimierende Neuronen und radiale Gliazellen in ihrer gesamten Ausdehnung darzustellen, sollten in dieser Arbeit transgene Mäuse hergestellt werden, die unter Kontrolle des hPax6-Promotors taulacZ exprimieren.

### 1.6.2.2 Grün Fluoreszierendes Protein

Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) aus der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* hat sich innerhalb weniger Jahre seit seiner Klonierung (Prasher et al. 1992; Inouye und Tsuji 1994) zu einem der wichtigsten zellulären Marker entwickelt. Aufgrund seiner Fluoreszenz kann es sowohl in lebendem als auch fixiertem Gewebe einfach nachgewiesen werden. Seine Anregungs- und Emissionsmaxima von 395/475 beziehungsweise 510 nm lassen einen mikroskopischen Nachweis mit dem gebräuchlichen Fluorescein-Filtersatz zu. Da GFP ein Protein ist, kann seine Expression in heterologen Systemen allein durch die cDNA erreicht werden (Chalfie et al. 1994). Das Chromophor von GFP

---

<sup>1</sup> Dies ist sicherlich eine der Ursachen, warum die Bedeutung von radialen Gliazellen als Stammzellen in frühen retroviralen klonalen Markierungsexperimenten mit  $\beta$ -Galactosidase nicht erkannt wurde: zu selten waren radiale Gliazellen über ihre ganze Ausdehnung angefärbt.

wird vollständig aus der Polypeptidkette gebildet (durch spontane Zyklisierung und Oxidation), ohne exogene Cofaktoren und Substrate außer molekularem Sauerstoff. In der einzigartigen fassförmigen Tertiärstruktur des Proteins ist das Chromophor gegenüber dem Zellmilieu sehr gut abgeschirmt (Ormö et al. 1996; Yang et al. 1996). GFP bleicht auch unter intensivem Licht kaum aus und weist eine minimale Fototoxizität auf. Da es ein kleines (26.9 kDa) monomeres Protein ist, ist es sehr diffusibel und beispielsweise geeignet, Neuronen bis in ihre feinen Fortsätze hinein anzufärben. GFP ist nicht toxisch. Transgene Mäuse, die GFP ubiquitär in allen Körpergeweben exprimieren, sind lebensfähig, fertil und weisen auch sonst keinen Phänotyp auf (Okabe et al. 1997). All diese Charakteristika machen GFP zu einem fast idealen Reporter gen.

Durch Modifikation der Polypeptidsequenz wurden eine Vielzahl von GFP-Varianten mit veränderten spektralen Eigenschaften, höherer Quantenausbeute und verbesserter Faltung bei 37 °C entwickelt. Für eine Variante (EGFPm) wurde eine besonders gute Eignung für die Expression in ZNS-Gewebe und in Mäuse-ES-Zelllinien gefunden (Okada et al. 1999; Zernicka-Goetz et al. 1997).

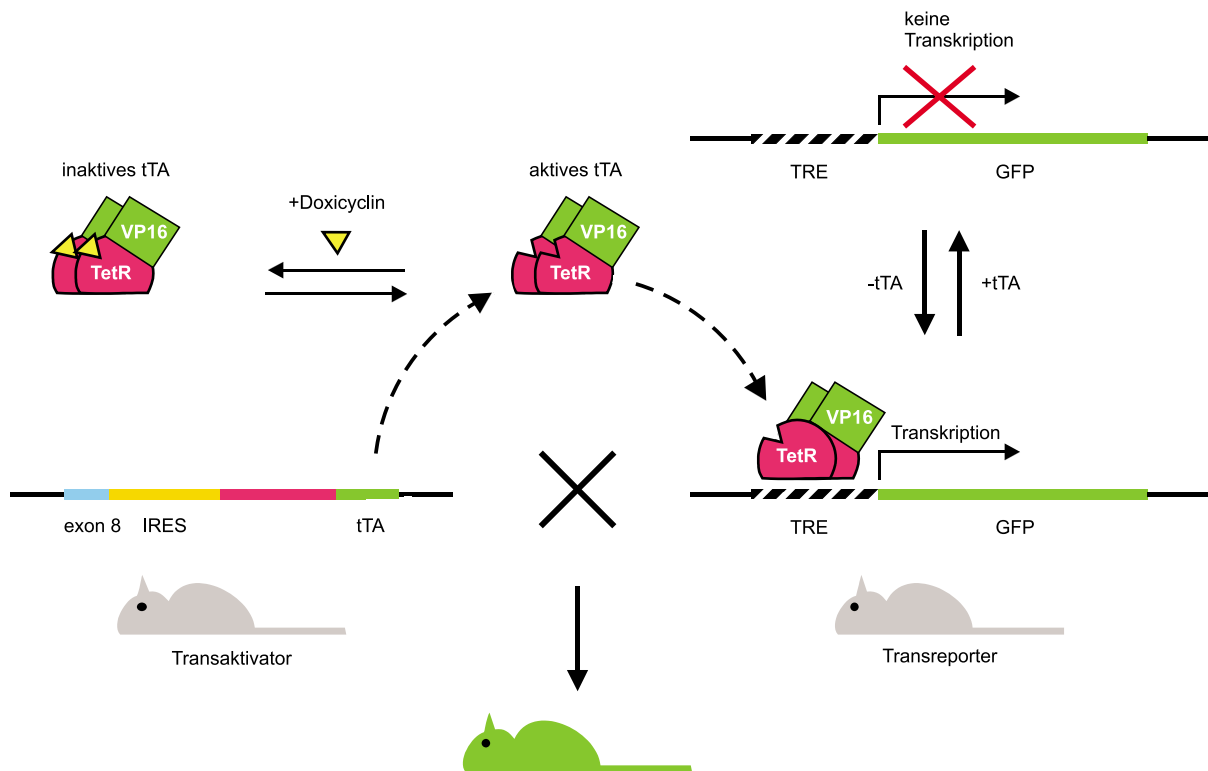
Durch die Anfügung eines dreifach wiederholten 3'-terminalen nukleären Lokalisierungssignal aus dem großen SV40-T-Antigen lassen sich Proteine effizient im Zellkern exprimieren (Fischer-Fantuzzi und Vesco 1988). Es wurde angenommen, dass durch die Lokalisierung im Kern eine weitere Konzentration des Fluoreszenzsignals zum Nachweis auch geringer Expressionsraten erreicht werden kann. Daher wurden, ausgehend von EGFP, die Varianten EGFPm (Okada et al. 1999) und nukleäres EGFPm (EGFPmn) hergestellt.

In dieser Arbeit sollte EGFPm unter der Kontrolle des menschlichen Pax6-Promotors in transgenen Mäusen exprimiert werden. Da befürchtet wurde, dass die Transkriptionsrate von  $P_{hPax6}$  in vielen Zellen zu niedrig ist, um zu einer nachweisbaren Menge von EGFPm zu führen, insbesondere in den Fortsätzen von Neuronen, sollte ein Expressionsverstärker eingesetzt werden. Wie unten erläutert wird, sollte das Tetracyclin-kontrollierte-Transaktivatorsystem verwendet werden. Dieses bietet neben der erwarteten Verstärkung des Expressionsniveaus auch andere Vorteile, wie zum Beispiel die Steuerung der Transaktivatoraktivität durch Tetracycline und eine hohe Flexibilität bei der Auswahl der Transreporterlinien.

### 1.6.2.3 Tetracyclin-kontrolliertes binäres Reportersystem

Binäre Reportersysteme unterscheiden sich von einfachen Reporter genen dadurch, dass unter der Kontrolle des gewebsspezifischen Promotors zunächst ein Transaktivator exprimiert wird, der seinerseits erst durch Bindung an spezifische DNA-Elemente die Expression des Reporter gens kontrolliert (Abb. 8). Diese binären Systeme bieten den Vorteil, dass eine einmal generierte Transaktivatorlinie in verschiedene Transreporterlinien eingekreuzt werden kann. Der Aufwand für die Herstellung von YAC-transgenen Mäusen muss daher nur einmal – für die Transaktivatorlinie – in Kauf genommen werden, während die Transreporterlinien einfache Plasmid-Transgene sein können. Zudem kann durch den Transaktivator eine Verstärkung der Expression erreicht werden.

Verschiedene Transaktivatoren sind in transgenen Mäusen getestet worden, beispielsweise das tat-Gen aus dem humanen Immundefizienzvirus (HIV; Khillan et al. 1988), das tax-Gen aus dem humanen T-Zell-lymphotrophen Virus (HTLV; Nerenberg et al. 1987), der VP16-Transaktivator aus dem Herpes simplex-Virus (Byrne und Ruddle 1989), der in *Drosophila melanogaster* häufig gebrauchte Hefe-Transaktivator GAL4 (Ornitz et al. 1991) und ein Fusionsprotein aus dem Tetracyclin-Repressor (TetR) aus *Escherichia coli* und der Transaktivierungsdomäne von VP16 (Kistner et al. 1996). Während viele dieser binären Reportersysteme eine ungenau regulierte Expression aufweisen oder zu onkogenischen Veränderungen führen, zeichnet sich das Tetracyclin-kontrollierte System durch hohe



**Abb. 8: Funktionsweise des Tetracyclin-kontrollierten binären Reportersystems**

In binären Reportersystemen werden für die Expression eines Reportergens, in diesem Beispiel des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP), zwei unabhängige DNA-Konstrukte verwendet, ein Transaktivator und ein Transreporter. So ist es möglich, lediglich eine aufwändige YAC-transgene Transaktivatorlinie herzustellen und doch eine Vielzahl verschiedener Reporter- oder Effektorgene zu exprimieren. In der Transaktivatorlinie wird der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA) unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors exprimiert, in diesem Fall unter der Kontrolle des menschlichen Pax6-Promotors. Dadurch liegt in allen Pax6-positiven Zellen aktives tTA vor. Aktives tTA bindet mit hoher Spezifität an doppelsträngige DNA einer bestimmten Sequenz, das sogenannte Tet-Response-Element (TRE), welches im Maus-Genom nicht vorkommt. Durch das Einbringen von TRE-enhaltenden Transreporterkonstrukten wird eine hochspezifische Expression erreicht. Die Reporterkonstrukte können wie in diesem Beispiel durch Kreuzung mit Transreporterlinien oder durch transienten Gentransfer, zum Beispiel durch Elektroporation, eingebracht werden. tTA ist ein Fusionsprotein mit zwei Domänen. Mit seiner Tetracyclin-Repressor-(TetR)-Domäne bindet es hochspezifisch an TRE auf dem Transreporterkonstrukt. Die VP16-Domäne führt zu einer starken Aktivierung der Transkription des stromabwärts von TRE gelegenen Gens (hier GFP). In Abwesenheit von tTA wird das Reportergen nicht transkribiert. Zusätzlich lässt sich tTA durch Doxycyclin inaktivieren, was eine weitere zeitliche Steuerung der Expression erlaubt.

Spezifität aus und führt zu keinen bekannten phänotypischen Veränderungen in transgenen Mäusen (Kistner et al. 1996). Es sollte daher hier verwendet werden.

Das Fusionsprotein aus dem Tetracyclin-Repressor (TetR) aus *Escherichia coli* und der Transaktivierungsdomäne von VP16 wird als Tetracyclin-kontrollierter-Transaktivator (tTA) bezeichnet (Abb. 8). Es bindet mit seiner TetR-Domäne hochspezifisch an eine 42 bp lange doppelsträngige DNA-Sequenz, die als TetR-Response-Element (TRE) bezeichnet wird. Die VP16-Domäne aus dem Herpes simplex-Virus Typ 1 ist ein starker transkriptioneller Aktivator (Triezenberg et al. 1988). Zugabe von Tetracyclinen, beispielsweise Doxycyclin, führt zu einer Konformationsänderung der TetR-Domäne und zum Verlust der DNA-Bindefähigkeit. Die Aktivität von tTA lässt sich so durch den Zusatz von

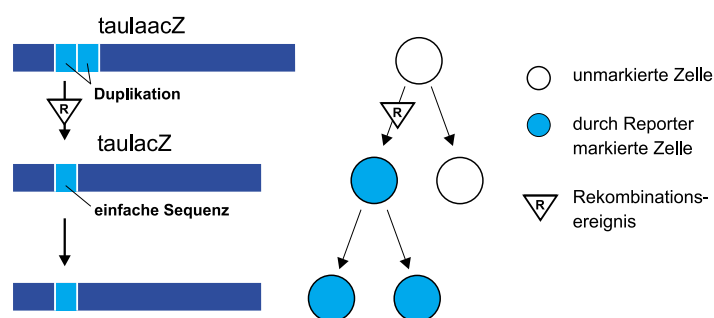
Doxycyclin zum Zellkulturmedium oder, bei transgenen Mäusen, zum Trinkwasser kontrollieren (Gossen und Bujard 1992; Kistner et al. 1996).

Für die tTA-abhängige Expression wird häufig eine Kombination aus sieben TRE-Wiederholungen und dem minimalen Promotor (ohne Enhancer) des Cytomegalievirus verwendet (Gossen und Bujard 1992). Als erster Transreporter sollte in dieser Arbeit eine transgene Mäuselinie hergestellt werden, die EGFP<sub>mn</sub> unter der Kontrolle des Tetracyclin-abhängigen Transaktivators exprimiert.

### 1.6.2.4 Klonale Markierung durch intragenische Rekombination

Um Zellklone, also Zellen mit einer gemeinsamen Vorläuferzelle, zu markieren, erfordern die meisten Methoden einen experimentellen Eingriff, bei dem Retroviren, Fluoreszenzfarbstoffe oder andere Marker gezielt oder zufällig in Vorläuferzellen eingebracht werden. Eine Alternative, die keinen experimentellen Eingriff erfordert, sondern selbsttätig abläuft, bieten Markergene, die durch eine intragenische Duplikation inaktiviert wurden. Während die Rekombination zwischen Chromosomenpaaren auf die Meiose und damit auf Keimbahnzellen beschränkt ist, kann zwischen zwei identischen Sequenzen, die sich im Genom direkt hintereinander befinden, auch in somatischen Zellen eine Rekombination stattfinden („Genkonversion“; Lambert et al. 1999). Dabei kann die Duplikation eliminiert und das intakte Gen wieder hergestellt werden.

Dieser Mechanismus der somatischen Rekombination wird beim Reporter gen „lacZ“ ausgenutzt: Bei dieser lacZ-Variante ist in die kodierende Sequenz eine intragenische Duplikation von 289 Basen Länge eingefügt (Abb. 9; Bonnerot und Nicolas 1993b). Durch diese Duplikation ist das Reporter gen inaktiv, da es zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese kommt. Erst wenn in einer Zelle durch eine zufällige somatische Rekombination die Duplikation eliminiert worden ist, entsteht ein funktionelles Reporter gen, das in allen Tochterzellen dieser Zelle exprimiert werden kann. Die Rekombinationswahrscheinlichkeit beträgt hier zwischen  $1.4 \times 10^{-6}$  bis  $1.2 \times 10^{-5}$  je Zellteilung (Bonnerot und Nicolas 1993b). Mit diesem System wurden Zellstammbäume im Myotom und in verschiedenen Teilen des ZNS analysiert; es wurde dabei eine nukleär-lokalisierte lacZ-Version eingesetzt (Nicolas et al. 1996; Mathis et al. 1997; Mathis et al. 1999; Mathis und Nicolas 2000).



**Abb. 9: Klonale Markierung durch intragenische Rekombination**

Durch intragenische Rekombination lassen sich eine Stammzelle und alle ihre Tochterzellen elegant markieren. Dazu wird in eine transgene Linie ein Reporter gen eingebracht, das durch die Wiederholung eines kurzen Sequenzabschnitts, also eine intragenische Duplikation, inaktiviert wurde (in diesem Beispiel das Gen taulaacZ). Unmittelbar aufeinander folgende Sequenzen können in somatischen Zellen zufällig miteinander rekombinieren. Durch diesen Mechanismus wird in seltenen Fällen die Duplikation eliminiert, woraus ein intaktes Reporter gen resultiert. In der Zelle, in der die Rekombination stattgefunden hat und allen ihren Nachkommenzellen kann das Reporter gen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollten von taulacZ und EGFP<sub>mn</sub> durch intragenische Duplikationen inaktivierte Varianten hergestellt und zur Generierung von transgenen Linien verwendet werden. Für die inaktivierte taulacZ-Variante, „taulaacZ“, musste taulacZ mit laacZ kombiniert werden. Gegenüber laacZ bietet diese Variante den Vorteil, dass wie beschrieben auch neurale Zellen in ihrer gesamten Ausdehnung angefärbt werden.

Durch intragenische Duplikation inaktivierte GFP-Varianten sind bislang nicht veröffentlicht. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine derartige GFP-Variante entwickelt und in Zellkultursystemen charakterisiert werden. Aus ihr sollte dann eine tTA-kontrollierte Transreporterlinie hergestellt werden.

### 1.6.3 Elektroporation und organotypische Kultur

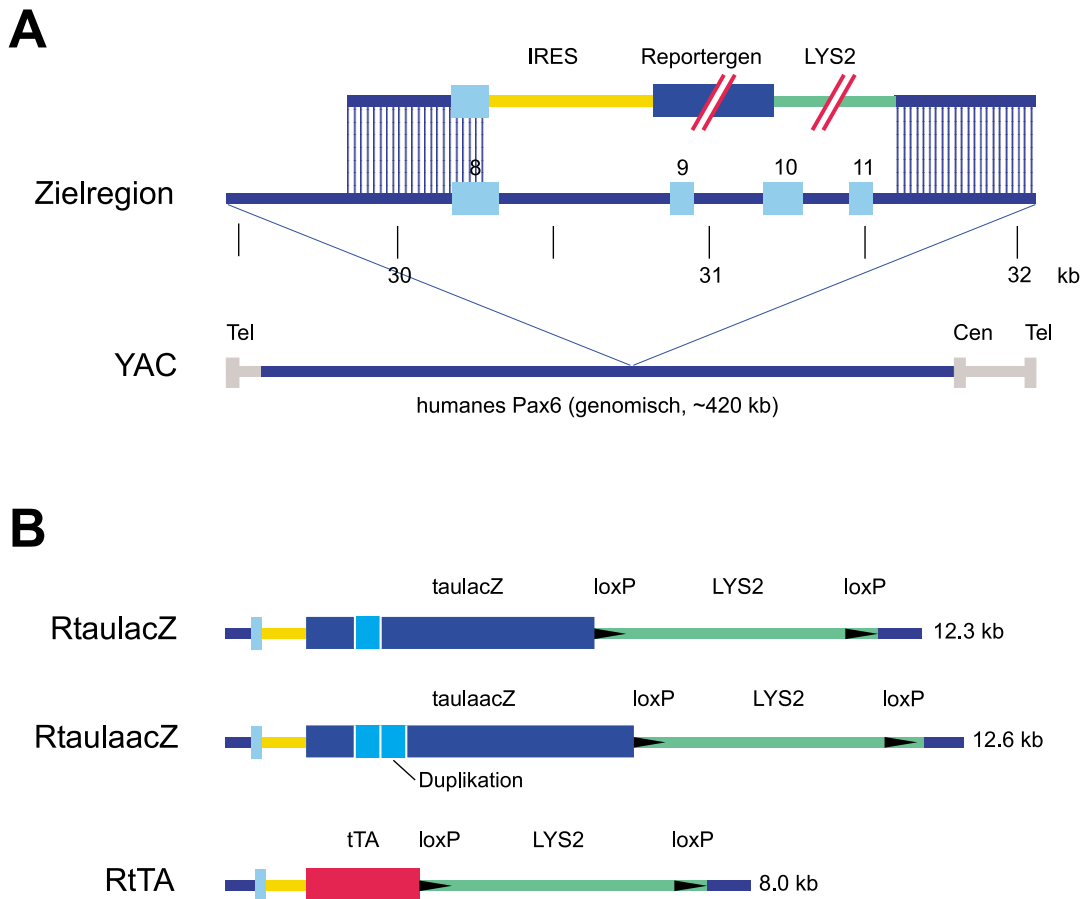
Für die Generierung und Charakterisierung von Tetracyclin-Transaktivator- und -Transreporterlinien kann ein langer Zeitraum erforderlich sein, und erst wenn beide Linien miteinander verkreuzt worden sind, wird die gewünschte gewebs- und entwicklungsspezifische Expression des Reportergens erreicht. Die Funktionsfähigkeit der transgenen Linien kann jedoch auch unabhängig voneinander in organotypischen Kulturen getestet werden, wenn die jeweils fehlende Komponente durch Gentransfer in das zu untersuchende Gewebe eingebracht wird.

Ein Nachteil des Modellorganismus Maus ist es, dass der größte Teil der Entwicklung im Mutterleib stattfindet und experimenteller Beeinflussung schwer zugänglich ist. Mit Hilfe von organotypischen Kulturen kann diese Einschränkung ansatzweise überwunden werden, denn isolierte Teile des ZNS können auch außerhalb des Uterus eine organotypische Entwicklung durchlaufen (Gähwiler et al. 1997). So lässt sich in einem Membrankultursystem der Medulla von E12.5-Mausembryonen die Wanderung von Zellen aus der Rautenlippe über einige Tage verfolgen (D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten). Derartige Medullakulturen sollten von  $P_{hPax6}$ -tTA-Transaktivatormäusen angelegt und in sie durch Gentransfer Reporterkonstrukte eingebracht werden.

Für den Gentransfer stehen verschiedene Transfektionsmethoden zur Verfügung, beispielsweise virale Infektion, ballistische Methoden („gene gun“), Lipofektion und Mikroinjektion. Eine für relativ neue Gentransfermethode ist die Elektroporation im intakten Gewebsverbund, die auf der Permeabilisierung von Zellmembranen durch kurze Pulse eines elektrischen Feldes beruht (Ho und Mittal 1996). Sie bietet gegenüber den „klassischen“ Methoden einige Vorteile (Haas et al. 2001): So werden die potentiellen toxischen Effekte von viralem Transfer oder Lipofektion und die physische Schädigung durch ballistischen Transfer oder Mikroinjektion vermieden. Fast alle Zelltypen scheinen für Elektroporation zugänglich zu sein, auch postmitotische Neuronen. Elektroporation ist auch deutlich effizienter als Lipofektion, Mikroinjektion oder ballistischer Transfer, was sich in einer höheren Zahl transfizierter Zellen und der Intensität der Genexpression ausdrückt (Muramatsu et al. 1997). Im Hühnchen wird der Gentransfer durch Elektroporation für viele entwicklungsbiologische Fragestellungen verwendet (Swartz et al. 2001); in der Maus wurde sie für die Transformation ventrikulärer Zellen des Rhombencephalons und des Telencephalons an E9.5 und E10.5 erstmals beschrieben (Akamatsu et al. 1999; Miyasaka et al. 1999).

### 1.6.4 Zielsetzung: Zusammenfassung

Das hauptsächliche Ziel dieser Arbeit war es, transgene Mausmodelle zu entwickeln, die eine weitere Aufklärung der Rolle von Pax6 in neuronalen Zellwanderungen während der Entwicklung des ZNS ermöglichen. Dies umfasste die Herstellung der DNA-Konstrukte, ihre Überprüfung in Zellkulturexperimenten, die Mikroinjektion in Mäuse-Oocyten mit anschließendem Transfer in den Eileiter von



**Abb. 10: YAC-Konstrukte für Mikroinjektionen**

**A:** Durch Verwendung eines etwa 420 kb langen Abschnitts um den menschlichen Pax6-Locus sollte in transgenen Mäusen eine Expression von Reporter genen in Pax6-positiven Zellen erreicht werden. Dazu wurde eine 1.5 kb lange Region zwischen den Exons 8 und 11 durch Reporter genkonstrukte ersetzt. Diese Konstrukte enthielten eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), wodurch der Reporter als neues Protein, nicht als Fusionsprotein mit Pax6 translatiert wird. Das LYS2-Gen dient zur Selektion während der Herstellung des veränderten YACs in der Hefe. Da es von loxP-Sequenzen flankiert ist, kann es mit Hilfe der Cre-Rekombinase entfernt werden. **B:** Es sollten YACs mit drei verschiedenen Reporter genen verwendet werden: taulacZ ist ein Fusionsprotein aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau und dem histochemisch nachweisbaren Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Dadurch sollen sich Pax6-positive Neurone inklusive ihrer Fortsätze vollständig darstellen lassen. taulaacZ ist eine inaktivierte Variante von taulacZ, die eine Darstellung von Zellklonen ermöglichen soll (siehe Abb. 9). tTA ist der Tetracyclin-abhängige Transaktivator, der die Expression von beliebigen Reporter genen ermöglicht (siehe Abb. 8).

Leihmüttern, die Genotypisierung von Gründertieren per PCR und, sofern transgene Gründertiere erhalten wurden, die Analyse der Transgenexpression.

Um eine Verbesserung der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungsmöglichkeiten zu erreichen, sollte in die Pax6-exprimierenden Zellen eine spezifische Markierung eingeführt werden, die sich über die gesamte Ausdehnung der Zelle verteilt. Diese zusätzliche, periphere Markierung der Pax6-exprimierenden Zellen ließe sich einfach mit anderen peripheren Markern kolokalisieren. Sie kann so Aufschluss darüber geben, in welchen Zelltypen Pax6 eine Rolle spielt. Daher sollte eine YAC-transgene Mäuselinie hergestellt werden, die das Reporter gen taulacZ unter der Kontrolle des menschlichen Pax6-Promotors exprimiert (Linie  $P_{\text{hPax6-taulacZ}}$ ). Dazu sollte eine Zielregion im Be-



reich der Exons 8 – 11 der menschlichen genomischen Pax6-Region, die in einem YAC enthalten ist, durch homologe Rekombination in der Hefe gegen das Reporterkonstrukt ausgetauscht werden (Abb. 10). Dieser modifizierte YAC sollte dann durch Oocyten-Injektion in die Keimbahn von Mäusen eingeführt werden. Um zu zeigen, dass der menschliche Pax6-Promotor in transgenen Mäusen zu einer äquivalenten Expression wie Maus-Pax6 führt, sollte das Expressionsmuster des Transgens in einer Entwicklungsreihe untersucht werden.

Von der Linie  $P_{hPax6}$ -taulacZ sollte eine Variante hergestellt werden, bei der das lacZ-Gen durch eine intragenische Duplikation inaktiviert ist (Linie  $P_{hPax6}$ -taulaacZ). Diese Linie sollte dazu dienen, einzelne Zellen, in denen das lacZ-Gen durch eine somatische Rekombination aktiviert wurde, sowie deren Tochterzellen anzufärben. Dies würde eine klonale Analyse von Pax6-exprimierenden Zellen, beispielsweise in der äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns erlauben.

Die dritte YAC-transgene Mäuselinie, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden sollte, dient dazu, gezielt in Pax6-exprimierenden Zellen beliebige andere DNA-Konstrukte zu exprimieren und einen Verstärkungseffekt zu erreichen. Dazu sollte unter der Kontrolle des hPax6-Promotors ein hochspezifischer Transkriptionsfaktor, der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA) exprimiert werden (Linie  $P_{hPax6}$ -tTA). Durch das Einführen von Reporter-DNA-Konstrukten, die eine Erkennungssequenz für tTA beinhalten, kann gezielt die Expression von neutralen Reportergen oder funktionellen Effektorgen in den Pax6-exprimierenden Zellen gesteuert werden. Die Funktionsfähigkeit dieser Linie kann mittels Gentransfer in Zellkulturexperimenten überprüft werden: dazu sollten in die Medulla per Elektroporation GFP-Reporter-Konstrukte transferiert werden um so zu überprüfen, ob die Expression auf Pax6-exprimierende Zellen beschränkt ist. Die Wanderungen der Zellen sollten nach Möglichkeit während einiger Tage in Kultur dargestellt werden.

In eine erste Transreporterlinie sollte das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle einer tTA-Erkennungssequenz eingebracht werden. So sollte eine Fluoreszenzmarkierung der Pax6-exprimierenden Zellen erreicht werden, was eine Beobachtung ihres Wanderungsverhaltens in vitro ermöglicht (Linie TRE-EGFPmn). Um eine klonale Markierung auch mit GFP zu ermöglichen, sollte eine inaktivierte Variante von EGFPmn hergestellt, getestet und zur Herstellung einer Transreporterlinie verwendet werden (Linie TRE-EGFP270mn).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Geräte**

##### **2.1.1.1 Mikroskopie**

Photomikroskop Axiophot, Zeiss (Oberkochen) mit Plan-Neofluar Objektiven 2,5x/0,075 (Objektivvergrößerung/Numerische Apertur), 10x/0,30, 20x/0,50, 40x/0,75, 63x/1,25 Öl sowie mit Objektiven mit weitem Arbeitsabstand UD 20x/0,57 C und UD 40x/0,65 C. Fluoreszenzsatz 09 zur Beobachtung von GFP (Anregungsfilter: Bandpass 450-490 nm, Strahlenteiler: 510 nm, Sperrfilter: Tiefpass 520 nm).

Gekühlte CCD-Kamera Spot 2 für Axiophot, Visitron (Puchheim).

Stereomikroskop MZ12, Leica (Heerbrugg/Schweiz) mit Objektiv Plan 1,0x, 35mm-Kamera MPS 60 mit Databack und Fluoreszenzmodul mit Filtersatz für GFP (Anregungsfilter: Bandpass 460-500 nm, Strahlenteiler: 505 nm, Sperrfilter: Tiefpass 510 nm).

##### **2.1.1.2 Oocyten-Mikroinjektion**

Vibrationsgedämpfter Arbeitstisch Serie 63, Spindler & Hoyer (Göttingen).

Invertiertes Mikroskop DM IRB, Leica (Bensheim), mit Objektiven 10x und 40x.

Zwei elektronische Mikromanipulatoren PatchMan 5171, Eppendorf (Hamburg).

Injektionssystem Transjector, Eppendorf (Hamburg)

Kapillardruckkontrollsystem Cell Tram Air, Eppendorf (Hamburg)

Horizontales Elektrodenziehgerät Sutter Instruments P-97 (über Heka, Lambrecht/Pfalz).

##### **2.1.1.3 Histologie und Präparation**

Vibratom Typ 1000, Technical Products International (St. Louis/USA)

Gefriermikrotom Frigocut 2700, Reichert-Jung (Nussloch)

Präparationsbesteck: Fine Science Tools (Heidelberg), Aesculap (Tuttlingen)

Horizontaler Kapillarpuller DMZ Universalpuller, Zeitz Instrumente (Augsburg)

##### **2.1.1.4 Molekularbiologie**

Horizontale Gelelektrophoresekammern Mini-Sub Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT und Sub Cell 192, Biorad (München)

Vertikale Gelelektrophoresekammer Mini-Protean II, Biorad (München)

Regelbares Netzgerät Power Pac 300, Biorad (München)

Gekühltes Wechselfeldelektrophoresesystem CHEF DR II, Biorad (München)

Geldokumentationssystem Eagle Eye, Stratagene, über Biocrest (Amsterdam, Niederlande)

Elektroporator für Bakterien E. coli Pulser, Biorad (München)

PCR-Thermocycler MJ Research PTC-200 DNA Engine, Biozym (Hess. Oldendorf)

Photometer zur DNA-Mengenbestimmung GeneQuant, Pharmacia (Erlangen)

Spektrophotometer LC-55, Perkin Elmer (Überlingen)

Sonifikator Branson 250, Spitze Typ 102

Lumineszenz-Spektrometer LS50B, Perkin Elmer (Überlingen)

Tischzentrifugen Heraeus Biofuge fresco und Biofuge pico, Kendro (Hanau)

Zentrifuge für Bakterienkulturen Heraeus Typ 4123, Kendro (Hanau)  
Zentrifuge Sorvall Super T-21 mit Rotoren SL-50T und SL-250T, Kendro (Hanau)  
UV-Crosslinker Stratalinker 1800, Stratagene, über Biocrest (Amsterdam, Niederlande)  
Brutschränke Heraeus Typ B12, B6, Kendro (Hanau)  
Wasserbad Typ 1003, GFL (Burgwedel)  
Schüttelinkubator Typ 3033, GFL (Burgwedel)  
Apothekerwaage Spoerhase Typ B6, Sartorius (Göttingen)  
Laborwaage Typ 1419 MP8-1, Sartorius (Göttingen)

### 2.1.1.5 Zellkultur

Inverses Mikroskop, Zeiss (Oberkochen) mit Objektiv 40/0,60  
Schüttelwasserbad Typ 1083, GFL (Burgwedel)  
Sicherheitswerkbänke Heraeus LaminAir TL und HeraSafe HS12, Kendro (Hanau)  
CO<sub>2</sub>-begaste Brutschränke Heraeus, Kendro (Hanau)  
Elektroporations-Impulsgenerator EPI 600 R, Dr. L. Fischer (Heidelberg)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Feinchemikalien der Reinheitsgrade „zur Analyse“, „für die Molekularbiologie“ oder „für die Zellkultur“: Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Biorad (München), Roche (Mannheim).  
Diverse Kits zur Aufreinigung von DNA: Qiagen (Hilden).  
Enzyme zur Modifikation von DNA: Roche (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Qiagen (Hilden).  
Borosilicatglaskapillaren: Hilgenberg (Malsfeld)  
Sterilfilter: Millipore (Eschborn)  
Plastikwaren für die Zellkultur: Life Technologies (Karlsruhe), Greiner (Frickenhausen)

### 2.1.3 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

100x Adenin-Lösung: 4 g/l Adenin unter Zugabe einiger Tropfen HCl in H<sub>2</sub>O bidest. lösen; sterilfiltrieren; bei 4 °C aufbewahren.

30x/6% α-Amino adipat-Lösung: L-α-Amino adipat durch Zutropfen von 1M KOH (oder NaOH) lösen, dann mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 6%-ige Lösung auffüllen, steril filtrieren

α-Amino adipat-Platten: 20 g/l Glucose, 3.4 g/l YNB –AA/-AS = (engl.) Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat, 20 g/l Agar in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, autoklavieren. 50 °C warme Lösung mit 30x/6%-α-Amino adipat-Lösung mischen und 1000x Lysin, 100x Adenin und 100x Histidin zufügen, ohne Schütteln mischen und Platten gießen. Aufbewahrung bei 4°C. Innerhalb von 2 Wochen verwenden.

Antikörper-Blockierungslösung: 2% Rinderserumalbumin, 2% Schafserum, 7% Glycerin, 0.2% Tween-20 in PBS

2x BBS (BES buffered saline): 50mM BES (N,N-bis-[2-Hydroxyethyl]-2-Aminomethan-Sulfonsäure), 280mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, sterilfiltrieren.

BSA-Gelatine (mit/ohne Sucrose): Für ca. 500 ml: 450 ml PBS mit 2,2g Gelatine versetzen, bei 60 °C rühren bis gelöst, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, 70g Rinderserumalbumin einrühren bis gelöst, sofern gewünscht 90g Sucrose einrühren bis gelöst, aliquotieren und bei –20 °C aufbewahren.

50x Dropout –KWU: (Aminosäuren- und Nucleinbasenmischung ohne Lysin, Tryptophan und Uracil) 4 g/l Adeninhemisulfat, 2 g/l L-Arginin-HCl, 10 g/l L-Asparginsäure, 10 g/l L-Glutaminsäure, 2 g/l L-Histidin-HCl, 6 g/l L-Leucin, 2 g/l L-Methionin, 5 g/l L-Phenylalanin, 37.5 g/l L-Serin, 20 g/l L-Threonin, 3 g/l L-Tyrosin, 15 g/l L-Valin in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, sterilfiltrieren.

0.5M EDTA: 186.1 g/l EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)  $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. lösen, pH 8.0 mit NaOH einstellen, autoklavieren.

Ethidiumbromidlösung: 0.5 mg/l in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

Färbelösung (ISH): 4.5  $\mu\text{l/ml}$  NBT-Stammlösung (75 mg/ml in 70% DMF), 3.5  $\mu\text{l/ml}$  BCIP-Stammlösung (50 mg/ml in DMF) in NTMT

Färbelösung (X-Gal): 5 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (aus 0.1 M Stammlösung), 5 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (aus 0.1 M Stammlösung), 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (aus 1 M Stammlösung), 0.02% Nonidet-P40 (aus 10% Stammlösung), 0.01% Natrium-Deoxycholat (aus 10% Stammlösung), 0.1% X-Gal (aus Stammlösung: 2% in DMF) in PBS.

100x Histidin: 2 g/l Histidin in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. lösen, sterilfiltrieren; bei 4°C aufbewahren

Hybridisierungspuffer (In-situ-Hybridisierungen): 1x Salzlösung (für ISH), 50% Formamid (ultra-rein, Sigma), 10% Dextransulfat, 1 mg/ml Hefe-RNA, 1x Denhardtsche Lösung (Sigma), 2% Boehringer-Blockierungsreagenz (Roche) in  $\text{H}_2\text{O}$  dest. (DEPC-behandelt). Bei 50 °C inkubieren, bis das Blockierungsreagenz gelöst ist.

LiDS: 1% Lithium-Dodecylsulfat, 100 mM EDTA, pH 8.0

10x Lithiumacetat-Lösung: 1 M Lithiumacetat in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. lösen, pH 7.5 mit Essigsäure, autoklavieren.

1000x L-Lysin-Lösung: 30 g/l L-Lysin in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. lösen; sterilfiltrieren; bei 4°C aufbewahren

LB (Luria-Bertani-Medium): 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton oder Pepton, 5 g/l Hefeextrakt in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest., für Platten 20 g/l Agar hinzufügen, autoklavieren. Vor Zugabe von Antibiotika auf höchstens 50 °C abkühlen lassen.

Lösung A: 0.2x oder 1x SSC, 50% Formamid (reinst), 0.1% Triton-X100 oder Tween-20 in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

M2, M16: Fertiglösungen von Sigma

MUG-Stammlösung: 3 mM Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosid (MUG) in Z-Puffer. Gelöst durch Aufkochen. Lagerung bei -20 °C. Vor Verwendung auf 80 °C erhitzt.

Neurobasalmedium: 5% fetales Kälberserum (Roche), 1x B27-Mediumsupplement (Sigma), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin in Neurobasal medium (Life Technologies).

NTMT: 100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 9.5, 50mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% Triton-X100 oder Tween-20 in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

4% Paraformaldehyd: PBS auf 60 °C erhitzen, Paraformaldehyd unter Rühren zufügen, mit einigen Tropfen 1M NaOH klären; pH soll etwa 7.0 sein. Aliquotieren, bei -20 °C aufbewahren.

PBS [(engl.) Phosphate Buffered Saline]: 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. lösen, autoklavieren.

PBT: PBS + 0.1 % Triton-X-100

50% Polyethylenglykol: PEG 3350 mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. ansetzen. Falls erforderlich auf 50 °C erwärmen. pH 7.5 einstellen, steril filtrieren. Aliquotieren, bei -20 °C aufbewahren.

Prähybridisierungspuffer (In-situ-Hybridisierungen): 1x Salzlösung (für ISH), 50% Formamid (ultra-rein, Sigma), 2% Boehringer-Blockierungsreagenz (Roche) in  $\text{H}_2\text{O}$  dest. (DEPC-behandelt). Bei 50 °C inkubieren, bis das Blockierungsreagenz gelöst ist.

10x Salzlösung (für ISH): 114g NaCl, 14.04g Tris-HCl, 1.34g Tris-Base, 7.8g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 7.1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100ml 0.5M EDTA, ad 1000ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest., pH 7.5, autoklavieren.

SC [(engl.) Synthetic Complete Medium]: 1,7 g/l YNB -AA/AS = (engl.) Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat, 5 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Glucose in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. lösen und autoklavieren (für Platten 20 g/l Agar zugeben). Nach dem Abkühlen auf 50°C 50x Dropout-Lösung und evtl. weitere Aminosäuren oder Basen zugeben.

SE: 1 M Sorbitol, 20 mM EDTA, pH 8.0

SOC-Medium: 20 g/l Trypton oder Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl in H<sub>2</sub>O bidest. durch Röhren lösen, 0,25% 1M KCl-Lösung zufügen, pH 7 mit 1M NaOH einstellen, Volumen auf 95% auffüllen, autoklavieren. 2% sterilfiltrierte 1M Glucose in H<sub>2</sub>O zugeben, auf 100% auffüllen.

Sonifizierungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM NaCl

20x SSC [(engl.) Standard Sodium Citrate]: M NaCl, 0,3M Natriumcitrat in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 7 einstellen, autoklavieren.

50x TAE [Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer]: 242 g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan], 5,7 % Eisessig, 10 % 0,5M EDTA in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 8, autoklavieren.

10x TBE [Tris-Borat-EDTA Puffer]: 108 g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan], 55 g/l Borsäure, 4% 0,5M EDTA in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, autoklavieren.

10x TBS [(engl.) Tris Buffered Saline]: 60.5 g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan], 87.7 g/l NaCl in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 7.4 mit HCl conc., autoklavieren.

10x TBST [(engl.) Tris Buffered Saline + Triton]: 81,8 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 25% 1M Tris pH 7.5 in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, autoklavieren, nach dem Abkühlen 1% Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat) oder Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) zugeben.

1M Tris: 60.5 g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan] in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, gewünschten pH mit HCl conc. einstellen, autoklavieren.

TE [Tris-EDTA-Puffer]: 1,6 g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan], 0,1% 1M EDTA in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 7.4 einstellen, autoklavieren.

TENPA-Puffer: 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 70 µM Spermidin, 30 µM Spermin.

YPD [(engl.) Yeast Extract, Peptone, Dextrose = Hefeextrakt, Pepton, Dextrose]: 1% Hefeextrakt, 2% Trypton oder Pepton, 2% Glucose in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, autoklavieren.

Z-Puffer: 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7

## 2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonucleotide wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung
bttaua.up1	AACCA CCATG GCTGA GCCCC GCCAG G
bttaua.lo1	CGTGT CGCCA ATGCC TGCTT CTTCA
EGFP.lo1	GGACA AACCA CAACT AGAAT
EGFP.up1	ATCCA CCGGT CGCCA CCAT
EGFP1911.up1	CCATG GCTAG CAAGG GCGAG GAGCT GTT
EGFP1924.up1	AGCAA GGGCG GCTAG CTGTT CA
EGFP1957.up1	CCTGG GCTAG CTGGA CGGCG ACGTA AA
EGFP2118.lo1	TAGCG GCGCT AGCAC TGCAC GCCGT A
EGFP2181.lo1	CTGGA GCTAG CCTTC GGGCA T
EGFP_V163A.lo1	GTTGT GGC GG ATCTT GAAGT TCGCC TTGAT
EGFP_V163A.lo2	GTTGT GGC GG ATCTT GAAGT TCGCC TTGAT GCCGT T
EGFP_V163A.lo3	GCCTT GATGC CGTTC TTCTG CTT
EGFP_V163A.up1	GGCAT CAAGG CGAAC TTCAA G
EGFP_S175G.lo1	CACGC CGCCG TCCTC GATGT T
EGFP_S175G.up1	ATCCG CCACA ACATC GAGGA CGGCG GCGTG
EGFP-NLS.lo1	ACTGA TGTAC AGTAC CTTTC TCTTC TTTT TGGAT CAAGC T
EGFP-NLS.up1	TCGAT TGTAC AAGGA TCCAA AAAAG AAGAG AAAGG TAGAT CCAA AAAGA AGAGA AAGCT TGATC CA
EGFPgenL1	CCTCG GCGCG GGTCT TG
EGFPgenL2	GGGTC TTGTA GTTGC CGTCG TC

EGFPgenU1	ACTGT TCCTT TCCAT GGGTC TTTT
EGFPgenU2	CTAGT AACGG CCGCC AGTGT GCT
IRES.lo1	CGAAG GGATC CATGG TTGTG GCCAT ATTAT CATCG TGTTT T
IRES.lo2	TTGTG GCCAT ATTAT CATCG TGTTT T
IRES.up2	CTAGG GCGGC CGCTT CCGCC CCTCT CCC
IRES1340.lo1	AGCGG CTTCG GCCAG TAACG TTA
lac1694.up1	GCGTG ACTAC CTACG GGTAA CAGTT
lac2136.lo1	ACAGC GGATG GTTCG GATAA T
lacZ_NcoI.up1	CACTT CCCAT GGGCG AAAAA TACAT
lacZ_BsrGI.lo1	ATTTT GTACA CCAGA CCAAC TGGTAA
loxP.lo	TCGAC ATAAC TTCGT ATAGC ATACA TTATA CGAAG TTATC TCGAG ATAAC TTCGT ATAGC ATACA TTATA CGAAG TTATG
loxP.up	TCGAC ATAAC TTCGT ATAAT GTATG CTATA CGAAG TTATC TCGAG ATAAC TTCGT ATAAT GTATG CTATA CGAAG TTATG
Lys2448.lo1	TCTCC CAGCG GGTCT TCAAA TAC
Lys5493.up1	GTTAC CGGTG TCACA GGATT TC
Lys5865.lo1	CGACG GCGGC TAAGC TCATA ACA
Lys7030.up1	CTTCA CAGGT CGATA CTGAC CAAT
M13 forward	GTAAA ACGAC GGCCA G
M13 reverse	CAGGA AACAG CTATG AC
Pax29587.up1	AGGCG AAGCG CACTC ATACA ATA
Pax29886.lo1	TGCCT CACTC CACTC CCTAC AGAA
Pax31846.up1	AGGGA GCCTT GCACC AGAAA GT
Pax32227.lo1	AGAGG CAGGC TGTCA TACCA AGT
Pax6gen5U	CGCCC TCCGC CCCC A GACT
Pax6gen5L	CCCCA GCGAC CGCAG CCATT A
Pax6gen3U	AGGCA CGCAG GGCAG GAGT
Pax6gen3L	GCCAG CGAGA AGGAA GAAGT AAGC
Pax6h+m.up1	CTGTC CCAAC ACTGC AGAGA
Pax6h+m.lo1	CACTC CGCTG TGACC TGAGG
Pax6k30.lo1	TCATT GCGGC CGCTT CAGCT GAAGT CGCAT T
Pax6k30.up2	TTATT GAGCT CGGCG CGCCT GATTA TAGAT CAACT G
Pax6k32.lo2	ATTAA GTCGA CGGCG CGCCG TAGAT ACAGA CAGAA AA
Pax6k32.up1	ACCAT TGCTA CTCGA GAAGT GAGGA GTGGC T
SV40pASma_lo	AGGTC GACGG TATAC AGACA
SV40pASma_up	CGAGC TGTAC AAGTA ACCCG GGCCT AGA
Tet-U	CAACC CGTAA ACTCG CCCAG AAGC
Tet-L-T7	GCGTA ATACG ACTCA CTATA GGGCG ACTCG AGGAA TCCCC GTCCC CCAAC A
tTA.up1	CCCGA ATTCC CATGG CTAGA TTA
tTA.lo1	CCAAG CTTGC TCGAG CTGAT AC
tTA816.up1	GAGCT GCTTA ATGAG GTCCG AATC
tTA1203.lo1	ACCTA AAGTA AAATG CCCC A CAGC
pYAC6719.up1	TGCCT CGCGC GTTTC GGTGA T
pYAC7971.lo1	AGGTG CCTCA CTGAT TAAGC ATTG
pYAC775.up1	TCGGG CTCAT GAGCG CTTGT T
pYAC1990.lo1	GATGA GTAGC AGCAC GTTCC TTA

## 2.1.5 Plasmidvektoren, Cosmide, YACs

### 2.1.5.1 Ausgangsmaterial

Bezeichnung	Zweck; enthaltene Elemente; Größe; Genbank-Zugriffsnummer; Hersteller
A1280	Cosmid; Genbank: Z83307; enthält den kodierenden Bereich der menschlichen Pax6-genomischen Region und den 3'-Bereich. Überlappt mit Cosmid cFAT5 (siehe unten). Erhalten von Veronica van Heyningen, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, Großbritannien.
cFAT5	Cosmid; Genbank: Z95332; enthält den 5'-Bereich der menschlichen Pax6-genomischen Region (Locus 11p13) inklusive der CpG-Inseln und des Pax6-Gens. Überlappt mit Cosmid A1280. In dieser Arbeit wird für den Pax6-Locus eine fortlaufende Numerierung verwendet, die mit Position 1 von cFAT5 beginnt. Die Position 1 von A1280 liegt bei Position 20771 von cFAT5; diese Numerierung endet bei Position 43023. Erhalten von Veronica van Heyningen, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, Großbritannien.
pAF107	Klonierungsvektor; enthält das LYS2-Gen aus <i>S. cerevisiae</i> in einem pUC-Vektor; Ampicillinresistenz; 7622 bp; Genbank (LYS2): M36287, M14967, M14968. Erhalten von Andreas Schedl, Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin.
pBluescript SK+	Klonierungsvektor; Ampicillinresistenz, ColE1-Replikationsursprung, Polylinkerregion, lacZ- $\alpha$ -Komplementierungsfragment, f1-Phagenreplikationsursprung; 2961 bp; Genbank: X52328; Stratagene.
pCMV $\beta$	Expressionsvektor (Säugetierzellen) für $\beta$ -Galactosidase; CMV-Promotor – Intron aus später 19s mRNA von SV40 – $\beta$ -Galactosidase-Gen (Fusion aus <i>Drosophila melanogaster</i> Alkoholdehydrogenase und <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -Galactosidase – SV40-Polyadenylierungssignal, pUC-Replikationsursprung, Ampicillinresistenz; 7164 bp; Genbank: U02451; Clontech.
pCMV-lacZ	Expressionsvektor (Säugetierzellen) für $\beta$ -Galactosidase, die durch Einfügen einer internen Duplikation inaktiviert ist. Die genaue Sequenz dieses Plasmids ist nicht bekannt. Es entspricht etwa pCMV $\beta$ mit folgenden Veränderungen: <ul style="list-style-type: none"><li>- das <math>\beta</math>-Galactosidase-Gen wurde a) mit Cla I bzw. b) mit EcoR V geschnitten und die jeweils längeren Fragmente ligiert. Dadurch erhält man „lacZ“, das eine zirka 290 bp lange Duplikation der Sequenz zwischen der Cla I- und der EcoR V-Schnittstelle aufweist (Bonnerot und Nicolas 1993b). Zwischen den beiden duplizierten Bereichen sind beide verwendeten Schnittstellen – Cla I und Eco RV – mutiert,</li><li>- zwischen den CMV-Promotor und den Translationsstart von <math>\beta</math>-Galactosidase wurde der 5'-untranslatierte Bereich des WT1-Gens kloniert (Genbank Nr. X69950); in diesem Bereich liegen Schnittstellen für Pst I und Nar I.</li></ul> Erhalten von Colin Miles, Developmental Genetics (C3), MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh, Grossbritannien.
pCR2.1-TOPO	Klonierungsvektor für PCR-Produkte; Polylinker – lacZ- $\alpha$ -Komplementierungsfragment, f1-Phagenreplikationsursprung, Kanamycin-Resistenz, Ampicillin-Resistenz, ColE1-Replikationsursprung; 3908 bp; Invitrogen.
pIRES-EGFP	Bicistronischer Expressionsvektor (Säugetierzellen) zur Koexpression von einem beliebigen Gen und EGFP; CMV-Promotor – Polylinker – Synthetisches

	Intron (IVS) – IRES – EGFP – Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungssignal – ColE1-Replikationsursprung – Ampicillin-Resistenz; 5162 bp; Clontech.
pBS- <i>taulacZ</i>	Klonierungsvektor; <i>taulacZ</i> + SV40-Polyadenylierungssignal inseriert in die EcoR I-Schnittstelle von pBluescript KS+; <i>taulacZ</i> ist eine Fusion aus der kodierenden Sequenz für die ersten 383 Aminosäuren von Rinder- $\tau$ -Protein (entspricht Position ~50 – 1302 von <i>bttaua</i> ; Genbank: M26157) mit der kodierenden Sequenz für die E. coli- $\beta$ -Galactosidase ab der 5. Aminosäure; 8.5 kb; Erhalten von Stefan Thor, Salk Institute, San Diego, USA (Callahan und Thomas 1994).
pRc/CMV	Expressionsvektor (Säugetierzellen); CMV-Promotor – Polylinker – Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungssignal – f1-Replikationsursprung – SV40-Replikationsursprung – Neomycin-Resistenz – ColE1-Replikationsursprung – Ampicillin-Resistenz; 5542 bp; Invitrogen.
pTet-Off	Expressionsvektor (Säugetierzellen); CMV-Promotor – tTA – SV40-Polyadenylierungssignal – ColE1-Replikationsursprung – Ampicillin-Resistenz – Neomycin-Resistenz; 7391 bp; Genbank: U89929; Clontech; identisch mit pUHD15-1neo (Resnitzky et al. 1994).
ptetOi-MCS	tTA-kontrollierter Expressionsvektor; TRE mit CMV-Promotor – Intron A – CMV-Polyadenylierungssignal – Ampicillin-Resistenz. Erhalten von Martin Spiegel, Medizinische Klinik Tübingen (Abt. Prof. Gregor).
Y593	YAC; enthält die menschliche Pax6-genomische Region in der Mitte des YAC und etwa je 200 kb zu beiden Seiten davon; weitere Elemente: URA3 auf dem langen YAC-Arm, TRP1 auf dem kurzen YAC-Arm; Isoliert aus der menschlichen ICI-Bibliothek (Fantes et al. 1995; Schedl et al. 1996). Erhalten von Veronica van Heyningen, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, Großbritannien.

### 2.1.5.2 Eigene Subklonierungen

Alle per PCR erhaltenen Subklone wurden sequenziert (MWG Biotech, Ebersberg). Durch Restriktionsverdau und Ligation von Plasmid-DNA erhaltene Subklone wurden anhand des Bandenmusters im Restriktionsverdau identifiziert und in der Regel nicht sequenziert.

#### 2.1.5.2.1 EGFP-Varianten

Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP; (Cormack et al. 1996) unterscheidet sich von nativem GFP aus *Aequorea victoria* (wtGFP; (Shimomura und Johnson 1975) durch einen humanisierten Codongebrauch (Zolotukhin et al. 1996), der zu einer verbesserten Expression in Säugetierzellen führt, sowie durch die Mutationen F64L und S65T. Durch diese geht der Anregungsbereich im Ultravioletten (mit einem Maximum bei 390 nm) verloren, dafür wird jedoch die Anregbarkeit bei 488 nm, der Wellenlänge von Argon-Lasern, deutlich verbessert. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von EGFP als Maß für die Anregbarkeit eines Fluorochroms beträgt bei 488 nm  $55000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  im Vergleich zu  $9500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  bei wtGFP. Die Bildung des Chromophors ist bei 37 °C bei EGFP bereits wesentlich effizienter als bei wtGFP (Patterson et al. 1997). Allerdings ist die relative Fluoreszenz von EGFP bei 37 °C noch ca. 5fach geringer als die der Variante „Emerald“ (S65T, S72A, N149K, M153T, I167T) (Cubitt et al. 1999).

Die Mutationen V163A und S175G (mGFP5) verbessern die Faltung des Apoproteins und damit die Löslichkeit bei höheren Temperaturen (Siemering et al. 1996). Ausgehend von EGFP führen diese Mutationen (EGFPm) ebenfalls zu einer stark verbesserten Fluoreszenz bei 37 °C. Retroviral exprimiertes EGFPm gibt in Primärkulturen aus Rattencortex ein etwa 3.9fach höheres Fluoreszenzsignal als EGFP (Okada et al. 1999); EGFPm wird dort als mut4EGFP bezeichnet). In Mäuse-ES-Zelllinien



lässt sich eine eng verwandte Variante im Gegensatz zu vielen anderen GFP-Varianten gut visualisieren (Zernicka-Goetz et al. 1997); MmGFP; enthält die Mutationen F64L, S65T, V163A, I167T, S175G und die offenbar stillen Mutationen H25Y, G191D). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für diese Arbeit EGFPm konstruiert.

Durch die Anfügung eines dreifach wiederholten 3'-terminalen nukleären Lokalisierungssignal aus dem großen SV40-T-Antigen lassen sich Proteine effizient im Zellkern exprimieren (Fischer-Fantuzzi und Vesco 1988). Es wurde angenommen, dass durch die Lokalisierung im Kern eine maximale Konzentration des Fluoreszenzsignals zum Nachweis auch geringer Expressionsraten erreicht werden kann. Daher wurden, ausgehend von EGFP, die Varianten EGFPm (Okada et al. 1999) und nukleäres EGFPm (EGFPmn) hergestellt.

pEGFP': EGFP wurde über BamH I und Xho I aus pIRES-EGFP ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pBluescript SK+ kloniert.

pEGFPm: Per PCR-Mutagenese wurden – ausgehend von pIRES-EGFP – die Mutationen V163A (Base 2395: T → C) und S175G (2430: A → G) eingeführt. Das erhaltene PCR-Fragment (Basen 1888-2936 = 1040 bp) wurde durch Topo-Klonierung in pCR2.1 kloniert.

pCMV-EGFP: EGFP wurde aus pIRES-EGFP mit Hind III und BsrG I ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen pCMV-EGFP224 inseriert.

pCMV-EGFPm: pEGFPm wurde mit Hind III und BsrG I geschnitten (0.8 kb) und in das Hind III/BsrG I-Fragment (5 kb) von pCMV-EGFP270 einkloniert.

pCMV-EGFPmn: Expressionsvektor (Säugetierzellen) für nukleäres EGFP; CMV-Promotor – EGFP mit den Mutationen V163A und S175G und einem C-terminalen Kernlokalisierungssignal (aus dem großen T-Antigen von SV40) – SV40-Polyadenylierungssignal.

Die partiell komplementären Oligonukleotide EGFP\_NLS.up1 und EGFP\_NLS.lo1 wurden hybridisiert, mit Klenow-Enzym aufgefüllt und mit BsrG I geschnitten (= ds nls BsrG I). ds nls BsrG I wurde in den mit BsrG I aufgeschnittenen und dephosphorylierten Vektor pCMV-EGFPm inseriert.

pCMV-EGFPn: Aus pCMV-EGFPmn wurde das Kernlokalisierungssignal durch Verdau mit BsrG I herausgeschnitten und in den BsrG I-geschnittenen pCMV-EGFP inseriert (= pCMV-EGFPn).

### 2.1.5.2.2 Inaktivierte EGFP-Varianten

Um Zellklone zu markieren, sollten EGFP-Varianten hergestellt werden, die durch eine intragenische Duplikation inaktiviert sind. Dieser Ansatz war durch das Reportergen lacZ inspiriert, eine inaktivierte Variante des Gens lacZ, das für  $\beta$ -Galactosidase kodiert (Bonnerot und Nicolas 1993b). Bei lacZ beträgt die Länge der Duplikation 289 Basen. Da nicht aufgeklärt ist, wie die Rekombinationseffizienz derartiger Konstrukte von der Länge der Duplikation abhängt, wurden verschiedene lange Duplikationen in EGFP eingeführt und deren Rekombinationseffizienz in vitro bestimmt.

Für die Einführung von Duplikationen wurde eine Strategie gewählt, die das wiederholte Vorhandensein der Sequenzen GCT und AGC auf dem kodierenden Strang von EGFP ausnutzt. Kombiniert ergeben diese Sequenzen die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease Nhe I (GCTAGC). Es wurde wie folgt vorgegangen:

- In der Nähe des 5'-Endes von EGFP tritt die Sequenz AGC dreifach, an den Positionen 1911, 1924 und 1957 auf (Zählung nach pIRES-EGFP). Nach 3' gerichtete PCR-Primer wurden so gewählt, dass sie an diesen Positionen eine komplette Nhe I-Erkennungssequenz einführen. Als Primer für den Gegenstrang wurde ein Primer am 3'-Ende von EGFP verwendet. Mit diesen Primern wurden per PCR 3 verschieden lange Sequenzen generiert, die in der Nähe des 5'-Endes von EGFP mit einer Nhe I-Schnittstelle beginnen und sich bis an das Ende des Gens erstrecken.
- In der Mitte von EGFP tritt die Sequenz GCT zweifach, an den Positionen 2118 und 2181 auf. Nach 5' gerichtete PCR-Primer wurden so gewählt, dass an diesen Positionen ebenfalls eine Nhe I-Erkennungssequenz eingeführt wird. Als Primer für den Gegenstrang wurde ein Primer am 5'-Ende

von EGFP verwendet. Die per PCR erhaltenen Konstrukte erstreckten sich vom 5'-Ende des Gens bis zu einer künstlich eingeführten Nhe I-Schnittstelle in der Mitte des Gens.

- Die 3 verschiedenen langen 3'- und die 2 5'-Fragmente wurden mit Nhe I geschnitten und miteinander ligiert. So wurden insgesamt 6 verschiedenen lange EGFP-Duplikationen erhalten.

Halbseitige EGFP-Duplikationen: EGFP-Duplikationen wurden in zwei Anteilen durch PCR generiert (Matrize: pIRES-EGFP):

- 5'-Anteile mit dem oberen Primer EGFP.up1 und den unteren Primern EGFP2118.lo1 und EGFP2181.lo1; die Fragmentlängen betragen EGFP2118: 0.24 kb, EGFP2181: 0.30 kb,
- 3'-Anteile mit den oberen Primern EGFP1911.up1, EGFP1924.up1 und EGFP1957.up1 und dem unteren Primer EGFP.lo1, die Fragmentlängen betragen EGFP1911: 1.03 kb, EGFP1924: 1.02 kb, EGFP1957: 0.99 kb.

Die Amplifikate wurde durch Topo-Klonierung in pCR2.1 kloniert.

pEGFP161-270: EGFP-Duplikationen: Halbseitige EGFP-Duplikationen wurden mit Nhe I und Bgl I verdaut. Jeweils ein 5'- und ein 3'-Anteil wurden ligiert. Erhalten wurden 2 (5'-Anteile) × 3 (3'-Anteile) = 6 verschiedenen lange Duplikationen:

- |            |              |                      |
|------------|--------------|----------------------|
| - pEGFP161 | Duplikation: | 1957 – 2118 (161 bp) |
| - pEGFP194 |              | 1924 – 2118 (194 bp) |
| - pEGFP207 |              | 1911 – 2118 (207 bp) |
| - pEGFP224 |              | 1957 – 2181 (224 bp) |
| - pEGFP257 |              | 1924 – 2181 (257 bp) |
| - pEGFP270 |              | 1911 – 2181 (270 bp) |

pCMV-EGFP161-270: Expressionsvektoren mit EGFP-Duplikationen: EGFP-Duplikationen wurden mit Hind III und Not I aus pEGFP161-270 ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pRc/CMV inseriert (= pCMV-EGFP161 – 270).

pCMV-EGFP161-270-IRESmut-lacZ: Bicistronische Vektoren mit EGFP-Duplikationen und lacZ: Aus pEGFP161-270 wurde mit den Primern M13 forward und M13 reverse per PCR DNA-Fragmente hergestellt, die keine dam-Methylierung aufweist. Diese wurden mit BamH I und Bcl I (dam-empfindlich) geschnitten und in den mit BamH I geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pIRESmutlacZ inseriert (pCMV-EGFP161-270-IRESmut-lacZ, abgekürzt: pEGFP161-270-Iβ).

pEGFP270mn: Aus pCMV-EGFPmn wurde mit den Primern EGFP1911.up1 und EGFP.lo1 ein Fragment amplifiziert, das am 5'-Ende eine Nhe I-Schnittstelle zur Ligation in Duplikationskonstrukte enthält sowie die Mutationen V163A und S175G aufweist. Das PCR-Fragment wurde aufgereinigt, mit Nhe I und Xho I verdaut und in das entsprechend geschnittene pEGFP270 inseriert (= pEGFP270mn).

pCMV-EGFP270mn: Aus ptetOieGFP270mn wurde mit Nhe I und Xho I das EGFP270mn-Fragment ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pCMVEGFP270 (nach Entfernen von EGFP270) ligiert (= pCMV-EGFP270mn).

### 2.1.5.2.3 lacZ-Varianten

p[Nco]tau, p[Nco]taulacZ: Ausgehend von pBS-taulacZ wurde mit den Primern bttaua.up1 und bttaua.lo1 ein etwa 300 bp langes Amplifikat hergestellt, das am Translationsstart von tau eine Nco I-Schnittstelle enthält. Das Fragment wurde mittels Topo-Klonierung in pCR2.1 inseriert (= p[Nco]tau). Aus pBS-taulacZ wurde mit Not I ein Fragment herausgeschnitten, das taulacZ + SV40-Polyadenylierungssignal umfasst, und in das mit Not I geschnittene und dephosphorylierte p[Nco]tau-inseriert (= p[Nco]taulacZ). Von taulacZ in pBS-taulacZ unterscheidet sich taulacZ in p[Nco]taulacZ dadurch, dass am Translationsstart eine Nco I-Schnittstelle enthalten ist.

ptaulaacZ, pCMV-taulaacZ, pCMV-tau-lacZ: pCMV-laacZ wurde mit Cla I und Nde I geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von p[Nco]taulacZ inseriert (= ptaulaacZ). Von p[Nco]tau-lacZ

unterscheidet sich dieses Konstrukt dadurch, dass ein ~290 bp-langes Fragment zwischen Cla I (1781; Numerierung nach pCMV $\beta$ ) und EcoR V (2070) dupliziert ist. ptaulaacZ wurde mit Hind III und Xba I geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pCMV-EGFP161 inseriert (= pCMV-taulaacZ). Dadurch wird EGFP161 durch taulaacZ ersetzt. RtaulacZ wurde mit Nco I geschnitten, mit Klenow-Enzym aufgefüllt, mit Xba I geschnitten und in Hind III (aufgefüllt)/Xba I von pCMV-EGFPm inseriert (= pCMV-taulacZ).

#### 2.1.5.2.4 Rekombinationskonstrukte für YACs

Pax6-Sequenzen: pk30, pk32, pk30', pk3032': Ausgehend vom Cosmid FAT5 wurden folgende Fragmente aus der menschlichen Pax6-Region per PCR amplifiziert:

- k30 (29792-30296 = 505 bp) mit den Primern Pax6k30.up2 und Pax6k30.lo1. k30 endet im Exon 8. Der 5'-Linker enthält Schnittstellen für Sac I und Asc I, der 3'-Linker enthält eine Schnittstelle für Not I,
- k32 (31587-32095 = 508 bp) mit den Primern Pax6k32.up1 und Pax6k32.lo2. Der 5'-Linker enthält eine Schnittstelle für Xho I und der 3'-Linker Schnittstellen für Asc I und Sal I.

Die Amplifikate wurden durch Topo-Klonierung in pCR2.1 inseriert (= pk30, pk32).

Das Insert aus pk30 wurde über Sac I und Not I in pBluescript SK+ kloniert (= pk30').

Das Insert aus pk32 wurde mit Sal I und Xho I ausgeschnitten und in die Xho I-Schnittstelle von pk30' inseriert (=pk3032'). Die 3' von k32 gelegene Sal I-Schnittstelle wird dadurch zerstört.

Modifizierte IRES: pIRESmut, pIRESmut', pI'EGFP, pIRESmutEGFP, pIRESmut-lacZ: Aus pIRES-EGFP wurde die IRES (1278-1883 = 606 bp) mit den Primern IRES.up2 und IRES.lo1 amplifiziert. Dadurch werden am 5'-Ende eine Not I- und am 3'-Ende Nco I- und BamH I-Schnittstellen eingefügt sowie am 3'-Ende die Hind III- und die Sma I-Schnittstelle entfernt. Weiter wird ATG-11 an Position 1872-1874 rekonstituiert; dadurch soll die Initiationshäufigkeit der IRES verbessert werden. Das erhaltene Fragment wurde mittels Topo-Klonierung in pCR2.1 inseriert (= pIRESmut).

Aus pIRESmut wurde die mutierte IRES mittels Not I und BamH I herausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pBluescript SK+ inseriert (= pIRESmut').

EGFP wurde aus pIRES-EGFP mit Nco I und Not I herausgeschnitten und hinter die IRES von pIRESmut in die entsprechenden Schnittstellen inseriert (= pI'EGFP).

pI'EGFP wurde mit Not I geschnitten, mit Klenow-Enzym aufgefüllt, dann mit Xho I geschnitten und inseriert in pIRES-EGFP, das mit Nsi I geschnitten, mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dann mit Xho I geschnitten worden war (=pIRESmutEGFP). Der erhaltene Vektor unterscheidet sich von pIRES-EGFP in folgenden Punkten:

- in der IRES ist ATG-11 rekonstituiert,
- folgende Schnittstellen sind zerstört: Nsi I (1278), Hind III (1870), Sma I (1885), BamH I (1887), Age I (1893),
- die Basen 1884-1904 sind deletiert.

Per PCR mit den Primer lacZ\_NcoI.up1 und lacZ\_BsrGI.lo1 wurde eine 5'-Nco I- und eine 3'-BsrG I-Schnittstelle an die Sequenz von lacZ (aus pCMV $\beta$ ) angefügt [Nco I: Base 83 A $\rightarrow$ C, 88: A $\rightarrow$ G; BsrG I: 3334 C $\rightarrow$ A, 3335 A $\rightarrow$ C]. Dieses Fragment wurde mit Nco I und BsrG I geschnitten und in den entsprechend verdauten Vektor pIRESmutEGFP (EGFP-Fragment entfernt) ligiert (= pIRESmut-lacZ). Da Nco I auch intern in der Vektorsequenz schneidet, erfolgte die Ligation in zwei Teilschritten.

ptTA: Ausgehend von pTet-Off wurde mit den Primern tTA.up1 und tTA.lo1 ein modifiziertes tTA-Fragment amplifiziert, das 5' eine Nco I- und 3' eine Xho I-Schnittstelle aufweist. Es wurde mittels Topo-Klonierung in pCR2.1 inseriert (= ptTA).

p30I'EGFP32, p30I'taulaacZ32, p30I'tTA32, p30I'taulacZ32: Aus pI'EGFP wurde mit Not I und Xho I das IRESmut-EGFP-Fragment herausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pk3032' inseriert (= p30I'EGFP32).

Aus p30I'EGFP32 wurde EGFP durch Verdau mit Nco I und Xho I entfernt und ersetzt durch die entsprechenden Fragmente aus taulaacZ (= 30I'taulaacZ32) und ptTA (= 30I'tTA32).

Aus p30I'taulaacZ32 wurde lacZ durch Verdau mit Cla I und Xba I entfernt und durch ein entsprechendes Fragment aus pBS-taulacZ ersetzt (= 30I'taulacZ32).

loxP-flankiertes LYS2: dsloxP, puc12-loxP, plox-Lys: Je 500 pmol (12,5 µg) der komplementären Oligonucleotide loxP.up und loxP.lo wurden in 50µl TE gelöst und im Thermocycler mit folgendem Programm hybridisiert: 5 Min. 85 °C, Temperaturrampe 85 °C → 75 °C (0.1 °C/s), 5 Min. 75 °C, Temperaturrampe 75 °C → 65 °C (0.1 °C/s), 5 Min. 65 °C. Der Ansatz wurde Ethanol-präzipitiert und phosphoryliert (= dsloxP). dsloxP enthält zwei gleichgerichtete loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase, zwischen denen eine Xho I-Schnittstelle liegt. Die 5'-TCGA-Überhänge an beiden Seiten von dsloxP lassen sich in Sal I-Schnittstellen inserieren; dabei wird die Schnittstelle wiederhergestellt.

pAF107 wurde mit Sal I geschnitten, das Vektor-Rückgrat (puc) dephosphoryliert und dsloxP dort inseriert (= puc12-loxP).

puc12-loxP wurde mit Xho I geschnitten und das LYS2-Fragment aus dem Sal I-geschnittenen pAF107 inseriert (= plox-Lys). Dadurch werden die verwendeten Schnittstellen zerstört.

Rekombinationskonstrukte: RtaulaacZ, RtaulacZ, RtTA: Das beidseitig von loxP-flankierte LYS2-Gen wurde mit Sal I aus plox-Lys ausgeschnitten und in die mit Xho I geschnittenen Vektoren p30I'taulaacZ32, p30I'tau-lacZ32 und p30I'tTA32 inseriert (= RtaulaacZ, RtaulacZ, RtTA).

#### **2.1.5.2.5 Transreporterkonstrukte**

ptetOiEGFPmn, ptetOiEGFP270mn: ptetOiMCS wurde mit BamH I und Sal I geschnitten; hier hinein wurde EGFPn & Polyadenylierungssignal aus pCMV-EGFPmn (BamH I/Xho I) inseriert (in zwei Schritten, da das Insert eine interne BamH I-Schnittstelle enthält; = ptetOiEGFPmn).

Das Insert pEGFP270mn wurde mit BamH I verdaut und in den BamH I-verdauten Vektor ptetOiEGFPmn inseriert (=ptetOiEGFP270mn).

ptetOiEGFPm, ptetOiEGFP270m: Um das Kernlokalisierungssignal zu eliminieren, wurden ptetOiEGFPmn und ptetOiEGFP270mn mit BsrG I verdaut und religiert (= ptetOiEGFPm, ptetOiEGFP270m).

#### **2.1.5.2.6 YACs**

Y593-taulacZ, Y593-taulaacZ, Y593-tTA: Die Hefelinie AB1380 Y593 (Genotyp: lys2) wurde mit linearisiertem RtaulacZ, RtaulaacZ beziehungsweise RtTA transformiert und für LYS2, das auf diesen Plasmiden kodiert ist, selektiert (SC -Ura -Trp). Kolonien wurden durch PCR auf Transformationsereignisse überprüft (Primer Pax29587.up1 und IRES.lo1 für homologe Rekombinanten, Pax29587.up1 und Pax29886.lo1 sowie IRES.up2 und IRES.lo1 als Kontrolle). Durch Southern-Analyse wurden die PCR-positiven Kolonien auf homologe Rekombination untersucht: Von je einem positiven Klon wurde genomische DNA präpariert (in Lösung), mit EcoR I oder BsaB I verdaut, auf einem 0.85%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Digoxigenin-markierter FAT5-Cosmid-DNA hybridisiert (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I, Roche) und das Signal nachgewiesen. Durch das erhaltene Fragmentmuster wurde eine homologe Rekombination des transformierten Plasmids mit dem Pax6-Locus auf dem YAC bestätigt (Abb. 16 A).

Y593-CtaulacZ: Durch Expression von Cre-Rekombinase wurde das von loxP-Sequenzen flankierte LYS2-Gen entfernt. Dazu wurde die Hefelinie AB1380 Y593-taulacZ mit PGK-Cre transformiert und

auf  $\alpha$ -Aminoadipatplatten kultiviert. Die erhaltenen zirka 250 Kulturen wurden per Replikaplattierung auf SC –Lys –Ura und SC –Ura –Trp transferiert. Ein Klon wuchs nur in Anwesenheit von Lysin. Dieser wurde wie oben beschrieben mit EcoR I oder BsaB I verdaut und durch Southern-Analyse die Deletion des LYS2-Gens bestätigt.

## 2.1.6 Antikörper

### Primärantikörper:

Polyklonales anti- $\beta$ -Galactosidase-Antiserum aus Kaninchen, Molecular Probes. Verdünnung 1:5000.

Polyklonales anti-Pax6-Antiserum aus Kaninchen, Covance. Verdünnung 1:300.

Monoklonaler anti-Pax6-Antikörper AD1.5, D. Engelkamp (Engelkamp et al. 1999). Verdünnung 1:50.

### Sekundärantikörper (alle polyklonal, Verdünnung 1:200):

Anti-Maus-IgG aus Esel, gekoppelt an Fluoresceindiisothiocyanat, Jackson Immunolabs.

Anti-Maus-IgG aus Ziege, gekoppelt an Alexa 488, Molecular Probes.

Anti-Maus-IgG aus Ziege, gekoppelt an Alexa 594, Molecular Probes.

Anti-Kaninchen, gekoppelt an Alexa 594, Molecular Probes.

## 2.1.7 Versuchstiere, Zelllinien, Hefe- und Bakterienstämme

Mäuse: CD-1, CD-1 Pax6<sup>Sey/+</sup>: Zucht im MPI für Hirnforschung, Frankfurt/Main. Leihmütter (C57Bl/6J  $\times$  Balb/c F1), vasektomierte NMRI-Männchen, Oocytendonoren (FVB/N und C57Bl/6J  $\times$  CBA F1: alle von Charles River, Weiterzucht im Max-Delbrück-Zentrum, Berlin

Säuger-Zelllinien: HEK-293 (aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die mit Adenovirus 5 DNA transformiert wurden; (Graham et al. 1977)), COS-7 [aus der Nieren-Fibroblasten-Zelllinie CV-1 (aus afrikanischen grünen Meerkatzen *Cercopithecus aethiops*) durch Transformation mit einer replikationsdefizienten SV40-Variante; enthält das T-Antigen; (Gluzman 1981)], beide erhalten von S. Kröger, Universität Mainz. PC12 (aus Ratten-Nebennieren-Phoehromocytomzellen; (Greene und Tischler 1976)), in Kultur bei D. Roth, MPI für Hirnforschung, Frankfurt/Main.

Saccharomyces cerevisiae, Stamm AB1380 Y593, Genotyp: MAT $\alpha$  Y593(URA3 TRP1) ade2-1 can1-100 his5 lys2-1 trp1 ura3-52; erhalten von V. van Heyningen, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, Großbritannien.

Escherichia coli DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup> deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44-1 thi-1 gyrA96 relA1

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Standardmethoden

Standardmethoden zur Vermehrung, Aufreinigung, Analyse und Modifikation von Plasmid- und genomischer DNA wurden gemäß den etablierten Vorschriften durchgeführt (Sambrook et al. 1989; Ausubel et al. 1995). Darunter fallen:

- Nährmedien zur Kultur von *E. coli*
- Transformation von elektrokompetenten *E. coli* durch Elektroporation (Chuang et al. 1995)
- Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini- und Maxipräpkits, Qiagen)
- Aufreinigung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (Mäuse) oder Hefekulturen
- Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösung
- Elektrophoretische Auftrennung von DNA (Agarose-Minigele, DNA-Acrylamidgele)
- Aufreinigung von DNA aus Gelen und Lösungen
- Restriktionsverdau von DNA

- Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA
- Ligationen von DNA-Fragmenten
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- Topo-Klonierung von PCR-Fragmenten (TOPO-Kit, Invitrogen)
- Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe
- Nichtradioaktive Southern-Analyse: Membrantransfer und Hybridisierung (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I, Roche)

## 2.2.2 YACs/*Saccharomyces cerevisiae*

### 2.2.2.1 Kultur von Hefestämmen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe, Bierhefe) verwendet, um YAC-DNA zu vermehren und zu modifizieren. YACs sind künstliche Hefechromosomen (engl. Yeast Artificial Chromosome = YAC), die alle für die selbständige Replikation in der Hefe notwendigen Sequenzen beinhalten. Sie werden als Vehikel für große DNA-Fragmente verwendet. Der Ausgangs-YAC enthielt ein etwa 420 kb großes Fragment aus dem Humangenom mit dem Pax6-Locus etwa in der Mitte. Durch homologe Rekombination mit Plasmid-DNA wurde ein Teil der Pax6-Region gegen Markergene ersetzt.

*S. cerevisiae* wächst optimal bei 30 °C, entweder in flüssigen Nährmedien unter ständigem Schütteln oder auf Agar-gelierten Nährmedienplatten. Für die Selektion bestimmter Linien werden Gene verwendet, die für den anabolischen Aminosäure- oder Nucleinsäurestoffwechsel erforderlich sind. Dem verwendeten Stamm AB1380 fehlen unter anderem die Gene LYS2, TRP1 und URA3. Wenn ein derartiges Gen fehlt, wird die Hefelinie für die betroffene Aminosäure oder Pyrimidinbase „auxotroph“, das heißt, sie kann sie nicht mehr selbst synthetisieren und benötigt sie als Zusatz im Nährmedium. Zwei dieser Gene, URA3 und TRP1, wurden auf dem YAC kodiert, so dass durch Uracil- und Tryptophan-freies Medium ein ständiger Selektionsdruck für die Erhaltung des YACs erzeugt werden konnte. Tryptophan wurde jedoch in der Regel den Nährmedien beigegeben, da der YAC bereits durch Fehlen von Uracil stabil vererbt wird und Hefe ohne Tryptophan deutlich langsamer wächst. Lysin musste dem Nährmedium zugesetzt werden.

Bei der Mutagenese mit Plasmid-DNA enthält diese – neben der „Nutzlast“, also den angestrebten Veränderungen – auch die Sequenz für ein Gen, das eine Auxotrophie aufhebt. Dadurch wird die Hefelinie für den entsprechenden Nährstoff „prototroph“. Passend zum Genotyp des Hefestamms wurde das LYS2-Gen verwendet. Wenn die transformierte Hefe dann auf Platten ausgestrichen wird, in denen kein Lysin zur Verfügung steht, können nur die Hefen hochwachsen, die das LYS2-Gen aufgenommen haben und dadurch Lysin-prototroph sind. Kontaminationen mit Wildtyp-Hefe, bei denen alle anabolischen Stoffwechselwege intakt sind, sind bei dieser „positiven Selektion“ relativ leicht möglich. Gegen das LYS2-Gen ist auch eine negative Selektion mit  $\alpha$ -Aminoadipat als einziger Stickstoffquelle im Nährmedium: nur die Hefen, bei denen LYS2 fehlt oder defekt ist, wachsen schnell und bilden große Kolonien. Diese Selektion wurde eingesetzt, um das LYS2-Gen nach erfolgreicher Rekombination wieder aus dem Pax6-Locus zu entfernen.

### 2.2.2.2 Transformation und homologe Rekombination

Hefezellen besitzen sehr effiziente Reparaturmechanismen für chromosomale DNA. Diese Mechanismen können ausgenutzt werden, um Mutationen in genomische Loci oder YACs einzuführen. Dazu wird die Hefe mit linearisierter DNA transformiert, das heißt die DNA in die Hefe eingebracht. Durch die freien Enden der DNA begünstigt, kommt es häufig zum Austausch der genomischen DNA gegen die homologe Plasmid-DNA (Rothstein 1983). Wie oben beschrieben, kann dann gegen eine Au-

xotrophie selektiert werden, die der Ausgangsstamm aufweist, die rekombinierte Hefe jedoch nicht mehr.

Die so erhaltenen Kolonien wachsen, weil sie das Selektionsgen aufgenommen und integriert haben. Um zu überprüfen, ob die Integration zufällig oder am homologen genomischen Locus erfolgt ist, werden sie per PCR gescreent. Dabei wird ein Primer im Genom, der komplementäre Primer auf dem Plasmid gewählt. Nur wenn diese beiden Primer durch homologe Rekombination in unmittelbare Nachbarschaft geraten sind, wird ein DNA-Fragment einer bestimmten Größe amplifiziert.

Die Transformation von Hefezellen mit Lithiumacetat beruht auf dem Prinzip, dass Alkalikationen Hefe die Kompetenz verleihen, DNA aufzunehmen (Ito et al. 1983). Hier wurde Hefe mit Plasmid-DNA nach einer modifizierten Methode transformiert.

Die zu transformierende Hefelinie wurde in einem 10 ml-Ansatz in selektivem Medium (SC –Ura – Trp –Lys) kultiviert, bis die stationäre Phase erreicht wurde. 50 ml selektives Medium wurden aus der stationären Kultur auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$ /ml angeimpft und bis zu einer Zelldichte von  $2 \times 10^7$ /ml kultiviert (2 Zellteilungen; 3 – 5 Stunden). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur bei 3000 g für 3 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 25 ml H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert und erneut pelletiert. Das Pellet wurde dann in 1 ml frischem  $1 \times$  Lithiumacetat (LiAc; 100 mM) resuspendiert, erneut pelletiert und in 400 µl  $1 \times$  LiAc resuspendiert. Man erhielt etwa 500 µl kompetente Hefezellsuspension.

Herings-Sperma-DNA (Typ III aus Lachshoden, Sigma) als Träger-DNA wurde bei 2 mg/ml in TE gelöst, bei –20 °C aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch 5 Minuten aufgeköcht, um sie zu denaturieren.

50 µl kompetente Hefezellen ( $2 \times 10^7$  Zellen) wurden in einem 1.5 ml-Reaktionsgefäß pelletiert und der Überstand verworfen. Auf diesem Pellet wurde die Transformation (in dieser Reihenfolge) angesetzt:

1. 240 µl PEG (50% in H<sub>2</sub>O, Molekulargewicht 3350 Da, Sigma)
2. 36 µl  $10 \times$  Lithiumacetat-Lösung (1 M)
3. 50 µl Herings-Sperma-DNA-Lösung
4. 2 – 4 µg Plasmid-DNA in einem Volumen X
5. 34 – X µl steriles H<sub>2</sub>O bidest.

Der Ansatz wurde auf einem Rotationsmischer auf höchster Stufe für eine Minute gemischt und danach 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein sogenannter „Hitzeschock“ durch Inkubation bei 42 °C für 30 Minuten. Die Hefezellen wurden durch Anzentrifugieren (15 Sekunden bei 6000 U/min) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Hefe-Suspension wurde auf geeigneten selektiven Platten ausplattiert und kultiviert, bis Kolonien sichtbar wurden (3 – 4 Tage).

Die erhaltenen Kolonien wurden dann per PCR auf homologe Rekombination gescreent.

### 2.2.2.3 Auftrennung von YAC-DNA durch Wechselfeldelektrophorese

YAC-DNA kann aufgrund ihrer Größe durch Elektrophorese in einem homogenen Feld nicht aufgetrennt werden, da ab einer gewissen Größe alle linearen DNA-Moleküle gleich schnell wandern. Durch Veränderung des elektrischen Feldes über die Zeit erreicht man jedoch auch bei sehr großen DNA-Fragmenten eine gute Auftrennung (Schwartz und Cantor 1984). Hier wurde eine modifizierte Methode verwendet, die Kontur-geklemmte homogene Feldelektrophorese, bei der alternierend zueinander um 120° gedrehte homogene elektrische Felder anliegen. Der Bereich optimaler Auftrennung wird durch die Konzentration der Agarose und die Schaltzeiten (Chu et al. 1986; Vollrath und Davis 1987).

Um Strangbrüche der genomischen DNA durch Scherkräfte zu vermeiden, wird sie in Agaroseblöcken verarbeitet (Schwartz und Cantor 1984). Diese wurden wie folgt hergestellt:

1. 500 ml Suspensionskultur des betreffenden Hefestamms wurde in der logarithmischen Wachstumsphase bei 2000g für 5 Minuten abzentrifugiert.
2. Die Hefezellen wurde 3fach in SE gewaschen, dazwischen jeweils wieder abzentrifugiert.
3. 1%ige Seaplaque GTG LMP Agarose (FMC) in SE wurde angesetzt und 14mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben. Aufbewahrung bis zur Verwendung bei 42 °C.
4. Das Hefepellet wurde mit etwa 200 $\mu$ l SE resuspendiert, 1:1 bei 42 °C mit der Agarose-Lösung vermischt und 4 mg/ml Zymolyase oder Lyticase zugegeben.
5. Die Hefesuspension wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut gemischt und in Blockförmchen (1.5 x 10 x 1 mm) gefüllt. Diese wurden auf Eis gekühlt.
6. Nach 10 Minuten wurden die Blöcke aus den Förmchen in SE mit 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 mg/ml Zymolyase oder Lyticase transferiert, worin sie 4–6 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Durch diese Enzyme wird die Zellwand der Hefe verdaut.
7. Die Blöcke wurden 1 Stunde in LiDS inkubiert, die Lösung erneuert und nochmals über Nacht inkubiert.
8. Die Blöcke wurden 6 mal 15 Minuten in TE pH 8.0 gewaschen und in 0.5 M EDTA bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Die Auftrennung von Hefechromosomen und YAC wurde wie folgt durchgeführt:

1. Hefeblocke wurden 4 x 15 Minuten in 0.25x TAE gewaschen, in die Taschen eines 1%igen Agarosegel gegeben und mit flüssiger LMP-Agarose fixiert.
2. Unter gekühltem (14 °C), rezirkuliertem 0.25x TAE wurde das Gel 24 Stunden bei 6 V/cm mit von 23 auf 28 Sekunden ansteigenden Schaltzeiten gefahren. Diese Bedingungen ergeben eine optimale Auftrennung im Größenbereich des YACs.

Je nach Verwendungszweck wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt.

## 2.2.3 Säugetier-Zelllinien

### 2.2.3.1 Kultur und Transformation von Zelllinien

Die Kultur von COS-7- und HEK-293-Zellen erfolgte bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. Als Kulturmedium wurde DMEM (für HEK-293) beziehungsweise DMEM/Nut Mix F-12 (für COS-7; beide Life Technologies) verwendet, dem folgende Substanzen zugesetzt wurden: 10% fetales Kälberserum (Roche), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin. Zellen wurden 2-3mal pro Woche passagiert. Die Ablösung erfolgte mit Trypsin-EGTA. Alle Kulturmedien und Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

Für die Transformation wurden Zellen in 35 mm-Schalen kultiviert und bei etwa 30% Konfluenz verwendet.

1. Je 35 mm-Schale wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt: 5  $\mu$ g DNA (Mini- oder Maxipräp), H<sub>2</sub>O bidest. steril ad 225  $\mu$ l, 250  $\mu$ l 2x BBS.
2. Für jede zu transformierende Schale nacheinander wurde 25  $\mu$ l 2.5M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu der vorgelegten DNA-Lösung gegeben, durch Pipettieren gemischt und unmittelbar auf die Zellkultur pipettiert, wobei die ganze Oberfläche der Kultur mit der DNA-Lösung beträufelt wurde.
3. Die Zellkultur wurde durch leichtes kreisförmiges Schwenken durchmischt.
4. Nach 6–24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

### 2.2.3.2 X-Gal-Färbung von Zellkulturen

Um  $\beta$ -Galactosidase in Zellkultur sichtbar zu machen, wurde wie folgt vorgegangen:

1. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen kurz in Ethanol (reinst) permeabilisiert.
2. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen.



3. Färbelösung (X-Gal) wurde zugegeben und die Zellen bis zur Entwicklung eines deutlichen Signals in ihr belassen.

### 2.2.3.3 Zellaufschluss, GFP- und $\beta$ -Galactosidase-Messung

#### *Aufschluß von transformierten COS-7 und HEK-293 Zellen*

1. Angeheftete Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA (2–5 Minuten) und anschließend einem Zellschaber abgelöst und in frisches Medium transferiert.
2. Zellen wurden 5 Minuten bei 1000 U/min abzentrifugiert, in 1 ml kaltem Sonifizierungspuffer resuspendiert und auf Eis gestellt.
3. Auf Eis wurde die Zellen beschallt (Sonifikator Branson 250: 20 Zyklen, Duty Cycle 50%, Energy 60%).
4. Durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 4 °C wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt.

#### *Messung der GFP-Fluoreszenz*

Das Zelllysate wurde 1:10 in Sonifizierungspuffer verdünnt und der Emissionspeak (etwa 510 nm) bei Anregung mit 490 nm gemessen (willkürliche Einheiten).

#### *Messung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität*

In einer 2 ml-Quartzküvette wurden 1.8 ml Z-Puffer und 190  $\mu$ l MUG-Stammlösung vorgelegt. 10  $\mu$ l Zelllysate wurden zugegeben und die Veränderung der Emission bei 450 nm bei Anregung mit 350 nm nach 1 Minute gemessen (willkürliche Einheiten).

#### *Bestimmung des Proteingehalts*

50  $\mu$ l des Zelllysats wurden mit 1x Bio-Rad Protein-Assay-Reagenz versetzt und photometrisch der OD<sub>595</sub> bestimmt. Der Proteingehalt wurde gegen die OD-Werte eines BSA-Standards ermittelt.

## 2.2.4 Transgene Mäuse

Transgenese, oder die stabile Integration von fremder DNA in ein Wirtsgenom, ist eine der besten Techniken zur Analyse von Funktion und Regulation von Genen (Schedl und Hammes 2000). Der direkteste Weg zur Erzeugung von transgenen Mäusen ist durch Mikroinjektion einer DNA-Lösung in den Pronucleus von befruchteten Eizellen (Abb. 11). Nach der geglückten Injektion integriert die DNA zufällig in das Mausgenom und wird mit den endogenen Chromosomen repliziert, wodurch sie ein Teil des Genoms des neu geformten Embryos wird. Die Gründertiere sind in der Regel hemizygot, denn das Transgen integriert nur auf einer Kopie des Chromosoms. Die Integration findet bei 10–30% der transgenen Tiere nicht während des Einzellstadiums sondern später in der Entwicklung statt. Derartige Gründertiere haben also ein somatisches Mosaik des Transgens, und eine Transmission über die Keimbahn ist nicht garantiert.

Das Transgen integriert an einer zufälligen Stelle in das Genom, wobei mehrere Integrationsstellen selten sind. In sehr seltenen Fällen wurde auch schon eine homologe Rekombination, das heißt das Ersetzen eines homologen endogenen Gens durch das Transgen beobachtet. Der Mechanismus der Integration ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass im Zuge des Injektionsvorgangs Doppelstrangbrüche der DNA entstehen. Das Transgen würde dann in diese Bruchstelle durch DNA-Reparaturmechanismen integriert. Kurze, bis zu 10 kb lange Transgene werden normalerweise in 1-50 Kopien integriert. Die einzelnen Kopien werden in Tandemanordnungen als Kopf-Schwanz-Fusionen wiederholt. YAC-Transgene integrieren aufgrund ihrer Größe in nur wenigen Kopien.

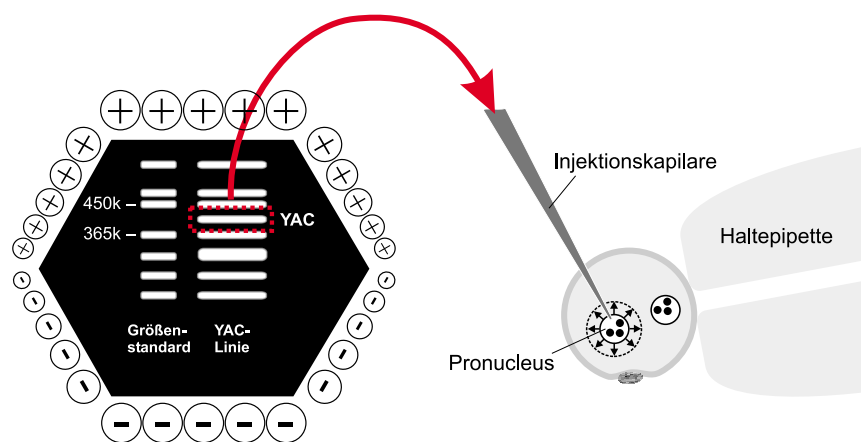
Durch die zufällige Integration in das Wirtsgenom sind mit dem Mikroinjektionsverfahren Schwierigkeiten verbunden, die nicht kontrolliert werden können und einen starken Einfluss auf die Expression des Transgens haben. Der wahrscheinlich wichtigste Faktor ist der sogenannte „Positionseffekt“: mehr noch als sie von der Zahl der Kopien abhängt, wird die Expression des Transgens von den benachbarten genomischen Sequenzen beeinflusst. Dabei gibt es verschiedene Arten von Positionseffekten. Sie

können die Expression des Transgens vollständig oder weitgehend verhindern, entweder durch spezifische Silencer-Elemente oder durch Integration in eine transkriptionell inaktive Region des Genoms. Andererseits können flankierende Sequenzen auch regulatorische Elemente enthalten, die als Enhancer auf die Expression benachbarter Gene wirken, was zu ektopischer Expression des Transgens führen kann.

Ein anderer Aspekt der zufälligen Integration ist, dass sie innerhalb der transkribierten Region eines Wirtsgens erfolgen kann. Dadurch können Insertionsmutanten entstehen. Da die meisten Gene keinen Phänotyp in Heterozygoten haben, erwächst für die Entwicklung der Gründertiere meist kein Problem daraus. Allerdings können spätere homozygote Züchtungen einen Phänotyp aufweisen, der durch die Zerstörung des endogenen Locus bedingt ist. Die Interpretation des beobachteten transgenen Phänotyps muss daher vorsichtig und nach Möglichkeit an den hemizygoten Tieren erfolgen. Transgene mit einem pathologischen Phänotyp, der durch den Integrationsort bedingt ist, können auf der anderen Seite von großem Nutzen sein, da sie eine Möglichkeit bieten, das betroffene Gen zu klonieren.

Wegen dieser Schwierigkeiten, die mit der zufälligen Integration verbunden sind, sollten nach Möglichkeit stets mehrere unabhängige transgene Linien erzeugt werden. Wenn ihre Expressionsmuster und Phänotypen übereinstimmen, kann man davon ausgehen, dass sie ein Effekt des Transgens sind und nicht durch Positionseffekte, Insertionsmutationen oder andere Veränderungen bewirkt werden. YAC-transgene Mäuse zeigen meist Expression, die von der Zahl der integrierten YAC-Kopien abhängt und nicht vom Integrationsort. Aufgrund der Größe des YACs sind sie für Positionseffekte weniger anfällig. Es müssen daher weniger unabhängige Linien generiert werden, um den Phänotyp zu bestätigen.

Transgene Mäuse werden zu zwei Hauptzwecken eingesetzt: zur Expression eines Gens unter einem



**Abb. 11: Aufreinigung und Injektion von YAC-DNA**

**A:** YAC-DNA wird in Hefe wie ein endogenes Chromosom repliziert. Zur Aufreinigung werden zunächst die Hefechromosomen durch Wechselfeld-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Bande mit dem YAC wird ausgeschnitten und die Agarose enzymatisch verdaut. **B:** Nach Dialyse gegen Injektionspuffer wird die gelöste YAC-DNA in befruchtete Mäuse-Eizellen injiziert. Dazu wird die Eizelle an eine Haltekapillare angesaugt und die unter konstantem Druck stehende Injektionskapillare in den männlichen Pronucleus eingeführt. Wenn sich das Volumen des Pronucleus durch die einströmende DNA-Lösung etwa verdoppelt hat, wird die Eizelle ruckartig von der Injektionskapillare fortgerissen. Diejenigen Eizellen, die sich am nächsten Tag zum Zweizellstadium entwickelt haben (etwa 20–50 Prozent), werden in scheinträchtige Leihmütter transplantiert. Von den transplantierten Eizellen werden etwa 10–20 Prozent normal ausgetragen. Von den lebend geborenen Jungtieren sind etwa 5–10 Prozent Träger des YACs. Insgesamt ist somit die Injektion von etwa 100–1000 Oocyten erforderlich, um ein YAC-transgenes Gründertier zu erhalten.

bestimmten Promotor (seinem eigenen oder einem heterologen) und zur Analyse von regulatorischen Regionen eines Genlokus'. Bei den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten YAC-transgenen wird ein heterologer Promotor (der Pax6-Promotor) zur Expression von Markergenen (taulacZ und tTA) verwendet, und auch die Plasmid-transgenen weisen einen heterologen Promotor (das tTA-Response Element) auf, der die Expression von Markergenen (GFP und inaktiviertes GFP) treibt.

Um eine starke Expression und ein Expressionsmuster zu erhalten, das vom verwendeten Promotor abhängt und nicht von anderen, oben beschriebenen Einflüssen, ist das Design der DNA-Konstrukte mit ausschlaggebend. Plasmidsequenzen haben einen negativen Einfluss auf die Expression und werden daher vor der Injektion durch Restriktionsverdau entfernt. Dabei wird die zirkuläre Plasmid-DNA linearisiert, was die Integrationshäufigkeit stark verbessert. Für eine gute Expression ist außerdem Spleißen und Polyadenylierung des Transgens erforderlich. In der Regel liegen klonierte Gene als intronfreie cDNA vor; daher wird ein künstliches Intron innerhalb des transkribierten Bereichs eingefügt. Zur Polyadenylierung werden Sequenzen verschiedener, meist viraler Herkunft verwendet, die nach dem translatierten Bereich angefügt werden. Bei den YAC-transgenen Mäusen ist durch die Einfügung des Markers in Exon 8 von Pax6 ein ausreichendes Spleißen sicher gestellt; auch hier wurde ein Polyadenylierungssignal eingefügt.

#### 2.2.4.1 Aufreinigung der DNA

Zur Mikroinjektion kann DNA in Konzentrationen von 0.01 bis 50 ng/ $\mu$ l eingesetzt werden, doch die Effizienz variiert dramatisch. Bei Plasmid-Konstrukten werden bei 2 ng/ $\mu$ l höchste Effizienzen erreicht. Höhere DNA-Konzentrationen können einen toxischen Effekt auf Oocyten haben. Während einer Mikroinjektion wird ein Volumen von 1-2 pl in den Pronucleus injiziert. Bei 2 ng/ $\mu$ l entspricht dies etwa 500-1000 Molekülen Plasmid-DNA von 3 kb Größe, aber nur 4-8 Molekülen YAC-DNA von 430 kb Größe. Für die YAC-Injektionen im Rahmen dieser Arbeit konnte die YAC-DNA nur auf zirka 0.5 ng/ $\mu$ l konzentriert werden, was etwa 1-2 Molekülen pro Oocyte entspricht.

Plasmid-DNA lässt sich mit Standardmethoden in großer Kopienzahl herstellen, einfach aufreinigen und linearisieren. Für die Injektion der TEN- und TEDN-Mäuse wurde die Plasmid-DNA wie folgt aufgereinigt:

1. Plasmide wurden bakteriell vermehrt und per Maxi-Präp (Qiagen) von der genomischen bakteriellen DNA isoliert.
2. Durch Xho I-Verdau von 2  $\mu$ g wurden die Plasmid in einen Plasmid-Anteil und einen zu injizierenden Anteil gespalten.
3. Über ein Agarose-Gel wurden die beiden Fragmente voneinander getrennt.
4. Die Bande, die den zu injizierenden Anteil enthielt, wurde ausgeschnitten, die DNA mit Hilfe eines Kits (Quiaex II) isoliert und in 0.5 ml Plasmid-Injektionspuffer gelöst.
5. Um eventuelle Verunreinigungen (Agarose) zu entfernen, wurden die Plasmid-Lösungen über einen 0.22  $\mu$ m-Filter (Millipore) gereinigt.

Die Aufreinigung von hochkonzentrierter YAC-DNA ist deutlich schwieriger als die von Plasmid-DNA. Einerseits ist dies durch die Größe der YAC-DNA bedingt, denn ein 430 kb großes künstliches Hefechromosom ist in ausgestrecktem Zustand zirka 150  $\mu$ m lang – bei einem Durchmesser von zirka 2 nm: Es ist daher extrem anfällig für Scherkräfte. Isolierte YAC-DNA kann daher nicht pipettiert werden, ohne dass Doppelstrangbrüche auftreten. Die YAC-DNA wird daher so lange wie möglich in Gelform verarbeitet, wo sie gegen Scherkräfte geschützt ist. Andererseits lässt sich YAC-DNA auch nicht auf einfache Weise von den übrigen Hefechromosomen trennen. Die Trennung der kleinen Plasmid-DNA von der großen bakteriellen genomischen DNA beruht auf einer selektiven Fällung der großen DNA. YAC-DNA lässt sich dagegen nur elektrophoretisch von den anderen, teils größeren, teils kleineren Hefechromosomen isolieren. Auch die Isolierung der DNA aus einer Agarosegelbande kann nicht mit den selben Methoden wie bei der Plasmid-DNA erfolgen – hier wird die Adhäsion der

bei hohem pH negativ geladenen DNA an kationische Träger ausgenutzt –, sondern erfordert ein anderes Vorgehen. Als schonendstes Verfahren hat sich der enzymatische Verdau der Agarose mittels Agarase und anschließende Dialyse gegen Injektionspuffer erwiesen. Außerordentlich reine Agarose als Ausgangsmaterial und ein sehr gleichmäßig gegossenes Gel sind für einen quantitativen Verdau erforderlich. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich daraus, dass sich die Anfärbung der YAC-DNA mit Ethidiumbromid aufgrund der Toxizität dieses interkalierenden Farbstoffs verbietet. Bei allen Gelen müssen daher schmale Kontrollstreifen abgeteilt und nachträglich gefärbt werden, die einen Rückschluss auf die Position der YAC-DNA im ungefärbten Teil des Gels erlauben. Dies setzt voraus, dass eine gleichmäßige Laufgeschwindigkeit über die gesamte Breite des Gels erreicht wird. YAC-DNA ist in Lösung sehr instabil. Durch Zusatz von Polyaminen (Spermin und Spemidin) wird sie stabilisiert. Der präzipitierende Effekt dieser Zusätze wird durch die Beimischung von NaCl neutralisiert. EDTA, das DNasen inhibiert, kann wegen seiner toxischen Wirkung für Oocyten nur in 10fach geringerer Konzentration als in Standard-DNA-Lösungsmitteln eingesetzt werden.

Für die Aufreinigung von YAC-DNA wurde wie folgt vorgegangen:

1. YAC-enthaltende Hefelinien wurden vermehrt und noch innerhalb ihrer logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert. Bei Hefen in der späten Wachstumsphase setzt bereits eine Degradation der DNA ein, die zu unbrauchbaren Präparationen führt.
2. Die Hefezellen wurden in hoher Konzentration in Agarose-Lösung aufgenommen, Blöcke gegossen und die Zellwand verdaut (siehe Kapitel 2.2.2.3). Danach wurden die Blöcke intensiv gewaschen:  $7 \times 15$ -30 Minuten in TE pH 8,  $4 \times 15$ -30 Minuten in Laufpuffer ( $0.25 \times$  TBE). Ein gleichmäßiger Lauf des Gels setzt voraus, dass keine Unterschiede in den Ionenkonzentrationen auftreten.
3. Jeweils 10 hockkonzentrierte Hefeblocke nebeneinander wurden mittels Wechselfeldelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.2.3). An beiden Rändern wurden schmale Streifen abgetrennt und in Ethidiumbromidlösung angefärbt, um die Position des YACs und der Hefechromosomen zu ermitteln.
4. Die YAC-Bande sowie das nächstgrößere und nächstkleinere Hefechromosom wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Es handelt sich um Chromosom IX (normalerweise 450 kb; im verwendeten Hefestamm etwa 440 kb) und Chromosom III (365 kb).

Die YAC-DNA liegt nun in geringer Konzentration in einem relativ großen ( $40 \times 7 \times 5$  mm) Agaroseblock vor. Im folgenden Schritt wird sie konzentriert und in Agarose höchster Reinheit übergeführt. Eine Konzentration wird dadurch erreicht, dass die große YAC-DNA aus dem 1%igen Gel in ein hochprozentiges Agarosegel (4%) gefahren wird, wo sie nur eine minimale Mobilität hat.

5. Die drei ausgeschnittenen Banden wurden in Längsrichtung nebeneinander in eine Gussform gelegt und ein 4%iges Sammelgel um sie herumgegossen. Um eine höchstmögliche Gleichförmigkeit des Gels zu erzielen, wurde Nusieve Agarose (FMC Bioproducts, Katalog-Nr. 50084) unter ständigem Rühren in kaltem Laufpuffer ( $0.25 \times$  TAE) gelöst, das Volumen etwa verdoppelt durch Zugabe von  $H_2O$  bidest. und in der Mikrowelle so lange gekocht, bis durch Verdampfen das ursprüngliche Volumen erreicht wurde (mindestens 10 Minuten). Die 4%ige Agarose-Lösung wurde auf etwa  $40^\circ C$  abgekühlt, bevor das Gel gegossen wurde. Die beiden natürlichen Hefechromosomen dienen nun als Laufstandards; es ist daher von großer Bedeutung, dass alle drei Banden mit ihrer zur Anode weisenden Schmalseite auf der selben Höhe liegen. Das Gel wurde mit geringer Feldstärke (3 V/cm) über Nacht gefahren, bis auf die YAC-Spur in Ethidiumbromid angefärbt und so die Position der konzentrierten YAC-DNA ermittelt. Der Gelblock mit der konzentrierten YAC-DNA wurde ausgeschnitten. In dieser Form ist die YAC-DNA für einige Wochen stabil, wenn sie in 0.5 M EDTA bei  $4^\circ C$  aufbewahrt wird.
6. Zur Zubereitung der injektionsfähigen Lösung wurde die benötigte Menge von dem Agaroseblock mit der YAC-DNA abgeteilt und die DNA durch enzymatischen Abbau der Agarose in Lösung übergeführt. Dazu wurde der Block  $4 \times 1$  Stunde in TENPA-Puffer gewaschen, überschüssige

Flüssigkeit abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß übergeführt. Bei 68 °C wurde die Agarose 3 Minuten angeschmolzen, kurz bei 6000 U/min herunterzentrifugiert und weitere 5 Minuten geschmolzen. Das Reaktionsgefäß wurde dann in ein 42 °C-Wasserbad transferiert und nach 1 Minuten zirka 25 U/ml Agarase („Gelase“, Epicentre Technologies, über Biozym bezogen) hinzugegeben. Durch 3stündige Inkubation bei 42 °C wurde die Agarose verdaut. Diese Lösung ist wenige Tage bei 4 °C stabil.

7. Am Injektionstag wurde durch 1stündige Dialyse gegen YAC-Injektionspuffer über eine 0.5 µm-Membran die Injektionslösung hergestellt.
8. Die Konzentration der YAC-DNA in der Injektionslösung wurde durch Vergleich mit DNA bekannter Konzentration bestimmt. Dazu wurde Bakteriophage λ-DNA in verschiedenen Konzentrationen sowie die Injektionslösung kurz in ein niederprozentiges Gel gefahren und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Intensität der Banden, die nach kurzer Laufzeit nur unwesentlich nach ihrer Größe aufgetrennt sind, läßt eine näherungsweise Bestimmung der Konzentration zu. Sofern die Degradierung der YAC-DNA bereits eingesetzt hatte, war unterhalb der größten Bande auf diesem Gel ein langer, diffuser angefärbter Bereich zu erkennen; derartige Chargen waren zur Injektion ungeeignet.

#### **2.2.4.2 Gewinnung von befruchteten Eizellen**

Befruchtete Eizellen wurden aus jungen, unreifen Weibchen der Stämme FVB/N und C57Bl/6J × CBA F1 durch hormonelle Superovulation und anschließende Verpaarung gewonnen. Die Superovulation wurde durch intraperitoneale Injektionen von 5 Einheiten Gonadotropin (aus trächtigen Stuten, Intergonan, Intervet) an Tag 1 um 14.00 Uhr und 5 Einheiten Gonadotropin (menschliches Chorion-Gonadotropin, Ovogest, Intervet) an Tag 3 um 12.00 Uhr ausgelöst. In der Nacht von Tag 3 auf Tag 4 wurden die Weibchen einzeln mit Männchen der Stämme FVB/N beziehungsweise C57Bl/6J verpaart und am nächsten Morgen durch Überstrecken des Genicks getötet. Die Ovarien mit dem anhängenden Ovidukt wurden präpariert. Zu diesem frühen Zeitpunkt sammeln sich die Eizellen in der Ampulle am Beginn des Eileiters. Die Ampullen wurden mit Uhrmacherpinzetten in M2-Medium (Sigma) eröffnet und die Eizellen, an denen noch viele Follikelzellen anhaften, freigesetzt. Die Eizellen wurden in einen neuen Tropfen M2-Medium übergeführt. Für diese und alle nachfolgenden Überführungen zwischen Medientropfen wurden die Eizellen in polierten Glaskapillaren eingesammelt. Die Kapillaren waren über einen Gummischlauch mit einem Mundstück verbunden, wodurch der Druck in der Kapillare kontrolliert wurde. Konzentrierte Hyaluronidase-Lösung wurde auf die Eizellen pipettiert, um die Follikelzellen abzulösen; dies erfolgt innerhalb etwa einer Minute. Die isolierten Eizellen wurden nun in 5 – 6 Tropfen frischem M2-Medium gewaschen. Die Eizellen wurden in Portionen von 20 – 40 Stück in M16-Medium-Tropfen (Sigma) transferiert und bis zur Injektion in einem mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank bei 37 °C unter Paraffin-Öl (Embryo-geprüft, Sigma) aufbewahrt.

#### **2.2.4.3 Mikroinjektionsstand und Oocyteninjektion**

Eizellen sind sehr empfindlich für pH-Änderungen. Im CO<sub>2</sub>-gepufferten M16-Puffer können sie lange aufbewahrt werden – bis zum Blastocystenstadium nach 4 Tagen, sofern der verwendete Mäusestamm keinen Block im Zweizellstadium aufweist. Außerhalb des Brutschanks verändert sich der pH des M16-Medium jedoch innerhalb weniger Minuten; die Verarbeitungszeiten müssen daher minimiert werden und finden in M2-Medium statt.

Der Mikroinjektionsstand war auf einem vibrationsgedämpften Tisch aufgebaut und bestand aus einem inversen Mikroskop, je einem piezogesteuerten Mikromanipulator für die Halte- und die Injektionskapillare sowie einem hydraulischen Kapillardruck-Kontrollsystem für die Haltekapillare und einem elektronischen für die Injektionskapillare. Haltekapillaren wurden von Hand in der Flamme auf zirka 80 µm Außen- und 30 µm Innendurchmesser gezogen und poliert. Injektionskapillaren wurden

in einem horizontalen Elektrodenziehgerät gezogen, mit DNA-Lösung befüllt und – für YAC-Injektionen – durch Anstossen an der Haltekapillare abgebrochen, um die Öffnung auf zirka 1 µm Innendurchmesser zu vergrößern. Um einen Rückfluss der DNA-Lösung und ein Verstopfen zu vermeiden, stand die Injektionskapillare unter einem konstanten Überdruck (Kompensationsdruck; etwa 150 – 300 hPa Überdruck).

Die Injektionen erfolgten in einem Tropfen M2-Medium, der sich in einem Objektträger mit Vertiefung befand. Zur Vermeidung von Verdunstung, die eine Veränderung des pH-Werts des Mediums nach sich ziehen würde, wurde der Tropfen mit Paraffin-Öl überschichtet. Die Eizellen wurden in Portionen, die in 30 Minuten verarbeitet werden konnten, aus dem Brutschrank in diesen Objektträger übergeführt. Für die Injektion wurde eine Eizelle an die Haltekapillare angesaugt, die Injektionskapillare in den Pronucleus eingeführt und so lange injiziert, bis sich der Durchmesser des Pronucleus etwa verdoppelt hatte. Dann wurde durch schnelles Zurückziehen der Haltekapillare die Injektion beendet. YAC-Injektionen erfolgten mit einem hohen, kontinuierlichen Kompensationsdruck, das heisst, es strömte kontinuierlich YAC-DNA-Lösung aus. Bei Plasmid-DNA-Injektion wurde der Injektionsdruck (etwa 300 hPa) erst nach dem Einstechen in den Pronucleus angelegt. Sofern der Pronucleus nicht sofort anzuschwellen begann, deutete dies darauf hin, dass die Kern- oder die Zellmembran nicht durchstoßen waren. In diesen Fällen wurde die Injektionskapillare weiter durch den Pronucleus geführt, teilweise durch diesen hindurch, um die Membranen zu durchbrechen.

Injizierte Eizellen wurden portionsweise zurück in den Brutschrank übergeführt. Eizellen, die keine sichtbaren Zeichen von Zellyse zeigten, wurden über Nacht inkubiert, lysierte aussortiert. Während der Nacht findet die erste Zellteilung statt, so dass am nächsten Morgen Zweizellstadien vorlagen.

#### **2.2.4.4 Transplantation injizierter Eizellen in Leihmütter**

Am Injektionstag wurden Verpaarungen von Leihmüttern (C57Bl/6J × Balb/c F1) mit vasktomierten Männchen (NMRI) angesetzt. Durch die Kopulation wird bei Mäuseweibchen eine Scheinträchtigkeit ausgelöst. Dies ist für das erfolgreiche Austragen der Eizellen erforderlich. Nur Weibchen, die am nächsten Morgen einen Vaginalpfropf aus koaguliertem Sperma aufwiesen, wurden für den Oocytentransfer verwendet. Für den Transfer wurden über der Flamme Transferkapillaren mit einem Innendurchmesser von etwa 100 µm gezogen und poliert. Der Ansaug- und Ausblasdruck wurde über ein Mundstück kontrolliert. Alle verwendeten Instrumente wurden zur Sterilisation abgeflammt.

1. Eine Anästhetikum wurde aus 9 mg/ml Ketamin Hydrochlorid (Ketavet, Pharmacia-Upjohn) und 0.02% Xylazin Hydrochlorid (Rompun, Bayer) in H<sub>2</sub>O (Aqua ad iniectabilia, Braun Melsungen) angesetzt. Die scheinträchtige Leihmutter wurde intraperitoneal mit 10 µl/g Körpergewicht injiziert. Nach 10 bis 15 Minuten lag eine tiefe Betäubung vor, die durch die Abwesenheit verschiedener Reflexe überprüft wurde: Lidschlagreflex beim Anblasen, Schwanzreflex beim Kneifen in die Schwanzspitze, Fußreflex beim Kneifen in die Zehenzwischenräume.
2. Die Maus wurde bäuchlings in eine Petrischale (10 cm Durchmesser) gelegt. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurden Augentropfen (Liquifilm, Pharm Allergan) aufgetropft. Der Rücken wurde durch Abwischen mit 70%igem Ethanol desinfiziert.
3. Die Zweizeller wurden dreimal in M2-Medium gewaschen und in die Transferkapillare aufgenommen. Dabei soll das Volumen des mittransferierten M2-Medium minimal sein. Es wurden zunächst zwei kleine Luftblasen, dann zwischen 15 und 30 Eizellen und abschließend eine weitere Luftblase aufgenommen. Die Luftblasen immobilisieren die Embryonen in der Kapillare während der Dauer der Operation und ermöglichen ein gefühlsvolles Ausblasen. Sie sind außerdem nach dem Transfer im Eileiter noch gut zu erkennen und dienen als Erfolgskontrolle. Die vorbereitete Transferkapillare wurde vorsichtig beiseite gelegt.
4. Um das Ovar und den Eileiter zu exponieren, muss die Haut und die Körperwand an der richtigen Stelle eröffnet werden. Der Schnitt durch die Haut mit der Schere erfolgt auf Lendenhöhe, wo das

- Abdomen am ausladendsten ist. Sofern ein Transfer in beide Eileiter erfolgen sollte, wurde der Schnitt dorsomedial gesetzt, im Fall des einseitigen Transfers etwa 1 cm lateral von der dorsalen Mittellinie. Die Länge des Schnitt betrug etwa 8 mm.
5. Mit einer stumpfen Pinzette wurde der Einschnitt gespreizt und verschoben, bis das Ovar und die Fettkörper, die am Reproduktionstrakt angebracht sind, als orangefarbener beziehungsweise weißer Fleck sichtbar waren. Das Peritoneum wurde oberhalb des periovariellen Fettkörpers durch einen kurzen Schnitt mit der Schere durchtrennt. Die Einschnittsstelle wurde so gewählt, dass Nerven und Blutgefäße nicht beschädigt wurden.
  6. Um das Auffinden der Einschnittsstelle beim späteren Zunähen zu erleichtern, wurde chirurgisches Nahtmaterial (Ethicon) durch eine Hälfte des Peritoneumeinschnitts gestochen, durchgezogen und bei Seite gelegt.
  7. Der Fettkörper wurde mit einer stumpfen Pinzette gegriffen und aus der Öffnung herausgezogen. Sobald das damit verbundene Ovar und der Eileiter herausgezogen waren, wurde der Fettkörper mit einer Klemme beschwert und auf dem Rücken der Maus abgelegt.
  8. Die folgenden Schritte wurden unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Der Eitrichter (Infundibulum), der den Eingang zum Eileiter bildet, wurde inmitten der Schlingen des Eileiters lokalisiert. Oberhalb des Infundibulums wurde die dünne Bindegewebshaut (Bursa), die das Ovar umhüllt, mit Uhrmacher-Pinzetten aufgerissen. Dieser Riss wurde so klein wie möglich und abseits größerer Blutgefäße gesetzt.
  9. Die Spitze einer Pinzette wurde vorsichtig in das Infundibulum eingeführt und der Eileiter sondiert. Nun wurde die Transferkapillare in das Infundibulum eingeführt (bis zum ersten Knick des Eileiters) und die Embryonen und die Luftblasen eingeblasen. Bei einem erfolgreichen Transfer waren alle drei Luftblasen sichtbar und lagen nach dem ersten Knick des Eileiters.
  10. Der Fettkörper wurde mit einer stumpfen Pinzette gegriffen und wieder in die Körperhöhle zurückgestopft, wobei auch Ovar und Ovidukt zurückglitten. Dabei wurde jede Berührung des Reproduktionstrakts vermieden.
  11. Das Peritoneum wurde mit einem Knoten vernäht. Sofern ein beidseitiger Transfer erfolgte, wurde die Hautöffnung auf die andere Seite verschoben und der Vorgang ab Schritt 5 wiederholt.
  12. Die Hautöffnung wurde mit 2 Clips verschlossen und mit Neomycin/Bacitracin-Puder (Nebacetin, Yamanouchi Pharma) bedeckt.
  13. Die Maus wurde zurück in den Käfig gelegt und bis zum Aufwachen nach zirka 15 – 30 Minuten an einem warmen und ruhigen Ort belassen.

## 2.2.5 Genexpressionsanalyse

### 2.2.5.1 Präparation und Fixierung von Gewebe

Mäuse wurden über Nacht verpaart und trächtige Tiere anhand des Vorhandenseins eines vaginalen Propfs identifiziert. Der Mittag des auf die Kopulation folgenden Tages wurde als Embryonaltag 0.5 (E0.5) definiert. Gerade bei jungen Embryonalstadien (bis zirka E10.5) weicht die tatsächliche Entwicklung der einzelnen Embryonen innerhalb eines Wurfs voneinander ab. Verwendete Tiere wurden anhand äußerlicher Merkmale einem Entwicklungsstadium zugeordnet. (Theiler 1972; Bard et al. 1998).

#### **Präparation:**

1. Trächtige Mäuse wurden – in Übereinstimmung mit den tierschutzrechtlichen Bestimmungen – durch Genickbruch getötet.
2. Ventrales Integument und Bauchfell wurden aufgeschnitten und durch Verschieben der Darmschlingen die Uteri exponiert. Die Uterushörner, in denen die Fruchtblasen aufgereiht sind, wurden abgeschnitten und für die weitere Präparation in PBS (Raumtemperatur) übergeführt.

3. Je nach Entwicklungsstadium wurde unterschiedliche Techniken verwendet, um die Embryonen aus den Fruchtblasen zu präparieren hogan beddington 1994.
4. Bei Embryonen ab E14.5 wurden das ZNS oder die Augen mit Uhrmacherpinzetten freipräpariert.

**Fixierung:**

Je nach Verwendungszweck wurden die Embryonen unterschiedlich fixiert:

- für X-Gal-Färbungen in 0.1% Glutaraldehyd in PBS über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung,
- für Antikörperfärbungen und In-situ-Hybridisierungen in 4% PFA für mindestens 18 Stunden bei 4 °C. Für Gefrierschnitte wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Kältemediator: Isopentan) und bei -20 °C aufbewahrt.

Für X-Gal-Färbungen wurden Embryonen ab E14.5 durch Perfusion fixiert. Dazu wurde der Brustraum eröffnet, das Herz exponiert und seine Spitze abgeschnitten. Eine feine Pipettenspitze, deren Durchmesser etwa dem der Aorta entsprach, wurde durch die linke Herzkammer in die Aorta eingeführt und der Embryo zunächst etwa 3 bis 5 Minuten mit PBS (Raumtemperatur) durchspült und dann etwa 10 Minuten mit 0.1% Glutaraldehyd in PBS (Raumtemperatur) fixiert.

### 2.2.5.2 Herstellung von Schnitten

**Vibratomschnitte**

1. Das Gewebe wurde kurz (10–15 Sekunden) in 25% Glutaraldehyd benetzt.
2. In Einmalgussformen wurden je 4 ml BSA/Gelatine-Mix mit 2.5% Glutaraldehyd vorgelegt, das Gewebe hier hinein transferiert und ausgerichtet.
3. Nach etwa 20 Minuten wurden die erhärteten Blöcke entnommen, zurechtgeschnitten und bis zur Verwendung in PBS aufbewahrt.
4. Blöcke wurden mit Sekundenkleber auf den Boden einer Petrischale befestigt. Die Petrischale wurde in das Vibratom eingespannt und mit eiskaltem PBS aufgefüllt.
5. Schnitte wurden bei Schnittdicken von 100 – 200 µm angefertigt.
- 6a. Schnitte für In-situ-Hybridisierungen wurden in Multi-well-Platten in PBS transferiert und nach Abschluss des Schneidens durch eine aufsteigende Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 2x 100%) dehydriert. Sie wurden bis zur Verwendung bis zu 6 Monate bei -20 °C aufbewahrt.
- 6b. Schitte von X-Gal-Wholemounds wurden auf Objektträger aufgezogen und mit Kaisers Gelatine eingedeckt.

**Gefrierschnitte**

1. Das Gewebe wurde im Gefriermikrotom an der Objektkühlvorrichtung mit Einbettmedium für Gefrierschnitte (Jung) festgefroren.
2. Schnitte (Schnittdicke: 10–12 µm für Antikörperfärbungen, 20–30 µm für X-Gal-Wholemounds) wurden angefertigt und durch thermischen Transfer auf beschichtete Objektträger (Superfrost, Menzel-Gläser) aufgenommen und etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.
3. Objektträger wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.5.3 RNA-In-situ-Hybridisierungen an Vibratomschnitten

**Probenherstellung**

Die Herstellung von DIG-markierten RNA-Proben erfolgte mit dem DIG RNA Labeling Mix (Roche) nach Angaben des Herstellers.

- |         |  |
|---------|--|
| taulacZ | pBS-taulacZ wurde mit EcoRV linearisiert und DIG-markierte RNA vom T7-Promoter aus hergestellt. Verdünnung 1:600.          |
| Pax6    | pm1 (Ton et al. 1992) wurde mit XbaI linearisiert und DIG-markierte RNA vom T7-Promotor aus hergestellt. Verdünnung 1:600. |



Die Spezifität der Pax6-In-situ-Probe wurde bereits demonstriert (Engelkamp et al. 1999). Die lacZ-Probe gibt kein unspezifisches Signal; dies wird dadurch gezeigt, dass sie bei Hybridisierung mit Wildtyp-Kontrolltieren kein Signal gibt (Beispiel in Abb. 21 G), während in lacZ-exprimierenden P<sub>hPax6</sub>-taulacZ-Mäusen ein deutliches Signal erhalten wird (Abb. 21 F).

#### ***In-situ-Hybridisierungen an schwimmenden Vibratomschnitten***

In-situ-Hybridisierungen wurden an schwimmenden Vibratomschnitten (Schnittdicke: 150 µm) durchgeführt. In der Regel wurden alternierend taulacZ- und Pax6-Proben eingesetzt, um einen Vergleich der Expressionsmuster zu ermöglichen.

1. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Methanolreihe (je 10 Minuten 75%, 50%, 25% in PBT, 2x PBT) rehydriert.
2. In 6% Wasserstoffperoxid-Lösung in PBT wurden die Schnitte für 10 Minuten gebleicht, danach 2x 5 Minuten in PBT gewaschen.
3. Zur Prähybridisierung wurde PBT gegen Hybridisierungspuffer ausgetauscht und die Schnitte 4–5 Stunden bei 68 °C inkubiert.
4. Die Hybridisierungsprobe wurde in Hybridisierungspuffer verdünnt und 5–10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Schnitte über Nacht bei 68 °C in einer feuchten Kammer hybridisiert.
5. Die Schnitte wurden 2x 10 und 2x 30 Minuten bei 68 °C in 1x SSC in Lösung A gewaschen, dann 2x 30 Minuten bei 68 °C in 0.2x SSC in Lösung A, dann 3x 10 Minuten bei Raumtemperatur im TBST.
6. Die Schnitte wurden mindestens 3 Stunden in 10% hitzeinaktiviertem Schafserum in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen des im folgenden Schritt verwendeten Antikörpers zu blockieren.
7. anti-DIG-Alkalische Phosphatase (F<sub>ab</sub>-Fragmente) wurde 1:2000 in 1% hitzeinaktiviertem Schafserum in TBST verdünnt, auf die Schnitte gegeben und diese über Nacht bei 4 °C unter ständiger sanfter Bewegung inkubiert.
8. Die Schnitte wurden 2x 10 Minuten bei Raumtemperatur unter ständiger sanfter Bewegung in TBST gewaschen, dann 4x 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständiger sanfter Bewegung in TBST, dann 2x 10 Minuten in NTMT.
9. NTMT wurde gegen In-situ-Färbelösung ausgetauscht. Die Färbereaktion erfolgte bei Raumtemperatur unter ständiger sanfter Bewegung. Bei Erreichen einer ausreichenden Anfärbung wurde die Färbereaktion durch Austausch der Färbelösung gegen NTMT beendet.
10. Die Schnitte wurden nochmals in NTMT gewaschen, dann in 1% Triton-X100 in PBS (pH 4) für mindestens 30 Minuten.
11. Zur Postfixierung wurden sie 20 Minuten in 4% PFA/0.1% Glutaraldehyd bei Raumtemperatur inkubiert, dann in PBS (pH 6.3) gewaschen und über eine aufsteigende Glycerinreihe (25%, 50%, 80% in PBS) in 80% Glycerin in PBS transferiert.
12. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und mit Kaisers Gelatine eingedeckt.

#### **2.2.5.4 Antikörperfärbungen**

Als Kontrolle für die Spezifität des Zweitantikörpers wurde bei einigen Schnitten der Erstantikörper ausgelassen.

1. Die zu färbenden Schnitte wurden aufgetaut und in PBS rehydriert.
2. Mit Antikörper-Blockierungslösung wurde für 15 Minuten blockiert.
3. Die Schnitte wurden mit Primärantikörper in geeigneter Verdünnung für 1 Stunde inkubiert.
4. Es wurde 3x 3 Minuten in PBT gewaschen.
5. Die Schnitte wurden mit Fluoreszenz-gekoppeltem Sekundärantikörper in geeigneter Verdünnung für 45 Minuten inkubiert.

6. Es wurde 3x 3 Minuten in PBT gewaschen.
7. Die Schnitte wurden mit VectaMount (CAMON Labor-Service, Wiesbaden) eingedeckt.

### 2.2.5.5 X-Gal-Färbungen

$\beta$ -D-Galactosidase ( $\beta$ -Galactosidase, E.C. 3.2.1.23) ist eine Glycosidhydrosylase, die die Spaltung von  $\beta$ -D-Galactopyranosiden katalysiert. Verschiedene chromogene und fluorogene Substrate sind für das Enzym verfügbar. Für histochemische Färbungen wird als Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid (X-Gal) verwendet. Durch die  $\beta$ -Galactosidase wird die Spaltung des Substrats in Galactose und 5-Brom-4-Chlor-3-Hydroxyindol (ein „Indoxyl“) katalysiert. Letzteres ist farblos und löslich. Das selbe Indoxyl entsteht auch durch die Hydrolyse von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) an der alkalischen Phosphatase, wie sie bei der In-situ-Hybridisierung (ISH) eingesetzt wird. Das Indoxyl setzt sich langsam oder durch Zusatz eines Oxidationsmittels beschleunigt zu einem Indigofarbstoff um, der typischerweise präzipitiert. Als Oxidationsmittel können – wie im Rahmen dieser Arbeit – Fe(III) in Kaliumferricyanid (Lojda 1970) oder – wie bei der ISH – Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) verwendet werden. Bei starker  $\beta$ -Galactosidase-Expression kann bei der Wholemout-Färbung das Oxidationsmittel lokal verbraucht werden. Das lösliche Indoxyl-Zwischenprodukt diffundiert dann in benachbarte Gewebe und wird erst dort oxidiert und präzipitiert. Dies führt zu einem gefärbten Hof um die  $\beta$ -Galactosidase-exprimierende Struktur herum. Dieses „Überfärben“ lässt sich durch die Vorinkubation mit Oxidationsmittel und durch ein Verkürzen der Farbreaktion vermeiden. In einigen Fällen wurde ein Überfärben jedoch in Kauf genommen, um im Wholemout auch schwächer  $\beta$ -Galactosidase-exprimierende Strukturen anzufärben.

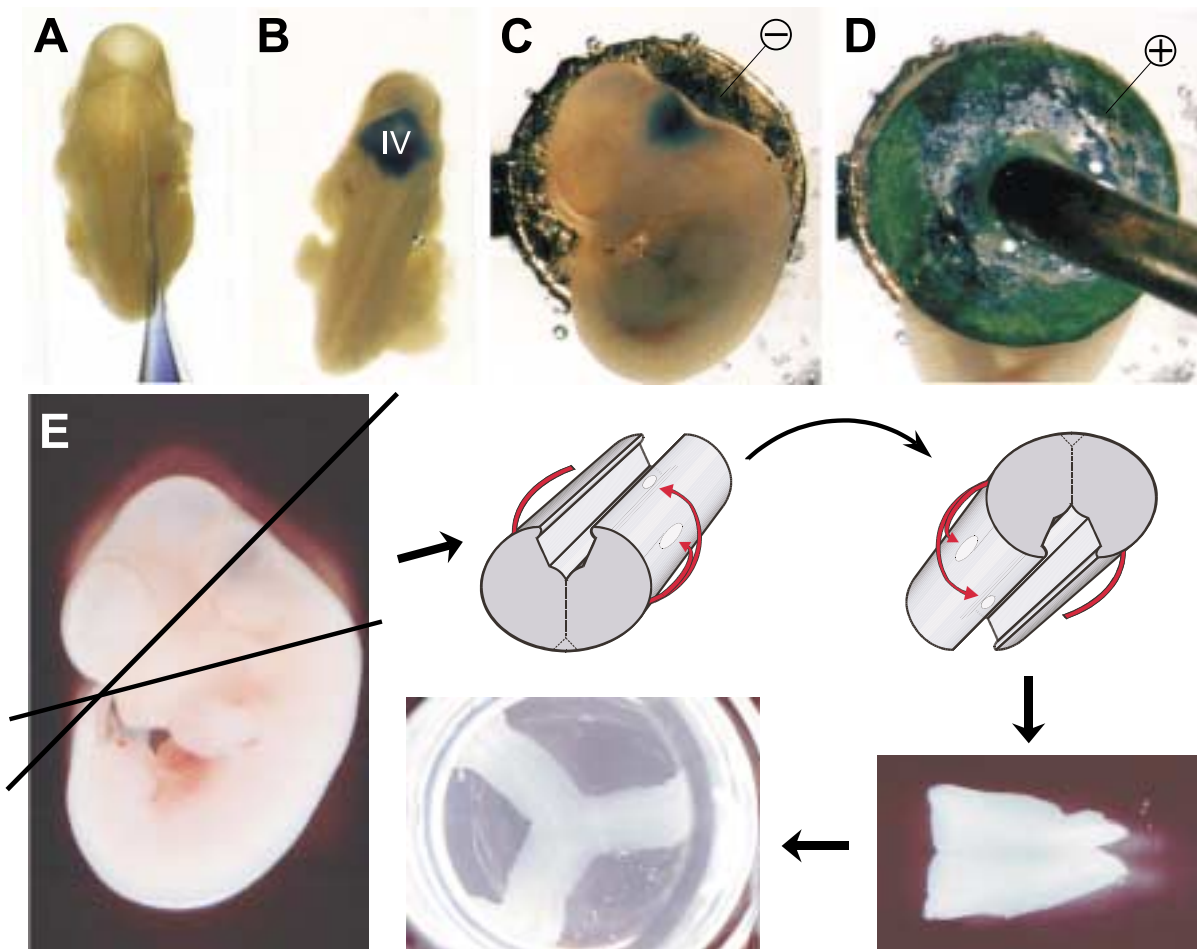
Für die X-Gal-Färbung wurde jeweils ein Wurf gemeinsam in Petrischalen oder 50 ml-Falcon-Röhrchen verarbeitet.

1. Das Gewebe wurde freipräpariert und in 0.05 – 0.1% Glutaraldehyd in PBS fixiert (4 °C, über Nacht; siehe Kapitel 2.2.5.1).
2. Das Gewebe wurde 30 Minuten bei ständigem Bewegen in Färbelösung (ohne X-Gal) bei Raumtemperatur vorinkubiert.
3. Das Gewebe wurde mindestens 24 Stunden, höchstens 72 Stunden bei 37 °C unbewegt in Färbelösung (mit X-Gal) inkubiert. Alternativ wurde das Gewebe zunächst 6 Stunden bei 37 °C, dann 2 Wochen bei 4 °C in Färbelösung inkubiert.
4. Das Gewebe wurde 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Gefärbtes Gewebe wurde als Wholemout begutachtet oder geschnitten (Vibratonschnitte oder Gefrierschnitte) und auf Objektträger aufgezogen.

### 2.2.6 Elektroporation der Medulla, Präparation und Kultur

Mäuseembryonen des Entwicklungsstadiums E12.5 wurden in PBS aus der Fruchtblase freipräpariert und in GBSS (GBSS for tubes, Life Technologies) transferiert. Die Injektion von DNA und die Elektroporation erfolge in einer Petrischale, deren Boden mit etwa 5 mm Agar (1% in GBSS) ausgegossen und mit GBSS gefüllt war (Abb. 12 A-D). Mit einer ausgezogenen Glaskapillare wurde das Dach des vierten Ventrikels durchstoßen und das Ventrikelsystem mit DNA-Lösung gefüllt [(0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l DNA in TE, leicht angefärbt mit Echtgrün FCF (Fast Green, Sigma)]. Je Embryo wurden etwa 2  $\mu$ l injiziert. Direkt nach der Injektion wurde elektroporiert. Dazu wurde der Embryo auf die runde Kupferkathode (Durchmesser 5 mm) aufgelegt, die Anode gleicher Bauart auf den Embryo abgesehen, bis der Abstand der Elektroden etwa 2.5 mm betrug, und elektroporiert. Dazu wurden 6 Rechteckpulse mit einer Spannung von 60 V (etwa 25 V/cm) und 60 ms Dauer im Abstand von etwa 5 Sekunden appliziert. Die Embryonen eines Wurfs wurden nacheinander elektroporiert, bevor sie präpariert wurden.



**Abb. 12: Gentransfer durch Elektroporation und Präparation der Medulla**

**A:** Eine Injektionskapillare (IK) wird durch das Dach des vierten Ventrikels (IV) gestochen und das Rautenhirnbläschen gefüllt. **B:** Durch die Anfärbung mit Echtgrün-FCF ist die Verteilung der injizierten DNA-Lösung im Ventrikelsystem leicht zu kontrollieren. **C:** Der Embryo wird seitlich auf die Kupfer-Anode gelegt. **D:** Die Kathode wird darüber geschwenkt, so dass der Abstand zwischen den beiden Elektroden etwa der Breite des Embryos entspricht (2.5 mm). Nun werden 6 Rechteckpulse mit einer Spannung von 60 V und 60 ms Dauer im Abstand von etwa 5 Sekunden appliziert, durch die die injizierte DNA von den oben liegenden, zur Kathode gerichteten Zellen in der Ventrikelwand aufgenommen wird. **E:** Um die Medulla frei zu präparieren wird eine etwa 3 mm dicke „Beinscheibe“ durch zwei Schnitte (durch Linien angedeutet) abgetrennt. Aus dieser wird das neurale Gewebe ausgelöst und mit der Ventrikelseite nach unten auf Kulturmembranen (hydrophilisiertes Polytetrafluorethylen, Millicell-CM, 0.4 mm Porengröße) aufgelegt. Je drei derartige Präparate werden sternförmig auf einer Membran von 12 oder 30 mm Durchmesser angeordnet. Während etwa 3–4 Tagen lassen sich die Wanderungen von Zellen der Rautenlippe verfolgen.

Für die Präparation (Abb. 12 E) wurde mit zwei Schnitten, die senkrecht zur neuralen Achse geführt wurden, eine etwa 3 mm dicke „Beinscheibe“ abgetrennt, die die Medulla sowie umliegendes nicht-neurales Gewebe enthält. Der erste dieser Schnitte wurde direkt unterhalb der Nackenbeuge, der zweite oberhalb der Brückenbeuge angesetzt. Aus der Medulla-„Beinscheibe“ wurde mit feinen Uhrmacherpinzetten das neurale Gewebe der Medulla und des Zervikalmarks ausgelöst. Dabei wurden die Hirnnerven nahe ihrer Austrittsstellen durchtrennt und die Hirnhäute entfernt. Die erhaltene Medulla wurde an der dorsalen Mittellinie durchtrennt und, mit der ventrikulären Seite nach unten, auf Kulturmembranen (hydrophilisiertes Polytetrafluorethylen, Millicell-CM, 0.4 µm Porengröße, 12 oder 30 mm Durchmesser) aufgelegt („Offenes-Buch-Präparat“). Durch diese Orientierung ist die externe, piaie

Oberfläche dem Betrachter zugewandt. Je drei Präparate wurden sternförmig, mit den caudalen Enden nach innen, auf einer Membran angeordnet. Die Kulturmembranen wurden in eine Kulturschale mit Neurobasalmedium transferiert, so dass die Füllhöhe des Mediums der Höhe der Membranen entsprach. Bei 5% CO<sub>2</sub> wurden die Präparate regelmäßig 72 Stunden kultiviert. Von oben nach unten folgen somit aufeinander: CO<sub>2</sub>-begaste Luft – Präparat – Filter – Medium. Dadurch wird sowohl ein guter Gasaustausch als auch die Versorgung der Präparate mit Medium gewährleistet.

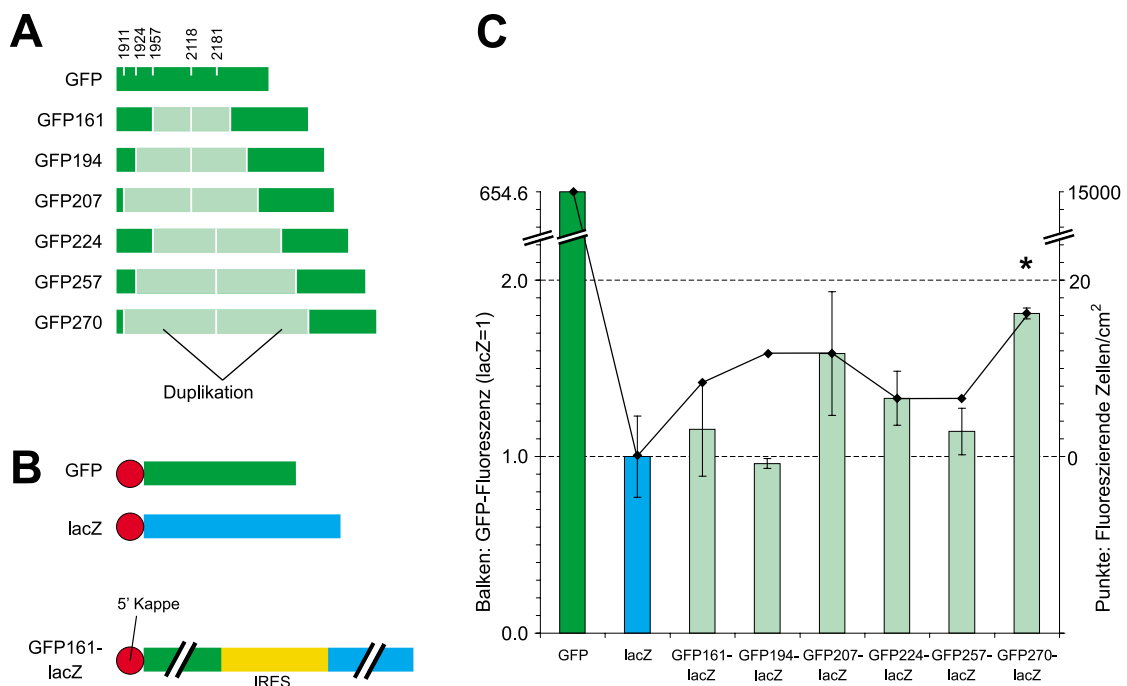
Für die Analyse wurden die Kulturfilter in 35 mm-Schalen mit einigen Tropfen Neurobasalmedium transferiert und die Präparate unter einem aufrechten Mikroskop von oben mit Objektiven mit weitem Arbeitsabstand betrachtet und fotografiert. Es wurden Durchlichtaufnahmen angefertigt, die wegen der Dicke des Präparats (einige hundert µm) hauptsächlich die Umrisse zeigen, und Auflichtfluoreszenzaufnahmen. Wegen des direkten Lichtwegs wurde in der Auflichtfluoreszenz eine gute Auflösung erreicht.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Inaktivierte GFP-Varianten

Für die Markierung von Zellklonen sollte eine GFP-Variante entwickelt werden, die durch eine intragenische Duplikation inaktiviert ist. Ausgehend von EGFP wurden dazu verschieden lange Duplikationen hergestellt (Abb. 13 A; Details in Kapitel 2.1.5.2.2 „Inaktivierte EGFP-Varianten“). In Vorversuchen sollte ermittelt werden, ob diese Varianten in Zellkultur rekombinieren und, wenn ja, ob die Rekombinationsfrequenz mit der von lacZ vergleichbar ist (Bonnerot und Nicolas 1993b). Eine geeignete Variante sollte dann zur Herstellung einer tTA-kontrollierten Transreporterlinie verwendet werden.

Die GFP-Duplikationen wurden in bicistronische Konstrukte inkliniert, bei denen das lacZ-Gen als interner Standard dient (Abb. 13 B). Zur näherungsweisen Bestimmung der Rekombinationseffizienz wurden HEK-293- und COS-7-Zellen transient mit diesen Konstrukten transformiert und die Rekombinationsrate in Kultur auf zwei unterschiedliche Weisen bestimmt. Zum einen wurden in COS-7-Zellen nach 2 Tagen die grün fluoreszierender Zellen in intakten Kulturen pro cm<sup>2</sup> gezählt (Punkte in Abb. 13 C; rechte Skala). Zum anderen wurden HEK-293-Zellen nach 3 Tagen durch Sonifikation lysiert und im Zelllysate GFP-Fluoreszenz,  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität und die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Die GFP-Fluoreszenz wurde für den Proteingehalt über alle Messwerte und für die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität innerhalb einer Messreihe standardisiert, um einen Vergleich der verschiede-



**Abb. 13: Rekombinationseffizienz von EGFP-Duplikationen**

**A:** EGFP-Varianten mit unterschiedlich langen Duplikationen. **B:** Bicistronische Konstrukte zur Messung der Rekombinationseffizienz. **C:** Rekombinationseffizienz unterschiedlich langer Duplikationen. Die 270 Basen lange Duplikation weist die höchste Rekombinationseffizienz auf. Transient mit zirkulärer Plasmid-DNA transfizierte HEK-293-Zellen. Lyse an Tag 3 durch Sonifikation. GFP-Fluoreszenz für Proteingehalt über alle Reihen und für lacZ innerhalb einer Reihe standardisiert. Normalisiert: lacZ = 1. Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Ansätzen. ★:  $p < 0.05$  (gegen lacZ).

nen Konstrukte zu erlauben. Anschließend wurden die Werte auf den Leerwert (lacZ) normalisiert. Außer GFP270 unterscheidet sich keiner der so ermittelten Fluoreszenzwerte signifikant vom Leerwert (Balkengrafik in Abb. 13 C; Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Ansätzen).

Die höchste Rekombinationseffizienz wird in beiden Messverfahren für GFP270 gefunden. Dieses wurde daher zur Herstellung transgener Reportermause verwendet. Auf der Grundlage der Zählung fluoreszierender Zellen in intakten Kulturen beträgt die Rekombinationswahrscheinlichkeit<sup>2</sup> je Zellteilung näherungsweise  $6 \times 10^{-4}$ . Bei lacZ betrug die Rekombinationswahrscheinlichkeit je Zellteilung in diesen transienten Transfektionen etwa  $2 \times 10^{-4}$  (siehe <sup>3</sup>). Die Rekombinationswahrscheinlichkeit von GFP270 ist somit etwas höher als die von lacZ.

## 3.2 Transgene Mäuselinien

Hauptziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von transgenen Mäuselinien, die die weitere Analyse der Rolle von Pax6, besonders während neuronaler Wanderungen erlauben. Dazu sollten drei YAC-transgene Linien generiert werden, in denen der menschliche Pax6-Promotor die Expression der Reportergene taulacZ, taulaacZ beziehungsweise tTA kontrolliert. Ferner sollten zwei Plasmid-transgene Linien hergestellt werden, in denen EGFPmn oder EGFP270mn unter der Kontrolle des tTA Response Elements (TRE) stehen.

Zunächst wurden die DNA-Konstrukte für die Mikroinjektion hergestellt und in verschiedenen Vorversuchen überprüft. Mikroinjektionen und Oocytentransfers wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Schedl am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, unter Anleitung von Danilo Landrock durchgeführt. Die Gründertiere wurden per PCR aus Schwanzbiopsien auf die Anwesenheit der Transgene überprüft. Für methodische Details siehe Kapitel 2.2.4 „Transgene Mäuse“.

### 3.2.1 Herstellung und Überprüfung der Konstrukte

Zur Herstellung der DNA-Konstrukte für die Mikroinjektion wurden unter Verwendung von molekularbiologischen Standardtechniken DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft zusammengefügt (für Details siehe Kapitel 2.1.5.2 „Eigene Subklonierungen“). Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit wurden die meisten Fragmente sequenziert und wichtige Elemente der Konstrukte in transienten Transfektionen von HEK-293-, COS-7- und PC12-Zelllinien getestet. Diese Elemente wurden dazu meist in Expressionsplasmide unter die Kontrolle des Enhancers/Promotors aus dem Cytomegalievirus (CMV) inseriert; sie wurden so stark und konstitutiv in den transfizierten Zellen exprimiert. Diese Überprüfung war auch für die bereits veröffentlichten Reportergene sinnvoll, da sie im Rahmen dieser Arbeit mehrfach subkloniert wurden, beziehungsweise aus ihren Komponenten neu zusammengesetzt wurden.

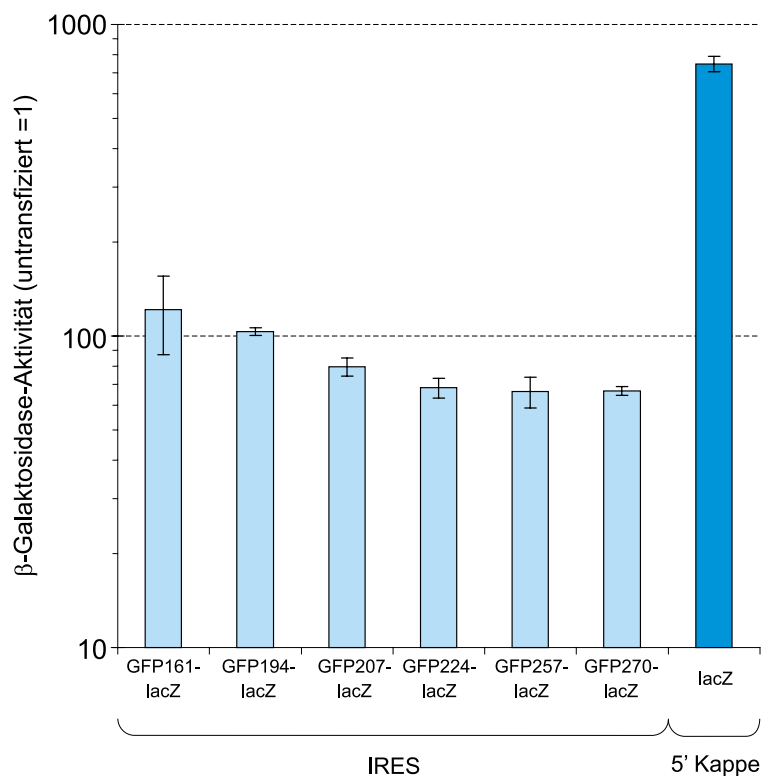
***IRESmut.*** Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) aus pIRES-EGFP (Clontech) wurde per PCR-Mutagenese so verändert, dass ein Startcodon (ATG-11) in optimale Position nach der IRES inseriert wurde (Rees et al. 1996; Mountford und Smith 1995). Diese modifizierte IRES wurde „IRESmut“ genannt. In transformierten COS-7-Zellen fluoreszierten mit dem Konstrukt pIRESmutEGFP etwa zehnmals mehr Zellen als mit dem Konstrukt pIRES-EGFP (nicht gezeigt). Also ist die Translationsrate von IRESmut deutlich höher als die der IRES aus pIRES-EGFP.

---

<sup>2</sup> p: Wahrscheinlichkeit, dass in einer Zelle eine Rekombination erfolgt, q: dass keine erfolgt.  $q = 1 - p$ . 48h entsprechen 2.67 Zyklen à 18h.  $q^{2.67} = (10000 - 16)/10000 = 0.9984$ .  $p = 1 - 0.9984^{0.375} = 1 - 0.9994 = 6 \times 10^{-4}$ .

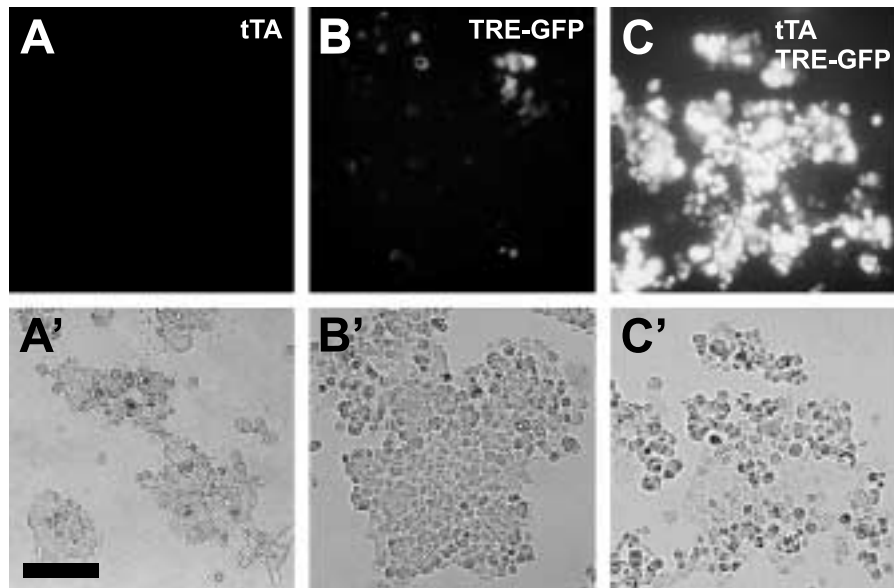
Welche Translationsrate IRESmut im Vergleich zu einer 5'-Kappe aufweist, zeigt die Auswertung der Transfektionen mit bicistronischen Konstrukten (siehe Kapitel 3.1 „Inaktivierte GFP-Varianten“). Dabei kann die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität außer zur Standardisierung der Fluoreszenz auch als Maß für die Translationsrate verwendet werden (Abb. 14). Auf der mRNA dieser Konstrukte wird hinter der 5'-Kappe eine GFP-Duplikation kodiert, an die sich IRESmut und die lacZ-Sequenz anschließt. Die Translation von lacZ ist hier also von der Translationsrate von IRESmut abhängig. Zum Vergleich dient ein CMV-lacZ-Konstrukt. Bei dessen mRNA liegt die lacZ-Sequenz direkt hinter der 5'-Kappe. Gegenüber der 5'-Kappe (Spalte „lacZ“) ist die Aktivität von IRESmut (übrige Spalten) etwa um eine Zehnerpotenz geringer. Dabei ist die Translationsrate offenbar von der Länge der Duplikation im GFP abhängig: sie scheint mit zunehmender Länge abzunehmen. Dieser Effekt wurde nicht näher untersucht. Es ist aber eindeutig festzustellen, dass die Translationsrate von IRESmut abhängig ist von der vorangegangenen Translationseinheit auf der bicistronischen mRNA.

**taulacZ.** pCMV-taulacZ gab in X-Gal-Färbungen von transformierten HEK-293- und COS-7-Zellen eine intensive blaue Färbung, die in ihrer Lokalisation nicht von pCMV $\beta$  (ohne tau-Anteil) unterschieden werden konnte (nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob taulacZ in Fortsätzen lokalisiert ist, wurden PC12-Zellen mit pCMV-taulacZ transformiert. Diese Zelllinie differenziert nach einigen Tagen in Kultur unter anderem zu polaren neuronalen Zellen (Greene und Tischler 1976). Dabei wurde gefunden, dass die Färbung in Fortsätzen von Zellen mit neuronentypischer bipolarer Morphologie lokalisiert ist (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass taulacZ sowohl für eine funktionsfähige  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität kodiert als auch durch den tau-Anteil in die Mikrotubuli-reichen Fortsätze neuronaler Zellen transportiert wird.



**Abb. 14: Translationsrate von IRESmut-Konstrukten**

Konstrukte und Versuchsbedingungen wie in Abb. 13. Im Vergleich zu einer 5'-Kappe (Spalte „lacZ“) ist die IRESmut-Aktivität (übrige Spalten) etwa um eine Zehnerpotenz geringer. Die Translationsrate scheint mit zunehmender Länge der Duplikation im GFP abzunehmen.



**Abb. 15: Funktionsüberprüfung des Tetracyclin-kontrollierten Transaktivatorsystems**

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des binären Tetracyclin-kontrollierten Transaktivatorsystems wurden HEK-293-Zellen mit **A:** Transaktivator tTA (pTet-Off), **B:** tTA-kontrolliertem Reporterkonstrukt ptetOiEGFPmn, **C:** tTA + ptetOiEGFPmn transfiziert. Nur wenn beide Konstrukte gemeinsam transfiziert wurden, fluoreszierten die Zellen stark (C). Bei Verwendung des Transaktivators allein (A) trat keine, beim Reporterkonstrukt (B) eine geringe Hintergrundfluoreszenz auf. **A', B', C':** Darstellung aller Zellen durch Differential-Interferenzkontrast. Balken: 150µm.

**taulaacZ.** Der laacZ-Anteil wurde darauf überprüft, ob es zu gelegentlichen somatischen Rekombinationen kommt. Dazu wurde pCMV-laacZ in HEK-293- und COS-7-Zellen transformiert. Nach 24 Stunden wiesen 0,5, nach 72 Stunden 10 Zellen/cm<sup>2</sup> in X-Gal-Färbungen eine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf (nicht gezeigt). Unter Annahme eines 18stündigen Teilungszyklus berechnet sich daraus eine Rekombinationswahrscheinlichkeit<sup>3</sup> von etwa  $2 \times 10^{-4}$  im Vergleich zu  $1,4 \times 10^{-6}$  bis  $1,2 \times 10^{-5}$  in transgenen Mäusen (Bonnerot und Nicolas 1993b). taulaacZ selbst wurde nicht getestet. Da aber die Lokalisierung von taulacZ in Neuriten und die somatische Rekombinationsfähigkeit von laacZ gezeigt war, wurde davon ausgegangen, dass auch taulaacZ funktionsfähig ist.

**tTA und ptetOiEGFPmn.** Zur Überprüfung des Tetracyclin-kontrollierten Transaktivatorsystems wurden die Konstrukte pTet-Off (Transaktivator) und ptetOiEGFPmn (Reporter) einzeln und gemeinsam in HEK-293- und COS-7-Zellen eingebracht. pTet-Off allein führte zu keiner Fluoreszenz, ptetOiEGFPmn allein zu wenigen schwach fluoreszierenden Zellen (Abb. 15 A, B). Wurden jedoch beide gemeinsam transfiziert, fluoreszierten viele Zellen stark (Abb. 15 C). Dies demonstriert die Funktionsfähigkeit des binären Reportersystems. Die Regulierung der Reporterkonstrukte ist nicht in allen Zellen dicht; dies ist vermutlich ein Effekt der transienten Transfektion, bei der mehrere Plasmidkopien in die Zelle eingebracht werden und zufällig unter den Einfluss anderer transkriptioneller Aktivatoren gelangen können.

Zur Herstellung der YAC-Konstrukte wurden die Rekombinationskonstrukte RtaulacZ, RtaulacZ und RtTA verwendet. Diese Konstrukte enthalten neben dem jeweiligen Reportergen das LYS2-Gen,

<sup>3</sup> Siehe auch <sup>2</sup>. 72h entsprechen 4 Zyklen à 18h.  $q^4 = (15000 - 10)/15000 = 0,99933$ .  $p = 1 - 0,999^{0,25} = 1 - 0,9998 = 2 \times 10^{-4}$ .



das eine Lysin-Auxotrophie aufhebt. Zwei je 0.5 kb lange Abschnitte am 5'- und 3'-Ende der Konstrukte sind zur genomischen Sequenz des menschlichen Pax6-Locus homolog, der auf dem YAC Y593 enthalten ist (siehe Abb. 10). Durch Lithiumacetat-vermittelte Transformation wurden sie in die lys2-defiziente Hefelinie AB1380 Y593 eingebracht. Nur transformierte Kolonien wurden Lysin-prototroph und wuchsen auf Nährmedium ohne zugesetztes Lysin. Diese Kolonien wurden per PCR darauf überprüft, ob eine homologe Rekombination im Pax6-Locus stattgefunden hatte. Dabei wurden für jedes Konstrukt mehrere positive Kolonien identifiziert (siehe Tab. 1).

Linie	Transformationskonstrukt	Anzahl Kolonien				
		Lysin-prototroph	davon untersucht	davon PCR-positiv für		
				Pax6	IRES	Pax6-IRES
Y593-taulacZ	RtaulacZ	$\sim 10^4$	9	9	9	2
Y593-taulaacZ	RtaulaacZ	$\sim 10^4$	9	9	9	6
Y593-tTA	RtTA	$\sim 10^4$	9	9	9	4
Positivkontrolle	YCA-LYS2	$\sim 10^5$	–	–	–	–
Negativkontrolle	–	0	–	–	–	–

Tab. 1: Homologe Rekombination zur Herstellung der YAC-Konstrukte.

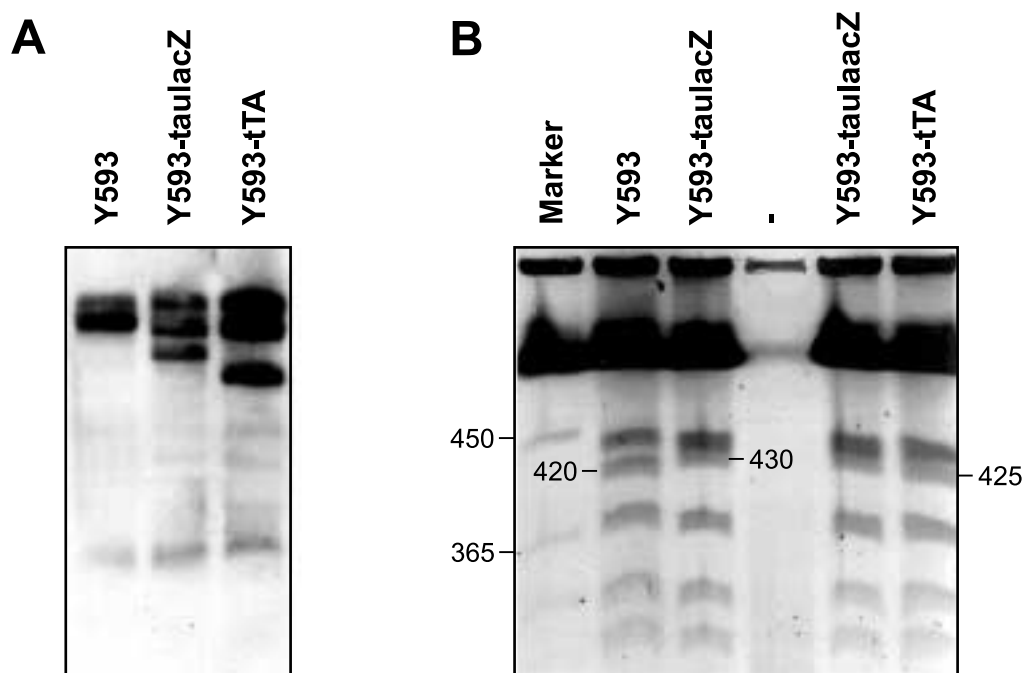


Abb. 16: Southern-Analyse und Größenvergleich von YAC-Konstrukten

**A:** Southern-Analyse: Genomische Hefe-DNA aus YAC-Linien wurde mit EcoR I geschnitten, auf einem 0.85%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Digoxigenin-markierter FAT5-Cosmid-DNA hybridisiert (DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I, Roche) und das Signal nachgewiesen. Verglichen mit Y593 treten bei Y593-taulacZ und Y593-tTA neue Fragmente auf, die in ihrer Größe den Erwartungen entsprechen. **B:** Wechselfeld-elektrophoretisch aufgetrennte Hefe-Chromosomen aus YAC-Linien. Verglichen mit dem Original-YAC in der Linie Y593 (420 kb) sind die veränderten YACs in den Linien Y593-taulacZ, Y593-taulaacZ (beide 430 kb) und Y593-tTA (425 kb) etwas größer.

Von je einer Kolonie pro Konstrukt wurde genomische DNA präpariert und per Southern-Analyse überprüft, ob die erhaltenen Fragmentlängen mit denen übereinstimmen, die im Falle einer homologen Rekombination zu erwarten waren. Dies war der Fall (Abb. 16 A). Zur weiteren Absicherung einer korrekten Integration des jeweiligen Rekombinationskonstrukts wurde die Größe der YACs in den identifizierten positiven Kolonien per Wechselfeld-Elektrophorese analysiert (Abb. 16 B). Auch die Größe der YACs entsprach den Erwartungen.

### 3.2.2 Mikroinjektionen

Die so hergestellten und auf ihre Funktionsfähigkeit überprüften Konstrukte wurden für die Mikroinjektion aufgereinigt: Plasmid-Konstrukte wurden linearisiert, per Gelelektrophorese von den Plasmid-Anteilen getrennt, aus dem Gel aufgereinigt und durch Ultrafiltration über einen 0.22 µm-Membranfilter von Verunreinigungen befreit; YACs wurden per Wechselfeld-Gelelektrophorese von den übrigen Hefechromosomen getrennt, konzentriert und durch Agarase-Verdau in eine gelöste Form übergeführt. Aus Tab. 2 ist ersichtlich, welche Konstrukte für die Mikroinjektion von Mäuseoocyten verwendet wurden und an wie vielen Tagen injiziert wurde. Je Injektionstag wurden 50-150 Eizellen injiziert, von denen sich am Folgetag 20-60 zu Zweizellern entwickelt hatten.

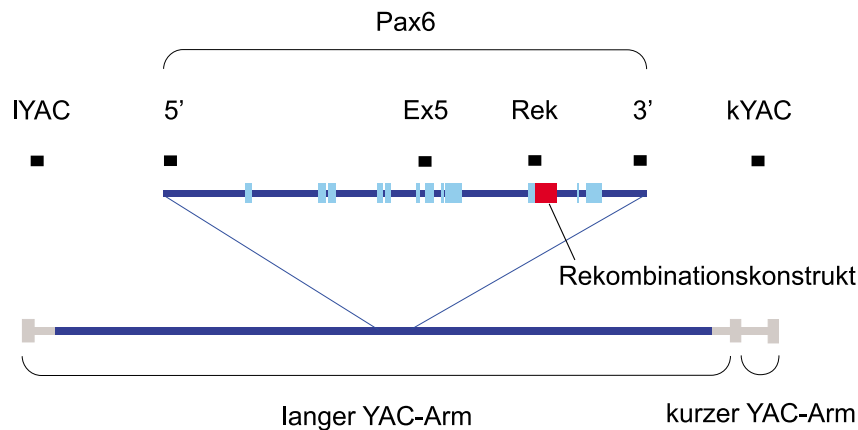
Kürzel	Bezeichnung der Mäuselinie	Art und Bezeichnung des Konstrukts	Injektions-tage
YL	$P_{hPax6}$ -taulacZ	YAC Y593-CtaulacZ	15
YT	$P_{hPax6}$ -tTA	YAC Y593-tTA	5
YLD	$P_{hPax6}$ -taulaacZ	YAC Y593-taulaacZ	1
TEN	TRE-EGFPmn	Plasmid ptetOiEGFPmn	2
TEDN	TRE-EGFP270mn	Plasmid ptetOiEGFP270mn	1

Tab. 2: Oocyten-Mikroinjektionen

### 3.2.3 PCR-Screening von Gründertieren

Im Alter von etwa 3 Wochen wurden die Gründertiere von der Leihmutter getrennt und Schwanzbiopsien entnommen, aus denen genomische DNA isoliert wurde. Diese wurde per PCR auf die Anwesenheit der Transgene im Genom überprüft. Für die YAC-Transgene ist die Lage der Primer aus Abb. 17 ersichtlich.

Im Anhang sind die Ergebnisse der einzelnen PCR-Ansätze tabellarisch zusammengefasst. Dabei wird die Anwesenheit und Stärke einer amplifizierten Bande qualitativ bewertet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst. Transgene Gründertiere wurden somit für die Linien  $P_{Pax6}$ -taulacZ,  $P_{Pax6}$ -tTA und TEDN per PCR-Genotypisierung identifiziert.



**Abb. 17: Lage von Genotypisierungsprimern in YAC-Transgenen**

Die äußeren Primerpaare IYAC und kYAC amplifizieren Sequenzen auf dem langen beziehungsweise kurzen YAC-Arm. Die übrigen Primer liegen innerhalb des Pax6-Locus und werden in der Gruppe „Pax6“ zusammengefasst: Mit den Primerpaaren 5' und 3' werden menschliche genomische Sequenzen außerhalb des transkribierten Bereichs nachgewiesen. Das Primerpaar Ex5 liegt in Exon 5. Der 5'-Primer von Rek liegt in Exon 8, der 3'-Primer in der IRES, wodurch eine Rekombination nachgewiesen wird.

Konstrukt	Art des Konstrukts	Analysierte Gründertiere				
		Anzahl	davon mit Merkmalen			
			alle	IYAC	Pax6 <sup>4</sup>	kYAC
taulacZ	YAC	29	1	7	2	– <sup>5</sup>
taulaacZ	YAC	0	–	–	–	–
tTA	YAC	21	1	4	6	5
TEN	Plasmid	14	0			
TEDN	Plasmid	13	4			

**Tab. 3: Analyse der Gründertiere (Zusammenfassung)**

### 3.2.4 Genereller Phänotyp der transgenen Linien

Alle im folgenden beschriebenen transgenen Gründertiere waren äußerlich unauffällig und fertil. Sie wurden mit Wildtyptieren des Stamms CD1 verpaart und die Nachkommen genotypisiert.

**YAC-transgene Linien.** Die YAC-transgenen Gründertiere wurden mit Wildtyp-CD1 verpaart und die Nachkommen per PCR auf das Vorhandensein der Transgene analysiert. In der Linie  $P_{hPax6}$ -tTA53 wurden 54 Nachkommen genotypisiert, die alle negativ waren. In der Linie  $P_{hPax6}$ -tTA55 wurden 51 Nachkommen genotypisiert, die ebenfalls alle negativ waren. Vermutlich weisen diesen beiden Gründertiere ein somatisches Mosaik der Transgene auf, so dass in der Schwanzbiopsie der Gründertiere die Transgenmarker vorhanden waren, in den Keimbahnzellen jedoch nicht.

<sup>4</sup> Mindestens eines der Merkmale 5', Rek und 3'

<sup>5</sup> zu viel Hintergrund für Auswertung

Bei den Linien  $P_{hPax6}$ -taulacZ19 und  $P_{hPax6}$ -tTA72 wurden Transgenmerkmale an die Nachkommen vererbt. Dies zeigt, dass hier eine Integration in der Keimbahn erfolgt war. In der Filialgeneration dieser Linien trat die selbe Merkmalskombination wie im jeweiligen Gründertier auf. Dies spricht dafür, dass die Integration der YACs jeweils an nur einem Locus erfolgt war. Da bei transgenen Vätern Nachkommen beiderlei Geschlechts Träger des jeweiligen Transgens waren, sind die Transgene auf Autosomen integriert. Die Vererbung der Transgene erfolgte somit im autosomal-dominanten Erbgang. Im folgenden werden diese beiden Linien kurz als  $P_{hPax6}$ -taulacZ und  $P_{hPax6}$ -tTA bezeichnet, ohne Angabe der Tiernummer (19, beziehungsweise 72).

Heterozygote Tiere der Linie  $P_{hPax6}$ -tTA weisen eine erhöhte Mortalität auf. Mehrere Träger des Transgens verstarben nach 3 – 6 Monaten, darunter auch das Gründertier 72. Es konnte bislang keine Ursache für diese etwa um die Hälfte verkürzte Lebenserwartung ermittelt werden. Im Gehirn dieser Tiere wurden keine anatomischen Veränderungen festgestellt, und ihr Verhalten war unauffällig. Weitere Untersuchungen werden klären, ob das Transgen in dieser Linie in ein lebensnotwendiges Gen integriert ist und somit ein Positionseffekt vorliegt.

Beide  $P_{hPax6}$ -Linien lassen sich in  $Pax6^{Sey/Sey}$  einkreuzen. Dabei wurde keine Veränderung im Phänotyp der heterozygoten oder homozygoten Träger des Small-Eye-Allels beobachtet. Es tritt weder eine Rettung noch ein dominant negativer Effekt ein. Dies entspricht den Erwartungen, denn die verschiedenen Pax6-Mutanten, die nach der Paired-Domäne abbrechen, zeigen den vollen Small-eye-Phänotyp und haben keine dominant negativen Effekte (Callaerts et al. 1997; Singh et al. 1998).

Soweit untersucht, war bezüglich der Expression von Maus-Pax6 zwischen Kontrolltieren und  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Tieren kein Unterschied festzustellen. Die Transgene haben folglich keinen Effekt auf die genomische Pax6-Region. Dies hätte der Fall sein können, wenn beide Regionen durch ihre ähnlichen Kontrollelemente um limitierende transaktivierende oder -reprimierende Faktoren im Wettbewerb stünden.

**TRE-transgene Transreporter.** Nach den PCR-Genotypisierungsergebnissen wurden 4 Transgenträger der Linie TEDN erhalten und keine der Linie TEN. Die Gründertiere TEDN-40 und -43 wurden mit Wildtyp-CD1 verpaart. Die Transgenmerkmale wurden an die Nachkommen vererbt; das Transgen war also bei den Linien 40 und 43 in die Keimbahn integriert. Die weiteren PCR-positiven Linien TEDN-44 und -50 wurden noch nicht untersucht.

Zur funktionellen Überprüfung der Transreporterlinien TEDN-40 und -43 wurde je ein F1-Weibchen dieser Linien mit einem  $P_{hPax6}$ -tTA-Männchen (Transaktivator) verpaart. Die Funktionsfähigkeit des Transaktivator-Transgens war zuvor gezeigt worden (siehe Kapitel 3.4 „Darstellung neuronaler Wanderungen“). 3 Tiere wiesen sowohl die Transaktivator- als auch die Transreportermerkmale auf. Ihre Gehirne wurden im Adultstadium präpariert und in toto auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Dabei wurden keine fluoreszierenden Zellen gefunden. Die Zahl der Wiederholungen (3) ist noch zu gering, um eine Aussage über die Funktionsfähigkeit dieser Linien zu erlauben.

### 3.3 Expression von Pax6 und transgenem taulacZ während der Entwicklung

Bei den YAC-transgenen Mäuse ( $P_{hPax6}$ -taulacZ und  $P_{hPax6}$ -tTA) sollten während der Entwicklung des ZNS Reportergene in den Pax6-positiven Zellen exprimiert werden. Es wurde daher untersucht, ob in den transgenen Tieren die Expressionsmuster der Reportergene (taulacZ und tTA) mit dem von Pax6 übereinstimmen. Von besonderem Interesse war dabei der Verlauf der Expression während der Entwicklung.

Zunächst wurden die taulacZ-transgenen Mäuse untersucht, da sich bei diesen Tieren die Expression des Transgens mit der histochemischen X-Gal-Färbung einfach nachweisen lässt. tau-β-Galactosidase ist ein Fusionsprotein, das durch seinen tau-Anteil an Mikrotubuli gebunden ist. Es sollte daher in den Fortsätzen und im Soma von positiven Zellen lokalisiert sein. Die taulacZ-Tiere standen zu einem früheren Zeitpunkt der Arbeit zur Verfügung und konnten auch deshalb eingehender untersucht werden als die tTA-Mäuse.

Bei den tTA-Mäusen wurde die Expression durch Koexpression eines GFP-Reporterkonstrukts nachgewiesen. Diese wurden durch Gentransfer per Elektroporation eingeführt und die Expression des Reporters durch anschließende Kultur von ZNS-Gewebe erreicht. Die Lokalisierung von GFP wird von Lokalisierungssignalen in der GFP-Proteinsequenz, mittelbar also vom Reporterkonstrukt bestimmt. Es wurden sowohl nukleäre als auch cytoplasmatische Varianten von GFP eingesetzt.

Bei beiden Methoden wird die Anwesenheit eines funktionellen Proteins – des Enzyms β-Galactosidase beziehungsweise des Transkriptionsfaktors tTA – nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt in fixiertem (taulacZ) beziehungsweise lebendem (tTA) Gewebe. Neben diesen funktionellen Nachweismethoden wurde auch die Expression der mRNA für taulacZ beziehungsweise tTA durch In-situ-Hybridisierungen nachgewiesen. Bei den taulacZ-Tieren wurde außerdem mit Antikörpern gegen β-Galactosidase das Protein in immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen. Die Antikörperfärbung gibt eine deutlich bessere zelluläre Lokalisierung des Signals als die histochemische X-Gal-Färbung und ist zudem empfindlicher. Da sie jedoch wesentlich aufwändiger ist und die Zielsetzung dieser Arbeit auch mittels der schnelleren X-Gal-Färbung erreicht werden konnte, wurden nur vereinzelt Antikörperfärbungen angefertigt. Durch sie wurden keine zusätzlichen taulacZ-positiven Zellpopulationen gefunden, sondern nur solche, die auch in X-Gal-Färbungen positiv waren.

### 3.3.1 Deskriptive Methodik und Nomenklatur

Die Expression von tau-β-Galactosidase in  $P_{hPax6}$ -taulacZ transgenen Mäusen wird hier im Vergleich zu den – teilweise veröffentlichten – Expressionsmustern von Pax6-mRNA und Pax6-Protein beschrieben. X-Gal-Wholemout-Färbungen der Embryonalstadien E7.5, E8.5, E9.5, E10.5, E11.5, E12.5, E14.5, E16.5, E17.5, E18.5, Jungtieren am Tag der Geburt (P0) und an P7 sowie Adulttieren von transgenen  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen und Kontrolltieren wurden angefertigt. Sie wurden anschließend als Wholemounts sowie in sagittalen und frontalen Schnitten begutachtet. Schnitte wurden mit einem Vibratom (Vib.) und einem Gefriermikrotom (Cryo.) in unterschiedlichen Schnittdicken (SD) zwischen 20 und 200µm angefertigt. Beim qualitativen Vergleich der Expressionsstärke wurde die Schnittdicke berücksichtigt. Anhand der Färbungen der Kontrollen konnte endogene β-Galactosidase-Aktivität dargestellt werden.

Weiter wurden von E14.5, E18.5 und adulten Hirnen mRNA-In-situ-Hybridisierungen (ISHs) für Pax6 und taulacZ an Vibratomschnitten von transgenen und Wildtyp-Mäusen angefertigt und die Expressionsmuster der Pax6- und taulacZ-(lacZ-)mRNA mit der enzymatischen β-Galactosidase-Aktivität verglichen. Von einigen Geweben (E14.5 Cortex, adulte Retina und Kleinhirn) wurden Anti-β-Galactosidase-Antikörperfärbungen angefertigt. Neben dem im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Material wurden auch Maus- und Rattenschnitte aus der Kollektion von mRNA-ISHs und Pax6-immunhistochemischen Färbungen von D. Engelkamp (Dr. D. Engelkamp, Sammlung im Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main) zu Vergleichen herangezogen. Gezeigt werden typische Schnitte. Die Befunde wurden durch Analyse von anderen Schnittebenen sowie jüngeren und älteren Stadien bestätigt.

Deutsche, bzw. lateinische Bezeichnungen von Hirnstrukturen wurden, wo erforderlich, von den in der Primärliteratur verwendeten englischen Bezeichnungen abgeleitet und an die Nomenklatur beim Men-

schen angelehnt (Kahle 1991). Atlanten von histologischen Färbungen des sich entwickelnden ZNS der Maus und der Ratte wurden zur Identifizierung der jeweiligen Strukturen herangezogen (Kaufman 1992; Paxinos et al. 1994; Altman und Bayer 1995).

### 3.3.2 Rückenmark

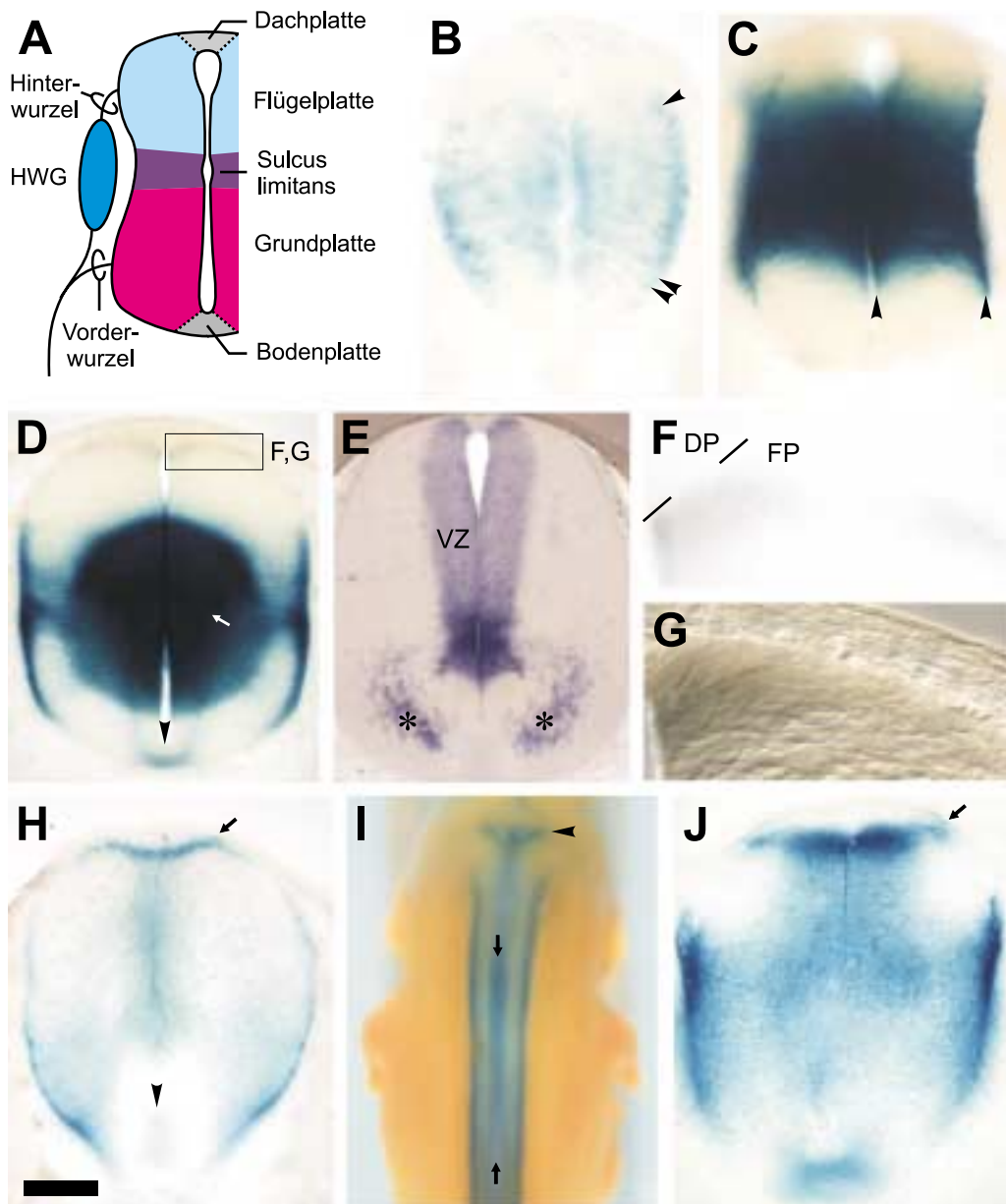
Pax6-mRNA wird ab E7.75 in der sich schließenden Neuralrinne exprimiert (Schubert et al. 1995; Walther und Gruss 1991). Da die Entwicklung des Rückenmarks von rostral nach caudal fortschreitet (Nornes und Das 1974), können ab E9 verschiedene Entwicklungsstadien von Rückenmarkssegmenten an unterschiedlichen Positionen der rostral-caudalen Achsen in einem Embryo untersucht werden. So wird Pax6 weiter caudal, wo sich die Neuralrinne noch nicht zum Neuralrohr geschlossen hat, nicht exprimiert (Walther und Gruss 1991). In  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen ist an E7.5 keine lacZ-Expression nachzuweisen (nicht gezeigt). Erstmals ab E8.5 wird  $\beta$ -Galactosidase als enzymatische Aktivität in X-Gal-Färbungen nachgewiesen (Abb. 18 B). Die Färbung tritt nur im geschlossenen Neuralrohr, nicht in der Neuralrinne auf (nicht gezeigt). Der Beginn der Expression von endogenem Pax6 und transgenem taulacZ erfolgt somit im Rückenmark in etwa zum selben Zeitpunkt.

Pax6 wird zunächst im gesamten Querschnitt des Neuralrohrs mit Ausnahme der am weitesten dorsal und ventral gelegenen Zellen exprimiert (Grindley et al. 1995; Walther und Gruss 1991). Dach- und Bodenplatte exprimieren zu keinem Zeitpunkt Pax6 (Walther und Gruss 1991). Transgene  $\beta$ -Galactosidase wird zunächst ebenfalls in allen Zellen außer denen der Dach- und Bodenplatte exprimiert (Abb. 18 B), und auch an E9.5 findet man in Dach- und Bodenplatte keine Expression (Abb. 18 C). taulacZ wird also wie Pax6 im frühen Rückenmark ausschließlich in Grund- und Flügelplatte exprimiert.

Ab E9 geht die Pax6-Expression im dorsalen Teil des Rückenmarks zurück, während die Expression in der Grundplatte stark bleibt. Es gibt keine scharfe Grenze der Expression, sondern einen graduellen Übergang (Walther und Gruss 1991; Ericson et al. 1997). Die Expression von transgener  $\beta$ -Galactosidase nimmt nach E8.5 sehr stark zu (vgl. Abb. 18 B mit C, D), wird aber dabei auf zentrale Bereiche eingeschränkt. Im dorsalen Teil geht die Größe des gefärbten Bereichs von E9.5 auf E11.5 zurück (vgl. Abb. 18 D mit B). Das bedeutet, dass die taulacZ-Expression in der Flügelplatte wie die von Pax6 reduziert wird.

Die X-Gal-Färbung lässt Rückschlüsse auf die Morphologie der exprimierenden Zellen zu. An E8.5 sind alle angefärbten Zellen von neuroepitheliale Charakter (Abb. 18 B). Das heißt, sie kontaktieren mit ihren Fortsätzen sowohl die basale (pia) als auch die apikale (ventrikuläre) Oberfläche (vgl. Abb. 18 A). An der basalen Oberfläche konzentriert sich die Färbung in Punkten (Pfeilspitzen in Abb. 18 B). An E9.5 können zwar keine einzelnen Zellen mehr identifiziert werden (Abb. 18 C), aber die Färbung ist weiterhin an den basalen und apikalen Oberflächen konzentriert. Dies wird besonders deutlich am ventralen Rand der Expressionsdomäne, wo die Färbung auf diese Bereiche der Zellen beschränkt ist (Pfeilspitzen in Abb. 18 C). Die Färbung der basalen Domäne verändert sich bis E12.5 nicht (vgl. Abb. 18 D, H). Betrachtung bei höherer Vergrößerung zeigt, dass basal keine Somata angefärbt sind (nicht gezeigt). Da die Somata der Pax6-mRNA-exprimierenden Zellen in der Ventrikulärzone liegen (Abb. 18 E) ist darauf zu schließen, dass hier Zellen von gestreckter Gestalt angefärbt sind, die von der apikalen bis an die basale Oberfläche reichen. Auf der Grundlage dieser Charakteristika handelt es sich um radiale Gliazellen.  $\beta$ -Galactosidase wird also zunächst in neuroepithelialen Zellen, später in radialen Gliazellen exprimiert.

Um den Zentralkanal des Rückenmarks werden bis E15.5 Pax6-positive Zellen gefunden. Es soll sich um Ependymzellen handeln (Walther und Gruss 1991). In der gesamten Flügelplatte wird  $\beta$ -Galactosi-



**Abb. 18: taulacZ-Expression im Rückenmark**

Vertikalschnitte von X-Gal-Färbungen (B-D, F-J), Pax6-mRNA-ISH (E). **A:** Schematische Darstellung der Längszonen des Rückenmarks. **B:** Ab E8.5 (SD: 30µm, Cryo.) wird taulacZ in der Grund- und Flügelplatte des Rückenmarks nachgewiesen. Die neuroepithelialen Zellen sind über ihre gesamte Ausdehnung angefärbt. Im basalen Abschnitt ist die Färbung in Punkten konzentriert (Pfeilspitzen). **C:** An E9.5 (SD: 100µm, Vib.) ist die Färbung kräftiger; einzelne Zellen lassen sich nicht unterscheiden. In schwach gefärbten Zellen sind die basalen und apikalen Abschnitte (Pfeilspitzen) am stärksten gefärbt, was auf einen gerichteten Transport von tau-β-Galactosidase dorthin schließen lässt. **D, E:** An E11.5 ist die Intensität der Färbung insgesamt zurückgegangen (D: SD: 100µm, Vib.). Außerhalb der Ventrikulärzone (VZ in E) sind keine Somata, sondern nur noch Fortsätze gefärbt. Pax6-exprimierende Zellen sind in der Ventrikulärzone lokalisiert (Pax6-ISH in E) sowie in einer ventralen Population (Sterne in E), die in der X-Gal-Färbung (D) jedoch nicht angefärbt ist. Die ventrale Kommissur (Pfeilspitze in D) ist angefärbt und läßt sich bis in die ventrale Flügelplatte verfolgen (Pfeil in D). **F, G:** Am dorsalen Rand der Flügelplatte (FP; vergrößert aus D) tritt eine schwache Expression in länglichen Zellen auf (F: DIC, G: Hellfeld). **H-J:** Die Expression ist an E12.5 weiter abgeschwächt (H, J: 30µm, Cryo.). In Pax6<sup>Sey/Sey</sup> (J) ist die Expression stärker als im Wildtyp (H). Lediglich in der dorsalen Flügelplatte hat sich die Expression verstärkt (Pfeile in H-J). Im Wholemount (I) ist die Kontinuität dieser angefärbten dorsalen Population durch das Rückenmark bis in die Medulla (Pfeilspitze) sichtbar. Balken: 37.5µm (B, F, G), 75µm (C), 150µm (D,J), 200 µm (E), 266.7µm (H), 1 mm (I).

dase-Aktivität an E12.5 in der Ventrikulärzone nachgewiesen (Abb. 18 H, vgl. E), wo sie auch an den folgenden Tagen noch beobachtet wird (nicht gezeigt). Die Anfärbung ist auch im dorsalen Teil der Flügelplatte vorhanden, wo keine subpiaie Anfärbung vorliegt, die für radiale Gliazellen charakteristisch ist. Möglicherweise handelt es sich also hier um die Pax6-positiven Ependymzellen.

Ab E11.5 exprimieren längliche Zellen am dorsalen Rand der Flügelplatte  $\beta$ -Galactosidase (Abb. 18 D, vergrößert in F, G). An E12.5 ist diese Expression noch verstärkt und in Wildtyp wie Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus gleichermaßen vorhanden (Abb. 18 H, J). Diese Zellpopulation (Pfeil in Abb. 18 I) steht in Kontinuität mit der Rautenlippe in der Medulla (Pfeilspitze in Abb. 18 I).

In den X-Gal-Färbungen ist an E11.5 und E12.5 die ventrale Kommissur angefärbt (Pfeilspitze in Abb. 18 D, H). Bei höherer Vergrößerung erkennt man, dass hier keine Zellsomata angefärbt sind (nicht gezeigt). Also besitzen einige  $\beta$ -Galactosidase-positive Zellen kommissurale Fortsätze. Kommissurale Projektionen sind für Pax6-positive Zellen des Rückenmarks bislang nicht beschrieben worden.

Eine nicht näher charakterisierte Gruppe von Zellen in der ventralen Intermediärzone, die sich radial von der Ventrikulärzone aus ausbreitet und im Vorderhorn niederlässt, exprimiert Pax6 von E12.5 bis mindestens E15.5 (Walther und Gruss 1991; Sterne in Abb. 18 E). Ob diese Zellen taulacZ exprimieren, kann anhand der X-Gal-Färbung nicht zweifelsfrei entschieden werden, da sie sich am ventralen Rand der angefärbten Radialgliafasern befinden. Jedenfalls kann ihre  $\beta$ -Galactosidase-Expression nicht sehr stark sein.

Mutante Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäuse sind in der X-Gal-Färbung kräftiger angefärbt als der Wildtyp, das Expressionsmuster entspricht aber weitgehend dem im Wildtyp (Abb. 18 J). In der Ausdehnung der subpiaien Färbung ist kein qualitativer Unterschied festzustellen. Die ventrale Kommissur ist wie im Wildtyp angefärbt. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass sowohl radiale Gliazellen als auch kommissurale Zellen in der Mutante  $\beta$ -Galactosidase exprimieren und in Bezug auf die in der X-Gal-Färbung darstellbaren Charakteristika mit dem Wildtyp vergleichbar sind.

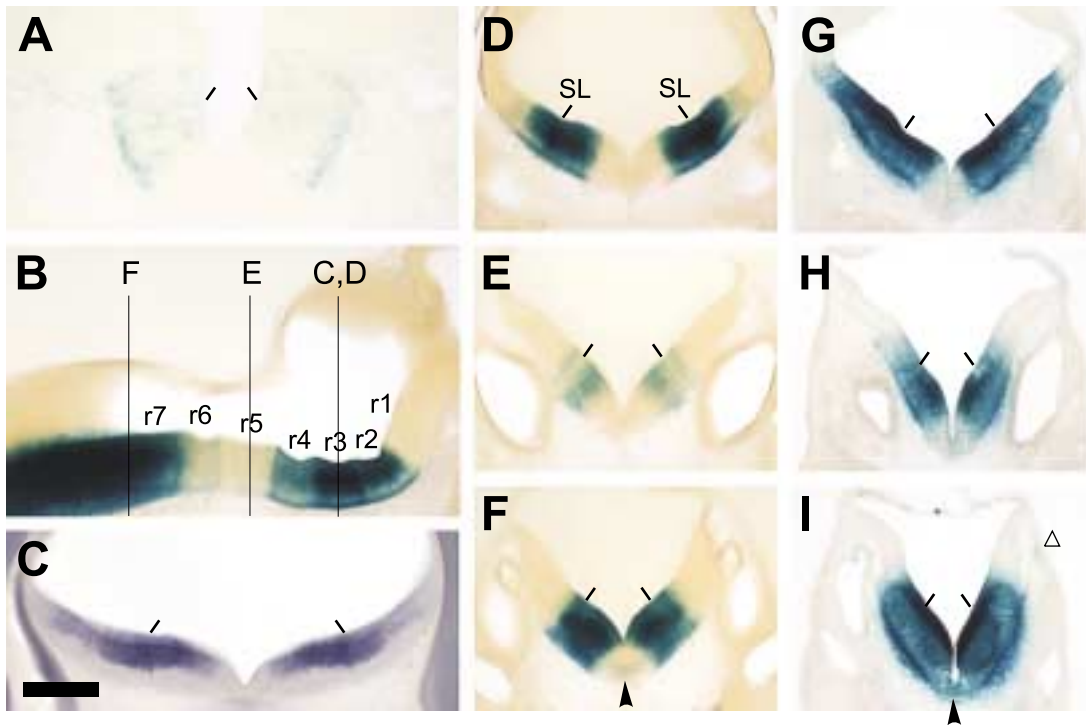
**Zusammenfassung (Rückenmark).**  $\beta$ -Galactosidase wird im geschlossenen Neuralrohr ab E8.5 nachgewiesen, kurz nach Beginn der Pax6-Expression an E7.75. Zunächst wird sie in Neuroepithelzellen, später in radialen Gliazellen der Grund- und Flügelplatte exprimiert. Einige der  $\beta$ -Galactosidase-exprimierenden Zellen entsenden Fortsätze in die ventrale Kommissur. Ab E11.5 exprimieren Zellen am dorsalen Rand der Flügelplatte Pax6 und zeitgleich  $\beta$ -Galactosidase. Die Expression von Pax6 und taulacZ verläuft im Rückenmark parallel in den selben Zellpopulationen, bis auf einige noch unklare Zellen in der ventralen Intermediärzone.

### 3.3.3 Medulla und Pons

**Endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.** Im Innenohr tritt ab E10.5 eine endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf (Dreiecke in Abb. 19 I, Abb. 20 B). Später weisen der Plexus choroideus der Rautengrube (in Wholemounds wegpräpariert) und die ventrale Mittellinie in der hinteren Medulla (Dreiecke in Abb. 22 B, C) eine endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf.

**Neuroepithelzellen und radiale Glia.** Die frühe Expression von Pax6 in der Medulla oblongata entspricht im wesentlichen der Expression im Rückenmark (Walther und Gruss 1991; Osumi et al. 1997). Pax6 wird an E10.5 und E11.5 mit Ausnahme von Rhombomer 1 (r1) in der Grund- und Flügelplatte aller Rhombomere exprimiert (Schubert et al. 1995). An den Rhombomergrenzen ist die Expression an E10.5 reduziert; einen halben Tag später an E11 ist die Expression gleichmäßig (Schubert et al. 1995). Im Hühnchen dagegen wird Pax6 in Rhombomergrenzen stark exprimiert. Hier ist das Pax6-Signal in fächerförmig angeordneten Zellen in der Ventrikulärzone lokalisiert. An dieser Position scheinen im Hühnchen verstärkt radiale Gliazellen vorzukommen (Heyman et al. 1995).

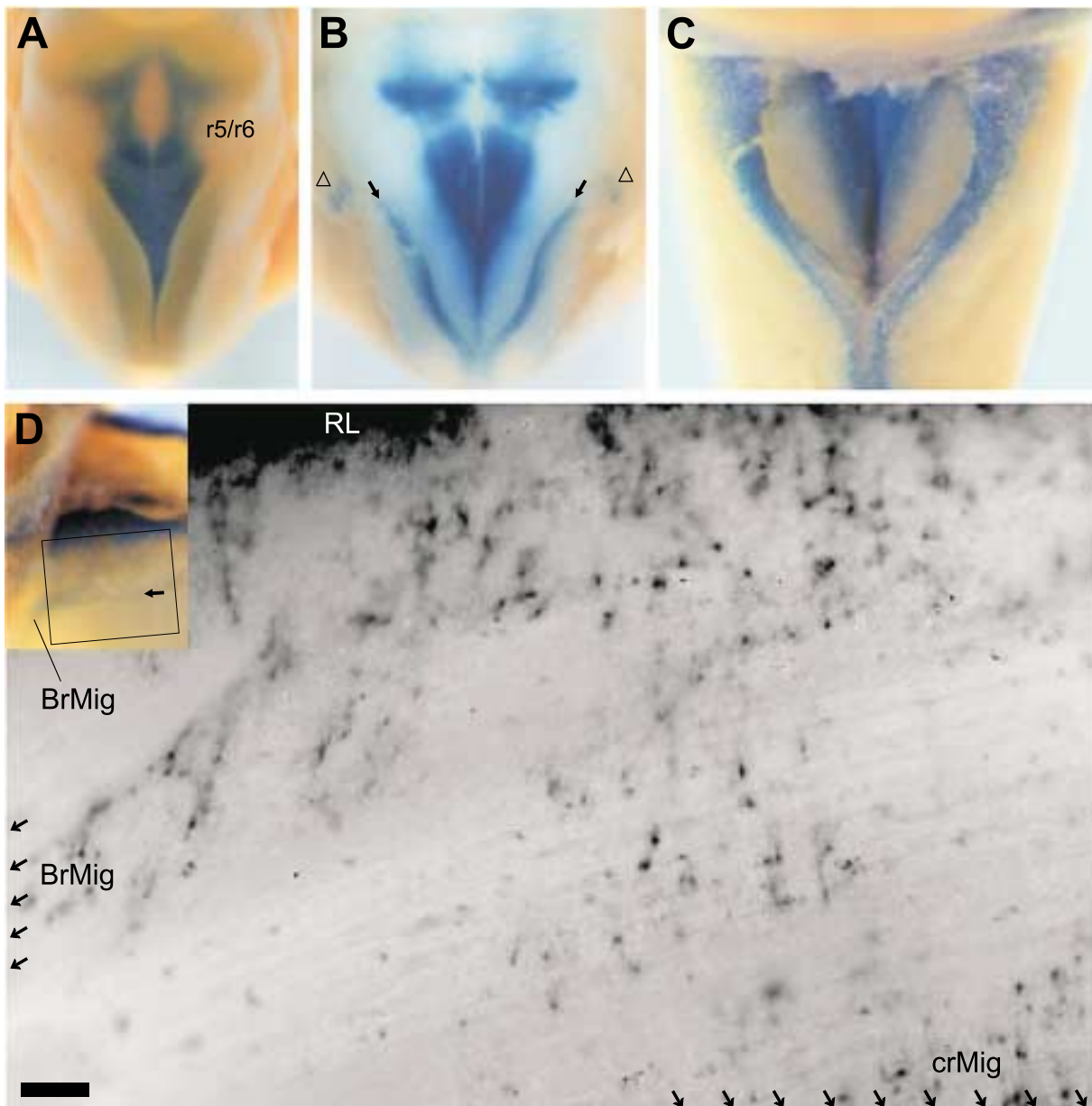




**Abb. 19: Frühe taulacZ-Expression in der Medulla**

X-Gal-Färbungen (A-B, D-I), Pax6-mRNA-ISH (C). Striche markieren den Sulcus limitans. **A:** Frontalschnitts etwa durch Rhombomer 3 (SD: 30µm, Cryo.). Ab E8.5 exprimieren neuroepitheliale Zellen der Medulla tau-β-Galactosidase. **B:** Parasagittaler Vibratomschnitt (SD: 100µm) der Medulla an E10.5. tau-β-Galactosidase wird in den Rhombomeren unterschiedlich exprimiert: stark in r2–r4 und ab r7, schwach in r5–r6, gar nicht in r1. **C:** Pax6-ISH (Frontalschnitt) auf Höhe von r2. Pax6 wird in der Marginalzone von Grund- und Flügelplatte exprimiert. **D–I:** Frontalschnitte der Medulla im Wildtyp (D–F, SD: 100µm, Vibr.) und in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus (G–I, SD: 30µm, Cryo.) auf Höhe der Rhombomere 3 (D, G), 5 (E, H) und 7 (F, I), wie in B eingezeichnet. Die Färbung erstreckt sich von der basalen bis zur apikalen Oberfläche. In r5 ist Färbung schwächer und die dorso-ventrale Ausdehnung des gefärbten Bereichs ist geringer. Ab r7 ist die ventrale Kommissur angefärbt (Pfeilspitzen in F, I). In Pax6<sup>Sey/Sey</sup> ist die Expression stärker und weiter nach dorsal ausgedehnt. Die Anfärbung des Innenohrs ist durch eine endogene β-Galactosidase-Aktivität bedingt (Dreieck in I). Balken: 50µm (A), 400 µm (B-I).

In  $P_{hPax6}$ -taulacZ Mäusen wird β-Galactosidase ab E8.5 in der vorderen Medulla (etwa r3, Abb. 19 A) und in der hinteren Medulla (nicht gezeigt, vgl. Rückenmark in Abb. 18 B) in neuroepithelialen Zellen der Grund- und Flügelplatte nachgewiesen. Der Beginn der Expression erfolgt somit zeitgleich mit der im Rückenmark. Zwischen den Expressionsdomänen in der vorderen und hinteren Medulla wird β-Galactosidase an E8.5 nicht exprimiert (nicht gezeigt). Diese Lücke markiert einen Bereich geringer Expression in der X-Gal-Färbung, der in der gesamten Embryonalentwicklung bestehen bleibt. In Sagittalschnitten an E10.5 ist erkennbar, dass der Bereich geringer Expression die Rhombomere r5 und r6 umfasst (Abb. 19 B). Er ist auch im Wholemount an E11.5 (Abb. 20 A), E12.5 (Abb. 20 B) und P0 (Abb. 22 B) eindeutig zu erkennen und kann hier als Orientierungsmarke dienen. In der Literatur wird die Expression von Pax6 als gleich stark in den verschiedenen Rhombomeren beschrieben (Schubert et al. 1995; Heyman et al. 1995). Durch In-situ-Hybridisierungen wird an E14.5 ebenfalls kein Hinweis auf eine differentielle Expression von Pax6 in den Rhombomeren ab r2 gefunden. Sogar lacZ-mRNA scheint gleichmäßig exprimiert zu sein (Beispiele für Pax6- und lacZ-ISHs in Abb. 21 E und F. Maßgeblich ist die zentrale ventrikuläre Expressionsdomäne). Allerdings ist die transversale Orientierung dieser Schnitte für einen direkten Vergleich nicht optimal. Subtile Unterschiede könnten in Sa-



#### Abb. 20: Externe Wanderungsströme von der Rautenlippe

X-Gal-Färbungen. Wholemouts. Kontrastverstärkung in D durch Subtraktion des Blau- und Rotkanals. **A:** An E11.5 sind nur Zellen am Boden der Rautengrube gefärbt, r4 und r5 nur schwach. **B:** E12.5. Kleinhirn, Pons und das Dach der Rautengrube wurden wegpräpariert, um einen Blick auf die Rautengrube zu ermöglichen. Zellen der Rautenlippe (Pfeile) am dorsalen Rands der Flügelplatte exprimieren tau- $\beta$ -Galactosidase. Dreiecke: endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität im Innenohr. **C, D:** E14.5. Das Dach der Rautengrube wurde entfernt. Die Rautenlippe (RL in D) exprimiert weiter stark tau- $\beta$ -Galactosidase. Längliche, bipolare Zellen der externen Wanderungsströme verlassen die Rautenlippe und spalten sich in den Brückenstrom (BrW) und den cuneoreticulären Strom (crW) auf. Neuronen beider Wanderungen werden im selben antero-posterio Abschnitt der Rautenlippe gebildet. Beide Neuronenklassen wandern zunächst von der Rautenlippe weg. Die Brückenstromneurone biegen nach kurzer Distanz nach anterior ab (Pfeil in D) und sammeln sich. Die cuneoreticulären Neurone faszikulieren nicht, sondern wandern einzeln. Balken: 750 $\mu$ m (A), 650 $\mu$ m (B), 500 $\mu$ m (C), 50 $\mu$ m (D).

gittalschnitten besser erkannt werden. Trotzdem scheint klar, dass die außerordentlich geringe Expression von  $\beta$ -Galactosidase in r5 und r6 eine Abweichung vom Pax6-Expressionsmuster darstellt. Da

lacZ-mRNA genau wie Pax6-mRNA gleichmäßig in den Rhombomeren exprimiert wird, könnte es sich um einen posttranskriptionellen Effekt handeln.

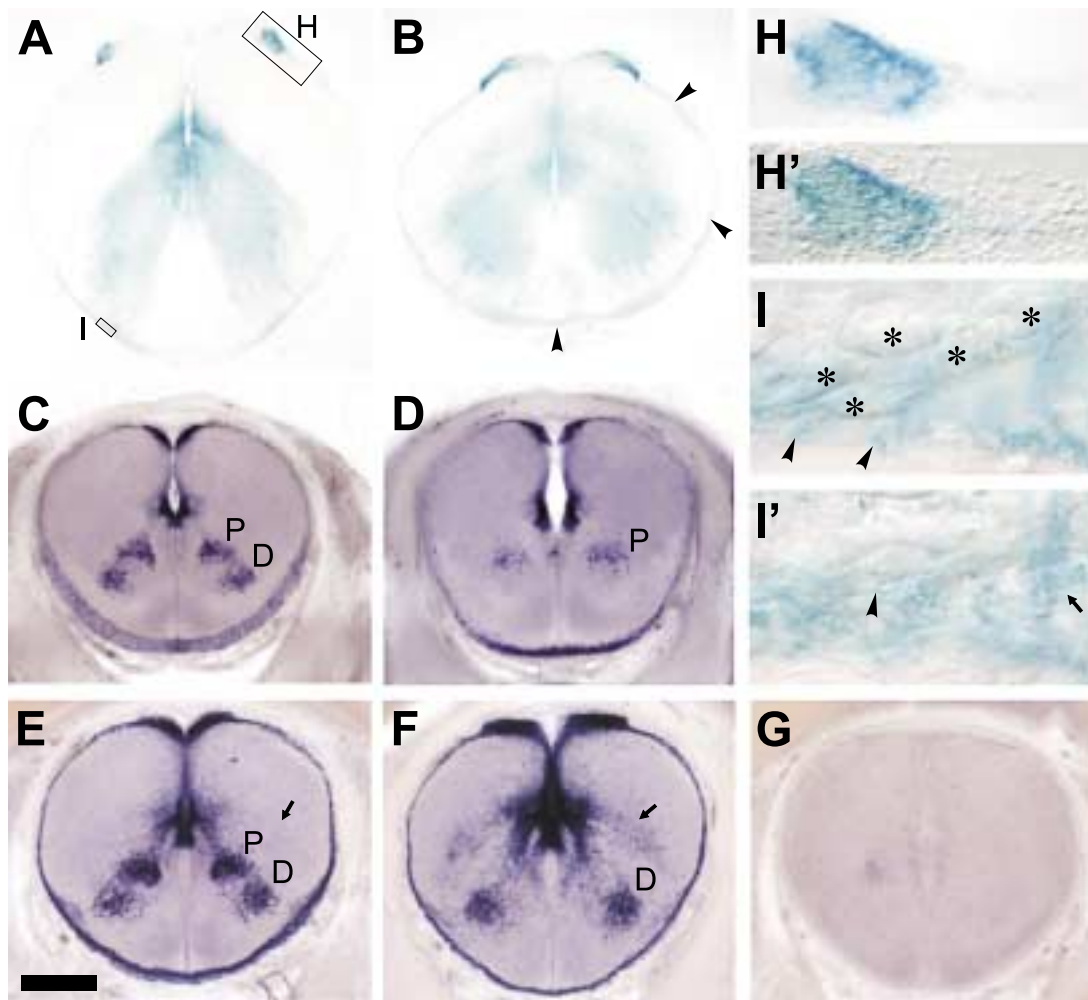
An E9.5 ist die X-Gal-Färbung an den Rhombomergrenzen reduziert (nicht gezeigt), in guter Übereinstimmung mit der Pax6-Expression (Schubert et al. 1995). Die geringe Expression an den Rhombomergrenzen ist jedoch vorübergehend, denn an E10.5 ist die X-Gal-Färbung innerhalb jedes Rhombomers gleichmäßig (Abb. 19 B). Auch Pax6-mRNA wird ab E11 gleichmäßig exprimiert (Schubert et al. 1995). Bezüglich der intrasegmentalen Verteilung der Expression besteht also kein Unterschied zwischen der Pax6- und der taulacZ-Expression.

In Transversalschnitten an E10.5 durch r3, r5 beziehungsweise r7 wird die dorsoventrale Verteilung der Expression deutlich (Abb. 19 D–F). Zellen beiderseits des Sulcus limitans (durch Striche markiert) exprimieren  $\beta$ -Galactosidase. Nach ventral besteht eine relativ scharfe Grenze der Expression etwa im unteren Drittel der Grundplatte. Nach dorsal ist die Grenze weniger scharf und befindet sich in den verschiedenen Rhombomeren an unterschiedlichen dorso-ventralen Positionen in der Flügelplatte. Im schwach exprimierenden Rhombomer 5 ist die Intensität der Färbung reduziert und der gefärbte Bereich etwas kleiner. Mit dem Pax6-mRNA-Expressionsmuster an E10.5 (Abb. 19 C) besteht eine gute Übereinstimmung. Auch an E14.5 ist dies der Fall, wie der Vergleich der Expression von  $\beta$ -Galactosidase (Abb. 21 A), Pax6-mRNA (Abb. 21 C, E) und taulacZ-mRNA (Abb. 21 F) in der Ventrikulärzone zeigt. Die dorso-ventrale Verteilung der Expression stimmt also zwischen Pax6 und transgenem taulacZ überein.

Bezüglich der Morphologie der X-Gal-exprimierenden Zellen gelten analog die für das Rückenmark gemachten Ausführungen.  $\beta$ -Galactosidase wird zunächst an E8.5 in neuroepithelialen Zellen (Abb. 19 A), ab E10.5 in radialen Gliazellen exprimiert (Abb. 19 B, D–F). In späteren Stadien sind die radialen Gliazellen weiter eindeutig in Schnitten (Abb. 21 A) und – zumindest ihre Endfüße – in Wholemounds (Abb. 22) zu identifizieren. Ein weiteres Argument dafür, dass es sich um radiale Gliazellen handelt, ergibt sich aus der subpialen Anfärbung an E14.5 (Abb. 21 I, I', Ausschnitt aus A), denn die stark angefärbten Endfüße (Pfeilspitzen) liegen außerhalb des kaum gefärbten cuneoreticulären Wandlungsstrom (Sterne). In mehr oder weniger regelmäßigen Abständen treten Faszikel von radialen Gliazellen auf (Pfeil in Abb. 21 I'). Diese könnten für die streifenförmige Anfärbung der ventralen Oberfläche der Pons an P0 verantwortlich sein (Pfeilspitzen in Abb. 22 C, D). Unter Berücksichtigung der oben gezeigten Übereinstimmung der Pax6- und der taulacZ-Expression wird geschlossen, dass Pax6 und taulacZ auch in der Medulla zunächst in Neuroepithelzellen, dann in radialen Gliazellen exprimiert werden. In der taulacZ-mRNA-ISH (Abb. 21 F) ist die ventrikuläre Färbung entlang des Verlaufs der radialen Gliazellen zentrifugal ausgedehnt. Möglicherweise wird taulacZ-mRNA aufgrund des tau-Anteils auch in die Peripherie transportiert. Im Telencephalon werden ähnliche Färbemuster gefunden (siehe unten). Einige Pax6-negative Zellen in der Intermediärzone scheinen schwach tau- $\beta$ -Galactosidase zu exprimieren (vgl. Pfeil in Abb. 21 F mit E).

In der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mutanten ist die Färbung an E10.5 deutlich stärker als im Wildtyp (vgl. Abb. 19 G–I mit D–F). Wie im Wildtyp ist sie jedoch in r5 und r6 reduziert (Abb. 19 H). Die Expressionsdomäne ist in allen Rhombomeren in der Flügelplatte nach dorsal und in der Grundplatte nach ventral ausgedehnt. Eine subpiale Färbung lässt auf die Anfärbung von radialen Gliazellen auch in der Mutante schließen.

**Rautenlippe und externe Wanderungen.** In der unteren Rautenlippe und später im vorderen präzerebellären Neuroepithel wird Pax6 ab E12.5 stark exprimiert (Engelkamp et al. 1999). Die Expression von  $\beta$ -Galactosidase in der Rautenlippe beginnt an E12.5 (Pfeile in Abb. 20 B). Einen Tag zuvor, an E11.5, ist die Rautenlippe noch nicht gefärbt (Abb. 20 A). An E14.5 ist die Färbung der Rautenlippe sehr auffällig (Abb. 20 C, D) und bleibt es während der restlichen Embryogenese (nicht gezeigt). Die

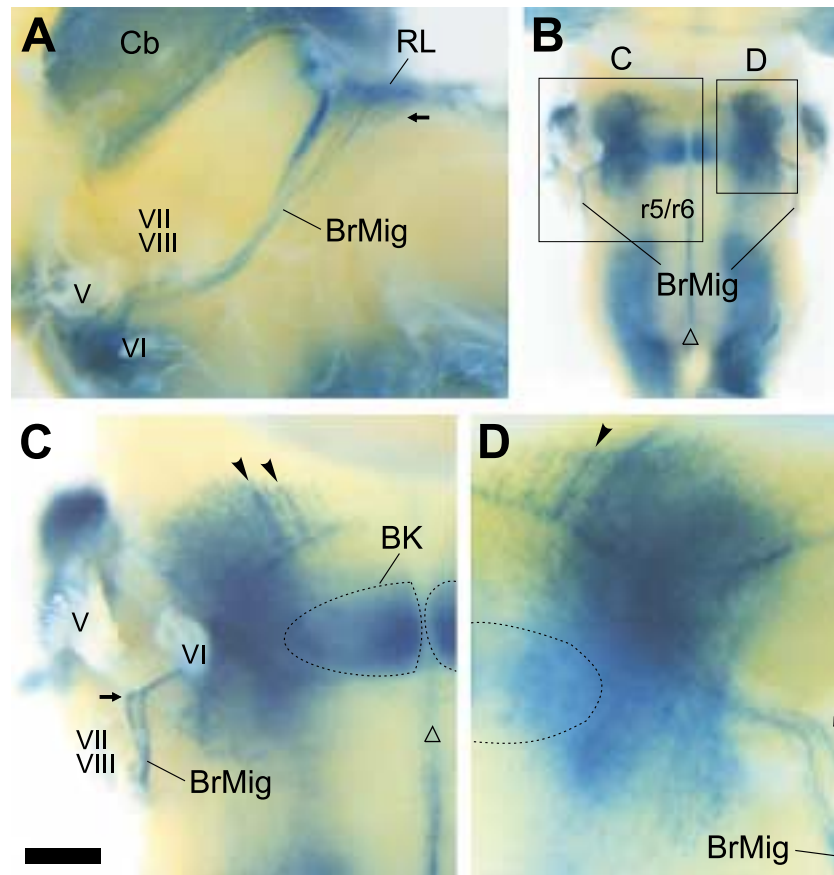


**Abb. 21: Medulla und cuneoreticulärer Strom**

X-Gal-Färbungen (SD 30µm, Cryo.: A, B, H-I), Pax-mRNA-ISH (C-E), lacZ-mRNA-ISH (F, G). **A, B, H, I:** Längliche Zellen in der Rautenlippe exprimieren tau-β-Galactosidase [A, vergrößert in H (Hellfeld) und H' (DIC)]. Eine starke Anfärbung in der ventralen Hälfte scheint von radialen Zellen herzurühren. Bei hoher Vergrößerung (I, I': zwei Focus-Ebenen) zeigt sich, dass diese Zellen an der pialen Oberfläche Endfüße ausbilden, die stark gefärbt sind (Pfeilspitzen in I, I'). Teilweise sind die radialen Zellen faszikuliert (Pfeil in I'). Bipolare Zellen des cuneoreticulären Stroms sind im Wildtyp (A, Sterne in I) kaum angefärbt, in Pax6<sup>Sey/Sey</sup> dagegen während ihrer ganzen Wanderung rings um die Medulla (Pfeilspitzen in B). **C-E:** In der Pax6-ISH sind neben den Nuclei von ventrikulären Zellen (vermutlich die radialen Gliazellen) und Zellen der Rautenlippe und des cuneoreticulären Stroms auch zwei Populationen (P, D in C) von ventralen Zellen angefärbt (C). Die distale Population (D) fehlt in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus (D). Zwischen der Pax6-Expression im Wildtyp (C) und in der *P<sub>hPax6</sub>*-taulacZ-Maus (E) ist kein Unterschied feststellbar. **F:** taulacZ-mRNA wird von den meisten Pax6-positiven Zellen in der *P<sub>hPax6</sub>*-taulacZ-Maus exprimiert (F). Die proximale Population (P) exprimiert Pax6 (E), aber kein taulacZ (F). Außerhalb der Ventrikulärzone exprimieren einige Pax6-negative Zellen schwach taulacZ (Pfeil in F, vgl. E). **G:** In nicht-transgenen Kontrollen wird lacZ-mRNA nicht nachgewiesen. Balken: 400µm (A-G), 75µm (H, H'), 12.5µm (I, I').

Rautenlippe ist auch an P0 noch gefärbt, zu einen Zeitpunkt also, an dem die meisten wandernden Neuronen sie bereits verlassen haben (RL in Abb. 22 A). Zwischen der Expression von Pax6 und taulacZ in der Rautenlippe besteht also eine gute Übereinstimmung.

Die Zellen in der Rautenlippe sind von gestreckter, neuroepithelialer Gestalt. Die Färbung konzentriert sich an ihren basalen und apikalen Enden (Abb. 21 H, H').



**Abb. 22: Brückenstrom und Brückenkerne**

X-Gal-Färbung. **A:** seitliche und **B-D:** ventrale Ansicht des Rautenhirns an P0. Junge Neurone verlassen die Rautenlippe (RL) in einem breiten Abschnitt. Die hinteren biegen nach kurzer Distanz nach anterior ab (Pfeil in A) und wandern in mehreren Faszikeln als Brückenstrom (BS) nach ventral. Der Brückenstrom verläuft rings um die Medulla, zwischen den Nn. facialis/vestibulocochlearis (VII/VIII) und abducens (VI) hindurch und biegt vor dem N. trigeminus (V) nach ventral ab. Die Neurone erreichen dann den ipsilateralen Brückenkern (BK). Bei den Längs- und Querrichtung angeordneten Streifen rostral der Brückenkerne handelt es sich um die Endfüße von radialen Gliazellen (Pfeilspitzen in C, D). Entlang der Mittellinie der Medulla liegt eine endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität vor (Dreieck in C). Kleinhirn (Cb). Balken: 500 $\mu$ m (A), 1mm (B), 400 $\mu$ m (C), 300 $\mu$ m (D).

In den beiden externen präzerebellären Wanderungsströmen von der unteren Rautenlippe, dem Brückenstrom und dem cuneoreticulären Strom, exprimieren die wandernden Zellen weiterhin Pax6. Erst mit dem Erreichen ihrer Zielgebiete schalten die Neurone die Expression von Pax6 aus. In den Brückenkernen scheinen die ankommenden Neuronen einen Reifungsprozess zu durchlaufen, bei dem sie tiefer in das Gewebe wandern (und von später ankommenden Neuronen überlagert werden) und dabei Zug um Zug die Pax6-Expression reduzieren (Engelkamp et al. 1999). In beiden externen Wanderungsströmen sind an E14.5 Zellen in der X-Gal-Färbung angefärbt; dies ist im Wholemount (Abb. 20 D) deutlicher als in Schnittpräparaten (Abb. 21 A, I, I'). Entsprechend wird sowohl in der Rautenlippe als auch in den beiden Wanderungsströmen lacZ-mRNA nachgewiesen (Abb. 21 F und nicht gezeigt), äquivalent zur Pax6-mRNA-Expression (Abb. 21 E). Der Austritt der wandernden Neurone erfolgt in einem breiten Abschnitt der Rautenlippe. Die Neurone haben eine längliche, bipolare Morphologie, die für wandernde Neuronen typisch ist (Abb. 20 D, siehe auch mit Stern markierten Zellen in Abb. 21 I). Kurz nach Verlassen der Rautenlippe spalten sich Brückenstrom (BrW) und cuneo-reticulärer Strom (crW) auf, indem die Brückenstromneurone nach rostral abbiegen und sich im

Brückenstrom sammeln (Pfeil in Abb. 20 D). Die Neurone des cuneoreticulären Stroms (crW) faszikulieren dagegen kaum, sondern wandern einzeln auf breiter Front nach ventral (Abb. 20 D), über die Mittellinie und zu den kontralateralen Nuclei cuneatus lateralis und reticularis lateralis (nicht gezeigt). An E16.5 haben alle Neurone des cuneoreticulären Stroms ihre Zielgebiete erreicht und die Pax6-Expression ausgeschaltet (D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten). Sie werden in der X-Gal-Färbung an E18.5 entsprechend nicht mehr nachgewiesen (Abb. 22 A). Der Brückenstrom besteht dagegen noch (BrW in Abb. 22): Er verläuft rings um die Medulla, zwischen den Nervi facialis/vestibulocochlearis (VII/VIII; in r4) und abducens (VI) hindurch und biegt vor dem Nervus trigeminus (V; in r2) nach ventral ab. Die Neurone erreichen dann den ipsilateralen Brücken Kern (BK). Während der ganzen Wanderung und nach der Ankunft im Brücken Kern exprimieren die Neurone  $\beta$ -Galactosidase. In der mRNA-ISH ist zwischen lacZ- und Pax6-mRNA in dieser Wanderung sowohl an E14.5 als auch an E18.5 kein Unterschied in der Expression festzustellen (nicht gezeigt). Es besteht somit eine sehr hohe Übereinstimmung im Expressionsverlauf zwischen Pax6 und taulacZ in  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen in wandernden Neuronen beider externer präzerebellärer Wanderungsströme.

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ist die Zahl der Zellen im Brückenstrom und in den Brücken Kernen auf weniger als 10% des Wildtypniveaus reduziert (Engelkamp et al. 1999). An E14.5 und E18.5 ist der Brückenstrom in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen in der X-Gal-Färbung angefärbt; er ist dünner als im Wildtyp und die Brückenkerne sind an E18.5 deutlich kleiner als im Wildtyp (nicht gezeigt). Der cuneoreticuläre Strom ist in homozygoten Mutanten stark desorganisiert; zahlreiche Zellen werden um die Mittellinie herum angetroffen (D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten). In der X-Gal-Färbung ist er an E14.5 stärker als im Wildtyp und während seines ganzen Verlaufs angefärbt, auch beim Kreuzen der Mittellinie (Pfeilspitzen in Abb. 21 B). taulacZ wird also auch in den externen Wanderungsströmen der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäuse exprimiert.

**Weitere Zellpopulationen.** Wie im Rückenmark gibt es auch in der hinteren Medulla Pax6-positive Zellen in der Intermediärzone der Grundplatte. Sie bilden hier eine proximale (p) und eine distale (d) Population (Abb. 21 C). Sie sind bislang nicht beschrieben. Nach ihrer Lage sind sie der Formatio reticularis zuzurechnen. Beide Populationen werden in Kontrolltieren und in  $P_{hPax6}$ -taulacZ transgenen Mäusen in Pax6-mRNA-ISHs angefärbt (Abb. 21 C, E). lacZ-mRNA wird jedoch nur von der distalen Population exprimiert (Abb. 21 F). In der X-Gal-Färbung ist diese distale Population nicht eindeutig zu identifizieren, denn sie liegt inmitten der angefärbten radialen Gliafasern (Abb. 21 A). Sofern sie eine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität aufweist, ist diese nur gering. An E18.5 wird Pax6-mRNA nur noch in wenigen, verteilten Zellen in dieser Region exprimiert, und lacZ-mRNA weiterhin nur in einer, hauptsächlich distal gelegenen Teilmenge dieser Zellen (nicht gezeigt). Von den zwei Pax6-positiven Populationen in der Formation reticularis der Medulla exprimiert somit nur die distale taulacZ.

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ist ebenfalls nur eine Population Pax6-positiv; diese liegt an vergleichbarer Position wie die proximale Population des Wildtyps (Abb. 21 D). lacZ-mRNA-Expression wurde in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen nicht untersucht, und in der X-Gal-Färbung ist wie im Wildtyp wegen der starken Anfärbung von radialen Gliazellen in diesem Bereich keine eindeutige Identifikation möglich.

An E10.5 bilden einige Zellen in der hinteren Medulla eine kommissurale Projektion aus (Pfeilspitze in Abb. 19 F). Dies ist für Pax6-exprimierende Zellen bislang nicht beschrieben. Die Kommissur ist an E11.5 noch angefärbt; die Färbung verläuft im Horizontalschnitt gleichförmig ab r7 ins Rückenmark hinein, ohne ein segmentales Muster aufzuweisen (nicht gezeigt). Ab E12.5 tritt die kommissurale Anfärbung nicht mehr auf (nicht gezeigt). Die Lage der Somata der kommissuralen Zellen kann in den X-Gal-Färbungen nicht bestimmt werden. Auch in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus ist die ventrale Kommissur ab r7 angefärbt. Unter den Pax6- und taulacZ exprimierenden Zellen der Ventrikulärzone sind somit auch solche, die eine kommissurale Projektion ausbilden.

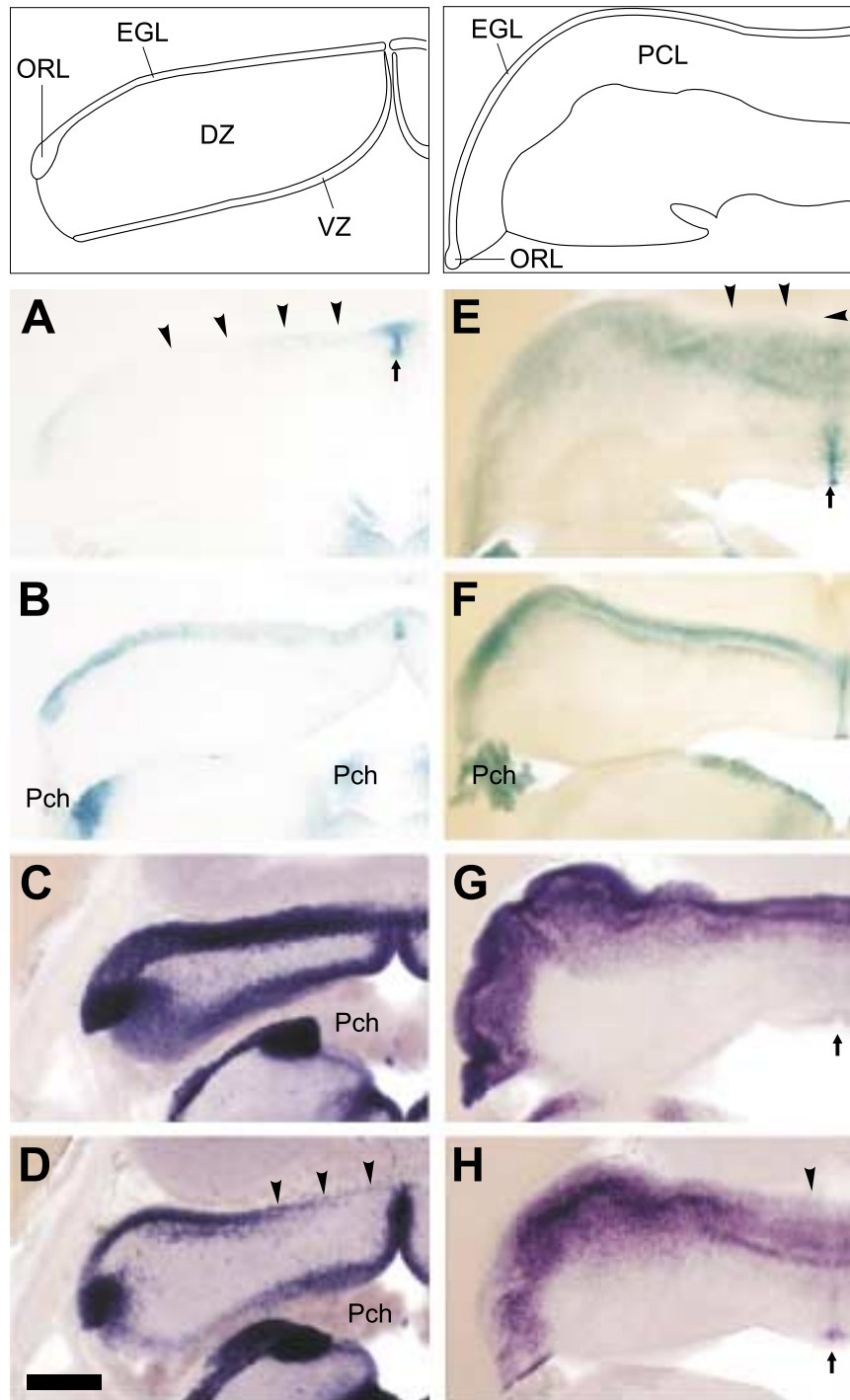
**Zusammenfassung Medulla und Pons.** Wie im Rückenmark wird  $\beta$ -Galactosidase in der Medulla ab E8.5 exprimiert. Sie wird in r2 und caudal davon in Neuroepithelzellen, später in radialen Gliazellen der Grund und Flügelplatte exprimiert. Zunächst wird  $\beta$ -Galactosidase an den Rhombomergrenzen nicht exprimiert (E9.5), später (E10.5) dagegen im jeweiligen Rhombomer gleichmäßig. In r5 und r6 ist die  $\beta$ -Galactosidase-Expression stark reduziert, obwohl in lacZ-mRNA-ISHs kein Unterschied zu den anderen Rhombomeren sichtbar ist. Die Rautenlippe exprimiert ab E12.5 stark  $\beta$ -Galactosidase. In den beiden externen Wanderungsströmen des präzerebellären Systems, dem cuneoreticulären Strom und dem Brückenstrom, wird  $\beta$ -Galactosidase bis zum Erreichen der Zielgebiete exprimiert. In der *Formatio reticularis* der Medulla wird taulacZ nur in der distalen der beiden Pax6-positiven Populationen exprimiert. Pax6- und taulacZ-Expression verlaufen in der Medulla parallel mit zwei Ausnahmen: In r5 und r6 wird  $\beta$ -Galactosidase nur schwach exprimiert, und in der proximalen Population der *Formatio reticularis* fehlt taulacZ ganz. taulacZ-Expression wird in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen in den selben Zelltypen wie im Wildtyp gefunden.

### 3.3.4 Kleinhirn

**Endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.** Der Plexus choroideus (PCh) weist eine sehr starke endogene  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf (Abb. 23 B, F), die auch in Wildtyp-Mäusen auftritt (nicht gezeigt). Dass seine Anfärbung nicht durch taulacZ bedingt ist, wird durch die lacZ-mRNA-ISH bestätigt, bei der der Plexus nicht angefärbt ist (Abb. 23 D).

**Tiefe Schichten.** Pax6 wird an E13 in der Ventrikulärzone der Kleinhirnanlage exprimiert (Stoykova und Gruss 1994). Auch  $\beta$ -Galactosidase wird an E14.5 in der Ventrikulärzone nachgewiesen, allerdings nur schwach und in den mehr medialen Teilen (Abb. 23 A). Genau in der Mitte, wo die beiden Hemisphären aneinander stoßen, ist die Färbung besonders kräftig (Pfeil in Abb. 23 A). lacZ-mRNA wird jedoch wie Pax6-mRNA in der gesamten Ventrikulärzone gleichmäßig exprimiert (Abb. 23 C, D; der lacZ-Schnitt liegt weiter anterior. Mediale Teile der EGL und laterale Teile der VZ sind in ihm nicht mehr erfasst). In der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus ist die Färbung etwas kräftiger, aber in den selben Regionen lokalisiert (Abb. 23 B). An E18.5 existiert keine Ventrikulärzone mehr. Pax6-exprimierende Zellen werden in den verschiedenen Schichten des cerebellären Cortex gefunden (Abb. 23 G). lacZ-mRNA und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität werden in äquivalenten Bereichen nachgewiesen (Abb. 23 E, H). In der Mutanten ist die Färbung auf Zellen in Höhe der Purkinje-Zellschicht konzentriert und nicht so verteilt wie im Wildtyp. In den Pax6-positiven Zellen des Kleinhirns, die aus der Ventrikulärzone stammen, wird taulacZ in etwa wie Pax6 exprimiert.  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität tritt erst verzögert nach der lacZ-mRNA auf.

**Oberfläche.** Die Oberfläche des Kleinhirns wird in der Entwicklung von Körnerzellvorläufern bedeckt, die aus der oberen Rautenlippe stammen und Pax6 von ihrer Entstehung (etwa E13.5) an exprimieren, mit einem Expressionsmaximum zwischen E17 und P2 (Engelkamp et al. 1999). Körnerzellen exprimieren nach ihrer Einwanderung in die tieferen Schichten des Kleinhirns weiterhin Pax6, auch im Adultstadium (Stoykova und Gruss 1994).  $\beta$ -Galactosidase-Expression wird etwa ab E13.5 in der oberen Rautenlippe in X-Gal-Färbungen nachgewiesen (nicht gezeigt). An E14.5 sind die Körnerzellvorläufer in der oberen Rautenlippe schwach angefärbt (Abb. 23 A). Sie haben zu diesem Zeitpunkt bereits die gesamte Oberfläche des Kleinhirns bedeckt. In der Pax6-mRNA-ISH sind sie entsprechend angefärbt (Abb. 23 C). Allerdings exprimieren sie  $\beta$ -Galactosidase nur in unmittelbarer Nähe der Rautenlippe (Abb. 23 A); der größte Teil der EGL ist nicht angefärbt (Pfeilspitzen in Abb. 23 A), was auch durch Analyse bei höherer Vergrößerung bestätigt wird (nicht gezeigt). lacZ-mRNA wird in der gesamten EGL nachgewiesen (Abb. 23 D; mediale Anteile sind in diesem Schnitt nicht enthalten, jedoch auf einem benachbarten Schnitt angefärbt). An E18.5 wird in der gesamten EGL weder  $\beta$ -Galactosidase noch lacZ-mRNA nachgewiesen (Pfeilspitzen in Abb. 23 E, H), während Pax6-



### Abb. 23: Kleinhirn

X-Gal-Färbungen (A, B, E, F), Pax6-mRNA-ISHs (C, G) und lacZ-mRNA-ISHs (D, H). **A-D:** E14.5. Im Wildtyp (A) wird tau-β-Galactosidase in der medialen Neuroepithelschicht (NE, Pfeil in A) und in der oberen Rautenlippe (oRL) nachgewiesen. Die äußere Körnerzellschicht (EGL) ist nur in der Nähe der oberen Rautenlippe angefärbt. In der *Pax6<sup>Sey/Sey</sup>*-Maus (B) ist die X-Gal-Färbung deutlich kräftiger; die EGL ist hier gleichmäßig angefärbt, und auch in der Neuroepithelschicht ist eine Färbung vorhanden. Pax6-mRNA wird im Wildtyp im Neuroepithel (NE), in verstreuten Zellen der Differenzierungszone (DZ) und in der EGL exprimiert (C). Die Expression von lacZ-mRNA (D) entspricht der von Pax6. Der Schnitt in D liegt anterior zu dem in C gezeigten. Die EGL ist daher im medialen Teil nicht mehr getroffen (Pfeilspitzen in D). lacZ-mRNA ist also auch in den EGL-Zellen nachzuweisen, obwohl sie in der X-Gal-Färbung im Wildtyp nicht angefärbt sind. Im Plexus choroideus (PCh) liegt eine starke endogene β-Galactosidase-Aktivität vor. **E-H:** An E18.5 ist Färbung im Wildtyp kräftiger (E). In der EGL ist eine subpiaie Schicht nicht angefärbt (Pfeilspitzen in E), tiefere Anteile dagegen schon. In der *Pax6<sup>Sey/Sey</sup>*-Maus (F) ist die EGL komplett angefärbt. Die Purkinje-Zellschicht (PCL) ist sowohl im Wildtyp als auch in der Mutanten angefärbt. Der Vergleich von Pax6- (G) und lacZ-ISH (H) zeigt, dass in der subpiaie Schicht der EGL auch keine lacZ-mRNA exprimiert wird. Einige Zellen an der Mittellinie sind in der X-Gal-Färbung stark angefärbt (Pfeil in E). Sie exprimieren lacZ- und Pax6-mRNA (Pfeile in G und H). Balken: 300µm (A-D), 400 µm (E-H).



mRNA weiterhin exprimiert wird (Abb. 23 G). Diese Expressionsmuster legen den Schluss nahe, dass Körnerzellvorläufer zunächst taulacZ exprimieren, diese Expression jedoch zwischen E14.5 und E18.5 ausgeschaltet wird. Außerdem wird  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nur in den EGL-Zellen nachgewiesen, die in der Nähe der Rautenlippe liegen. taulacZ wird also nicht so dauerhaft wie Pax6 in den Körnerzellvorläufern exprimiert. Außerdem folgt die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nicht streng dem Muster der lacZ-mRNA, sondern ist verzögert.

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ist die EGL verdickt. Die EGL-Zellen sind dichter gepackt. Bis zur Geburt bilden sich keine Fissuren und Folia aus, wodurch die Oberfläche des Kleinhirns glatter als im Wildtyp ist (Schmahl et al. 1993). In der X-Gal-Färbung ist in der Mutanten die EGL sowohl an E14.5 als auch an E18.5 im Gegensatz zum Wildtyp deutlich angefärbt (Abb. 23 B, F). taulacZ-Expression wird demnach in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen in der EGL anders reguliert als im Wildtyp.

**Zusammenfassung Kleinhirn.** Etwa ab E13.5 wird  $\beta$ -Galactosidase in der Ventrikulärzone und an der Oberfläche des Kleinhirns exprimiert, in guter Übereinstimmung mit der Pax6-Expression. Auch im weiteren Verlauf der Entwicklung exprimieren die Zellen aus der Ventrikulärzone  $\beta$ -Galactosidase weitgehend parallel zu Pax6. Die Körnerzellen an der Oberfläche des Kleinhirns schalten die Expression von  $\beta$ -Galactosidase jedoch vorzeitig aus.

### 3.3.5 Mesencephalon

An E9.5 wird Pax6 im Mesencephalon nicht exprimiert. Ab E10.5 exprimiert ein Zellstreifen im ventralen Mesencephalon Pax6. Dieser setzt sich bis ins caudale Prätektum (p1) fort (Schubert et al. 1995; Mastick et al. 1997). Die Lage dieser Zellen entspricht etwa den ventralen Intermediärzonenzellen im Rückenmark (Abb. 18 E). In  $P_{\text{hpax6}}$ -taulacZ-Mäusen wird dagegen im Mesencephalon zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine derartige  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität oder taulacZ-mRNA nachgewiesen (vgl. Abb. 25 B, C). An E14.5 und E18.5 sind die ventralen Mesencephalon-Zellen auch in der  $P_{\text{hpax6}}$ -taulacZ-Maus für Pax6-mRNA positiv, auf benachbarten Schnitten jedoch taulacZ-negativ (nicht gezeigt). Ein bisher nicht beschriebener Streifen schwach Pax6-mRNA-positiver Zellen verläuft an E14.5 in der ventralen Ventrikulärzone vom Mesencephalon bis in das Prosencephalon. Diese Zellen sind auch taulacZ-mRNA-positiv, geben in der X-Gal-Färbung jedoch kein Signal (nicht gezeigt). Im Mesencephalon exprimiert die ventrale Pax6-positive Intermediärzellpopulation kein taulacZ, während spätere Ventrikulärzonenzellen taulacZ exprimieren.

### 3.3.6 Prosencephalon

An E8.0 wird Pax6 in einer breiten Domäne des Prosencephalons exprimiert. In der Bodenplatte wird Pax6 nicht exprimiert (Walther und Gruss 1991; Grindley et al. 1995). In der X-Gal-Färbung ist das  $P_{\text{hpax6}}$ -taulacZ-Prosencephalon erst ab E9.5 angefärbt (vgl. Abb. 28 A), an E8.5 noch nicht (nicht gezeigt). Ab E8.75 treten innerhalb des Prosencephalons Unterschiede im Pax6-Expressionsniveau auf, mit Regionen starker Expression rostral des Mesencephalons und um die Augenbläschen herum (Grindley et al. 1997).  $\beta$ -Galactosidase wird in der Region um das Augenbläschen exprimiert (Abb. 28 A), in der Region rostral des Mesencephalons jedoch nicht (nicht gezeigt). Die Pax6-Expression geht im Verlauf der weiteren Entwicklung im Prosencephalon zurück. Postmitotische Neuronen exprimieren Pax6 meist nicht mehr. taulacZ-Expression beginnt im Prosencephalon also mindestens 1 Tag später als Pax6, dann aber in den selben Regionen.

Pax6 und  $\beta$ -Galactosidase werden im gesamten Prosencephalon in einem Streifen von ventrikulären Zellen der Mittellinie exprimiert, die mit den schwach Pax6-exprimierenden Zellen in der ventralen Ventrikulärzone des Mesencephalons in Verbindung stehen. Dieser Expressionsstreifen ist durchgän-

gig von p1 bis p6 von E12.5 (nicht gezeigt) bis mindestens E18.5 (sichtbar in Prätektum und Hypothalamus in Abb. 26 C und Abb. 27 C, D; im dorsalen Thalamus verläuft die Expression in benachbarten Schnitten). In der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus tritt dieser Streifen bereits an E12.5 deutlich auf (Abb. 25 F–H). Da nur die Ventrikulärzone angefärbt ist, könnte es sich bei diesen Zellen um Ependymzellen ohne radiale Fortsätze handeln. Eine derartige Expression wird in der Literatur bisher nicht beschrieben. In einer Negativkontrolle, der mRNA-ISH von Wildtyp-Mäusen mit lacZ, ist dieser Streifen nicht angefärbt (nicht gezeigt).

### 3.3.6.1 Diencephalon

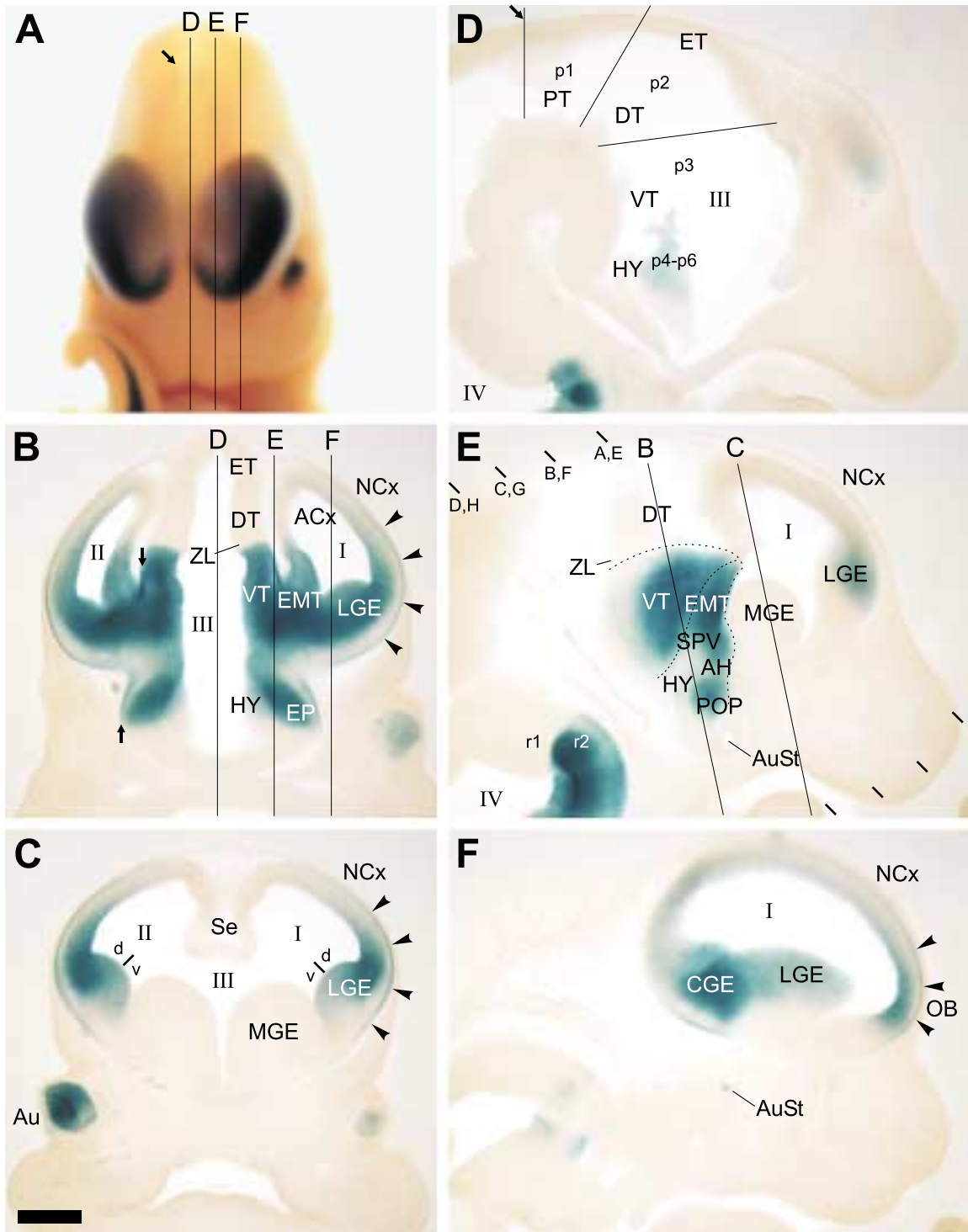
An E9.5 wird Pax6 im gesamten Diencephalon im Neuroepithel der Flügelplatte exprimiert. Zum Mesencephalon hin gibt es eine scharfe Grenze der Expression (Mastick et al. 1997). Später wird die Expression von Pax6 in einigen Regionen des Diencephalons beschränkt (besonders im dorsalen Thalamus/p2), während sie in anderen Regionen zunimmt (Mastick et al. 1997). Das Expressionsmuster im Diencephalon an E10.5 (nicht gezeigt) entspricht etwa dem an E11.5 (Abb. 24).  $\beta$ -Galactosidase wird zunächst hauptsächlich im ventralen Thalamus (p3) exprimiert (Abb. 28 A).

**Prosomer 1 (Prätektum).** An E10.5 wird Pax6 in der Ventrikulärzone des Prätektums weiterhin stark exprimiert. Die meisten postmitotischen Zellen schalten die Expression hingegen aus. So sind die Somata der Projektionsneurone der hinteren Kommissur Pax6-negativ. Eine Ausnahme bilden Zellen in der ventralen Intermediärzone des caudalen Prätektums, die in Zusammenhang mit Pax6<sup>+</sup>-Zellen auf gleicher Höhe im Mesencephalon stehen (Schubert et al. 1995; Mastick et al. 1997). Pax6-Expression wird an E11.5 in p1 weiter eingeschränkt: Zellen an der Grenze zum Mesencephalon und zu p2 exprimieren weiter stark Pax6-mRNA, während dazwischen liegende Zellen die Expression reduzieren (Grindley et al. 1997).

In der X-Gal-Färbung werden erst ab E11.5 im Prätektum schwach positive Zellen nachgewiesen (Pfeile in Abb. 24 A und D). Diese liegen dorsal beidseits der Mittellinie an der Grenze zum Mesencephalon und sind somit in ihrer Lage und dem Zeitpunkt ihres Auftretens, aber auch in ihrer Morphologie mit den Zellen am dorsalen Rand der Flügelplatte im Rückenmark und den Zellen der Rautenlippe vergleichbar. Diese Zellen liegen direkt unterhalb der posterioren Kommissur (nicht gezeigt), entsenden jedoch keine kommissuralen Axone (Mastick et al. 1997). Die Expression in diesen Zellen ist an E12.5 im Wildtyp (Abb. 25 A) und in der Mutante (Abb. 25 F) noch etwas stärker. Bis E18.5 wird  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in diesen Zellen nachgewiesen (Abb. 26 C, D). Pax6-positive Zellen an der Grenze zu p2 werden erst an E12.5  $\beta$ -Galactosidase-positiv (Abb. 25 A, B), also über 4 Tage nach Beginn der Pax6-Expression im Prosencephalon an E8.0.

Die ventralen Intermediärzonenzellen des caudalen Prätektums exprimieren – wie diejenigen des ventralen Mesencephalons – in der  $P_{\text{hpax6}}$ -taulacZ-Maus an E14.5 und E18.5 Pax6-mRNA, jedoch keine lacZ-mRNA und werden auch nicht mit X-Gal angefärbt (nicht gezeigt).

**Prosomer 2 (Dorsaler Thalamus, Epithalamus).** Im Prosumer 2 wird die Expression von Pax6, die an E9.5 noch stark ist, ab E10.5 deutlich reduziert und auf den dorsal gelegenen Epithalamus beschränkt (Mastick et al. 1997). Der Epithalamus, aus dem die Epiphyse hervorgeht, exprimiert Pax6 während der gesamten Embryonalentwicklung (Walther und Gruss 1991).  $\beta$ -Galactosidase wird jedoch an E11.5 und davor im Epithalamus nicht exprimiert (nicht gezeigt). Erst an E12.5, über 4 Tage nach Beginn der prosencephalen Pax6-Expression, ist eine  $\beta$ -Galactosidase-Expression vorhanden (nicht gezeigt), die aber schnell wieder zurückgeht: An E14.5 exprimieren nur noch wenige Zellen im Dach des Epithalamus schwach  $\beta$ -Galactosidase (nicht gezeigt). An E18.5 sind keine  $\beta$ -Galactosidase-exprimierenden Zellen mehr im Epithalamus vorhanden (nicht gezeigt), Pax6-mRNA wird jedoch in der  $P_{\text{hpax6}}$ -taulacZ-Maus im Epithalamus exprimiert (Abb. 27 C). taulacZ wird in p2 erst mehrere Tage



**Abb. 24: Prosencephalon an E11.5**

X-Gal-Färbung. **A:** Wholemount, **B, C:** frontale und **D–F:** sagittale Schnitte (SD: 100µm, Vib.) zur Veranschaulichung der Lage verschiedener Regionen des Prosencephalons. Die Lage der Schnittebenen ist in B und E eingezeichnet. Beschreibung im Text. Balken: 700µm (A), 400 µm (B-F).

nach Beginn der Pax6-Expression und dann nur im Epithalamus exprimiert. Die Expression geht auch schneller zurück als die von Pax6.

**Prosomer 3 (Ventraler Thalamus).** Pax6 wird an E10.5 im Neuroepithel des ventralen Thalamus (VT) stark exprimiert (Walther und Gruss 1991) und von einigen postmitotischen Zellen an der pialen Oberfläche (Mastick et al. 1997). Zur Zona limitans intrathalamica (ZL) hin, die selbst kein Pax6 exprimiert, bildet sich bis E12.5 durch die starke Expression von Pax6 eine scharfe Grenze (Stoykova et al. 1996).  $\beta$ -Galactosidase wird ab Beginn der prosencephalen Expression im ventralen Thalamus exprimiert (nicht gezeigt). An E11.5 ist die Färbung sehr kräftig und scharf zum dorsalen Thalamus abgegrenzt (Abb. 24 B, E). Sie erstreckt sich über alle Schichten des ventralen Thalamus. Die frühe Expression von taulacZ entspricht in p3 somit der von Pax6.

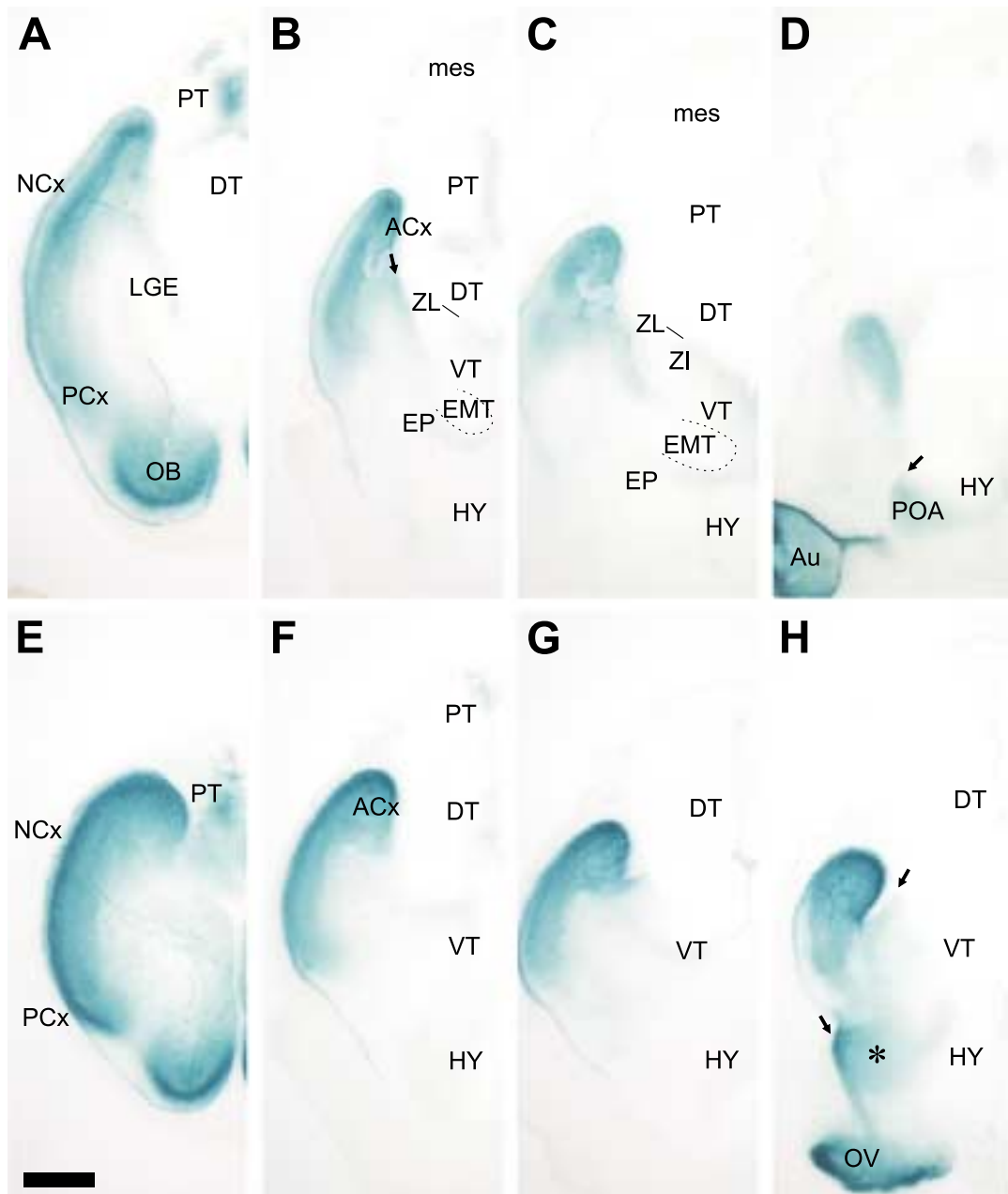
An der pialen Oberfläche des ventralen Thalamus sind Endfüße radialer Gliazellen angefärbt (oberer Pfeil in Abb. 24 B). Dies wird durch Analyse bei höheren Vergrößerungen bestätigt (nicht gezeigt). Eine subpiale X-Gal-Färbung ist hier auch an E12.5 (Pfeil in Abb. 25 B), E14.5 und E18.5 vorhanden (beides nicht gezeigt). Da die Population der lacZ-mRNA-exprimierenden Zellen an E14.5 (nicht gezeigt) und an E18.5 eine Teilmenge der Pax6-mRNA-exprimierenden Zellen ist (vgl. Abb. 27 D mit C), deutet dies darauf hin, dass radiale Gliazellen im ventralen Thalamus Pax6-positiv sind, oder zumindest ein Teil von ihnen. Auch in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus sind im ventralen Thalamus subpiale Endfüße angefärbt (oberer Pfeil in Abb. 25 H und nicht gezeigt).

An E15.5 ist die Expression im ventralen Thalamus reduziert; Pax6 wird noch in der Zona incerta am dorsalen Rand von p3 exprimiert. Hier wird es auch an E18.5 noch gefunden (Walther und Gruss 1991; vgl. Abb. 27 C). Ein Teil des ventralen Nucleus des seitlichen Kniehöckers (VLG) scheint von Pax6-exprimierenden Zellen gebildet zu werden, die ab E14.5 bis E18.5 durch die Zona incerta (ZI) vom Ventrikel her einwandern (Stoykova et al. 1996). Diese Zellen exprimieren  $\beta$ -Galactosidase an E12.5 (Abb. 25 C: ZI), E14.5 (nicht gezeigt) und an E18.5 (Abb. 26 C). In der lacZ-mRNA-ISH sind diese Zellen ebenfalls angefärbt (Abb. 27 D). Es besteht eine gute Übereinstimmung der Pax6- und taulacZ-Expression in Zellen des ventralen Thalamus, die durch die Zona incerta in den ventralen seitlichen Kniehöcker einwandern.

Am ventralen Rand von p3 befindet sich eine Gruppe von dopaminergen Zellen („A13“ nach Hokfelt et al. 1984; Jacobowitz und Abbott 1998), die Pax6 von E9.5 bis P9 exprimiert (Mastick und Andrews 2001; Vitalis et al. 2000). Ob diese Zellen  $\beta$ -Galactosidase exprimieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mit Sicherheit ermittelt werden.

Auch in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen exprimiert der ventrale Thalamus Pax6-mRNA. Die Wanderung zum ventralen seitlichen Kniehöcker fehlt jedoch (Stoykova et al. 1996). Ventrale Teile von p3 scheinen sich nach dorsal auszudehnen, während dorsale Anteile, zum Beispiel die Zona incerta, reduziert werden; dies wird durch veränderte Expressionsmuster von Dbx, Dlx2 und Wnt7B nahegelegt (Grindley et al. 1997). Eine wichtige Rolle scheint jedoch auch eine regionale Verzögerung der Entwicklung in der Zona incerta zu haben. So wird in der Mutanten Pax6-Expression noch an E14.5 im gesamten ventralen Thalamus gefunden, und nicht nur in seinem caudalen Anteil, auf den im Wildtyp die Expression eingeschränkt wird (Warren und Price 1997).  $\beta$ -Galactosidase-Expression ist an E12.5 auch in der Mutanten im ventralen Thalamus vorhanden (Abb. 25 F–H). Da der gesamte ventrale Thalamus gleichmäßig angefärbt ist, ließen sich einzelne Zellbänder wie die Wanderung in den ventralen lateralen Kniehöcker, sofern überhaupt vorhanden, nicht identifizieren. Die Expression bleibt stark und gleichmäßig auch an E14.5 (nicht gezeigt) und E18.5 (Abb. 26 D).

**Zusammenfassung Diencephalon.** Im Diencephalon weicht die Expression von  $\beta$ -Galactosidase deutlich von der Pax6-Expression ab. In den Prosomeren 1 und 2 wird  $\beta$ -Galactosidase erst an E11.5 beziehungsweise E12.5 eingeschaltet, während Pax6 hier ab E8.0 exprimiert wird. Lediglich in Prosumer 3 wird  $\beta$ -Galactosidase kurz nach Pax6 ab E9.5 in einer breiten Domäne exprimiert, die in der weiteren Entwicklung eingeschränkt wird. In radialen Gliazellen und in Zellen, die zum ventralen



**Abb. 25: Prosencephalon an E12.5**

X-Gal-Färbungen von Wildtyp (A–D) und *Pax6<sup>Sey/Sey</sup>*-Maus (E–H). Frontalschnitte (SD: 30µm, Cryo.). Die Lage der Schnittebenen ist in Abb. 24 E eingezeichnet. Beschreibung im Text. Balken: 400µm.

Nucleus des seitlichen Kniehöckers wandern, wird  $\beta$ -Galactosidase bis E18.5 exprimiert. In Prosomer 2 exprimiert der Epithalamus transient  $\beta$ -Galactosidase. In Prosomer 1 sind einige Zellen am dorsalen Rand der Flügelplatte sowie ein Band zur Grenze mit p2  $\beta$ -Galactosidase positiv. In *Pax6<sup>Sey/Sey</sup>*-Mäusen sind weitgehend die selben Zellen  $\beta$ -Galactosidase-positiv; in Prosomer 3 ist die Expression in der Mutanten stärker und gleichmäßiger.

### 3.3.6.2 Hypothalamus

In der Flügelplatte des Hypothalamus ist die Expression von Pax6 teilweise komplementär zur Expression der Homöoboxgene Dlx-1 und Dlx-2 (Stoykova et al. 1996). An E12.5 wird Pax6 in der sogenannten „Zona optoeminentialis“ exprimiert. Mit diesem Begriff werden die Area postoptica posterior (POP), der vordere Hypothalamus (AH), die Area supraoptica/paraventricularis (SPV), die Eminentia thalami (EMT) und die Eminentia ganglionaris caudalis (CGE) zusammengefasst, in denen Dlx-1 und Dlx-2 nicht exprimiert werden (Bulfone et al. 1993). Pax6 wird in der Zona optoeminentialis in der Ventrikulärzone, teilweise im gesamten Neuroepithel exprimiert. Auch  $\beta$ -Galactosidase wird in dieser Zone exprimiert, wie an E11.5 illustriert wird [Abb. 24 F (CGE), E (EMT, SPV, AH, POP)]. Wegen der subpialen Anfärbung im Hypothalamus scheinen hier auch radiale Gliazellen  $\beta$ -Galactosidase zu exprimieren (unterer Pfeil in Abb. 24 B). An E14.5 ist die Expression von Pax6 in der Zona optoeminentialis zurückgegangen. Auch die subpiale X-Gal-Anfärbung ist, anders als im ventralen Thalamus, an E18.5 nicht mehr festzustellen (nicht gezeigt). In der Zona optoeminentialis stimmt die Expression von taulacZ gut mit der von Pax6 überein.

Vom Ventrikel ausgehend ist im Hypothalamus eine Population von Zellen Pax6-positiv, die zum Nucleus entopeduncularis (EP) gerichtet ist. Es könnte sich um einen Strom wandernder Zellen handeln. Im Nucleus entopeduncularis wird Pax6 an E14.5, E15.5, E18.5 und P6 noch exprimiert (Stoykova et al. 1996; Valverde et al. 2000). Diese Zellen exprimieren  $\beta$ -Galactosidase an E11.5 (Abb. 24 B: gefärbtes Band vom Ventrikel zum EP) und E12.5 (Abb. 25 C). Hier sind auch  $\beta$ -Galactosidase-exprimierende radiale Gliazellen vorhanden (unterer Pfeil in Abb. 24 B und Pfeil in Abb. 25 D). An E18.5 sind Zellen des Nucleus entopeduncularis weiterhin Pax6-mRNA-positiv (Abb. 27 C), exprimieren jedoch keine lacZ-mRNA (Abb. 27 D) und sind auch in der X-Gal-Färbung nicht angefärbt (Abb. 26 C und nicht gezeigt). Die Expression von taulacZ in der Wanderung zum Nucleus entopeduncularis stimmt anfänglich mit der von Pax6 überein. taulacZ wird jedoch in diesen Zellen früher ausgeschaltet als Pax6.

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen treten ab E12.5 Musterbildungsdefekte im Hypothalamus auf. Pax6<sup>Sey</sup>-mRNA wird in der Zona optoeminentialis nicht nachgewiesen. Die scharfen Expressionsgrenzen von Dlx1 um die Zona optoeminentialis werden verwischt; die Expressionsdomäne von Dlx1 weitet sich aus. Der Nucleus entopeduncularis fehlt in der Mutanten. Ab E14.5 sind in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen die Regionen, die im Wildtyp aus der Zona optoeminentialis hervorgehen, deutlich unterentwickelt. An E18.5 ist dieser Phänotyp noch verstärkt. Der Nucleus entopeduncularis und der Wanderungsstrom zu ihm fehlen. Pax6 ist daher für ihre Spezifizierung notwendig (Stoykova et al. 1996). In der X-Gal-Färbung ist zu erkennen, dass in der Mutante der Hypothalamus an E12.5 verändert ist. So fehlt die Expression in der Area preoptica anterior (POA in Abb. 25 D) in der Mutante (Abb. 25 H). Eine auf radiale Gliazellen hindeutende subpiale Anfärbung ist jedoch vorhanden (unterer Pfeil in Abb. 25 H), und im caudalen Hypothalamus sind alle Schichten angefärbt (Stern in Abb. 25 H). Auch in der Mutanten wird taulacZ in Pax6-positiven Zellpopulationen des Hypothalamus exprimiert.

**Zusammenfassung Hypothalamus.** tau- $\beta$ -Galactosidase wird im Hypothalamus weitgehend wie Pax6 exprimiert. Radiale Gliazellen exprimieren  $\beta$ -Galactosidase von E11.5 bis E14.5. In der Wanderung zum Nucleus entopeduncularis wird  $\beta$ -Galactosidase anfänglich wie Pax6 exprimiert, jedoch früher als Pax6 ausgeschaltet. Auch in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mutanten wird  $\beta$ -Galactosidase im Hypothalamus stark exprimiert.

### 3.3.6.3 Telencephalon

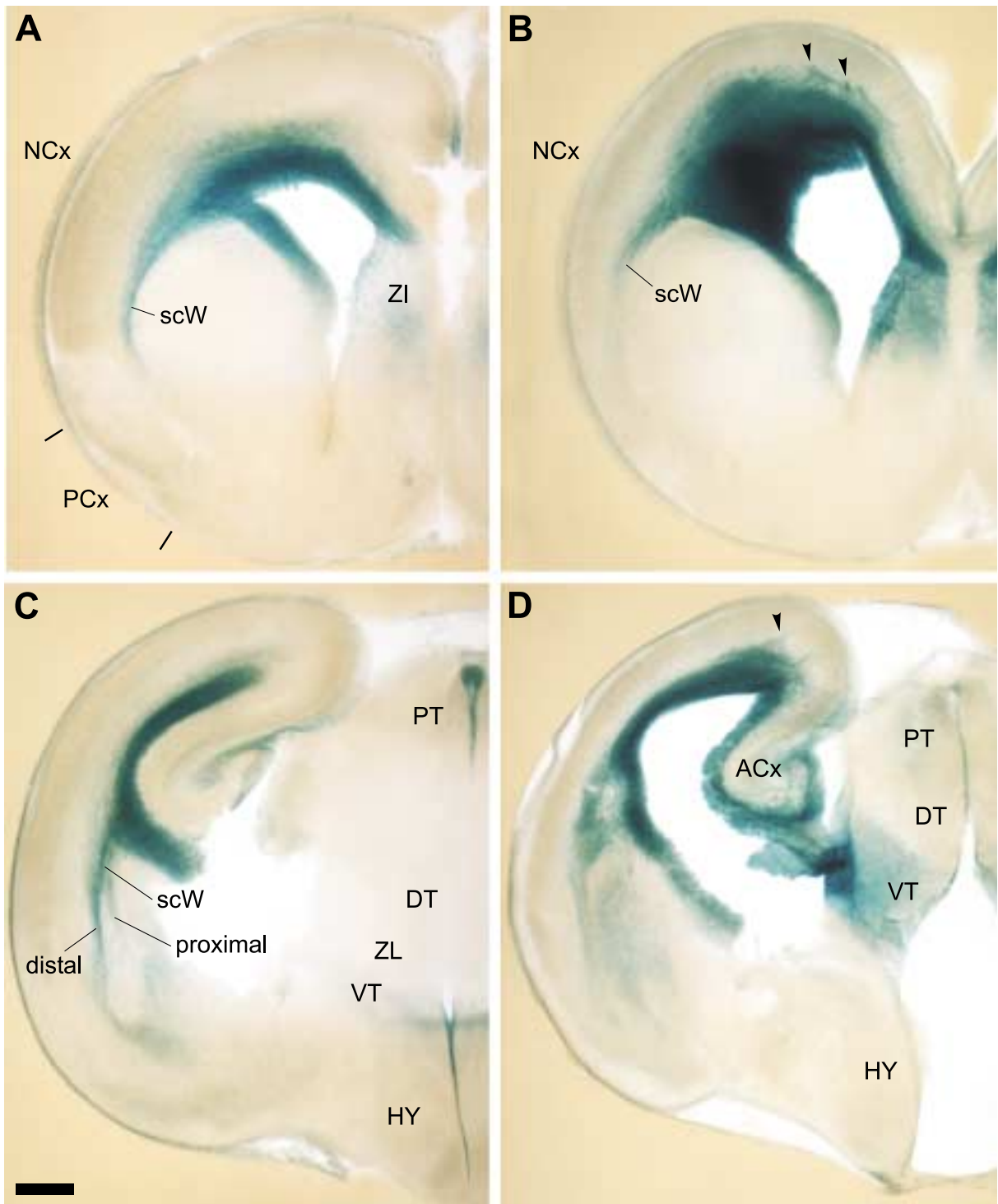
Ab E10.5 wird Pax6 im Telencephalon stark exprimiert (Walther und Gruss 1991), an E12.5 im proliferativen Neuroepithel des gesamten Palliums. Diese Expression dauert bis mindestens E18.5 an.

Die Expression wird weitgehend auf Zellen in der Ventrikulär- und der Subventrikulärzone beschränkt. Die meisten Zellen, die aus diesen Zonen in die oberen Schichten des Cortex wandern, exprimieren Pax6 nicht (Stoykova et al. 1996). In der Eminentia ganglionaris lateralis (LGE) wird Pax6 an E10.5 differenziert exprimiert: in der dorsalen LGE (dLGE) wird es stark, in der ventralen LGE (vLGE) schwächer exprimiert (Yun et al. 2001). In X-Gal-Färbungen wird  $\beta$ -Galactosidase ab E10.5 im Telencephalon nachgewiesen, am stärksten in ventralen und lateralen Anteilen (nicht gezeigt). Die Anlage der Eminentia ganglionaris lateralis exprimiert an E10.5  $\beta$ -Galactosidase, die der Eminentia ganglionaris medialis (MGE) dagegen nicht (nicht gezeigt). An E11.5 hat sich die Expressionsdomäne über das gesamte Pallium ausgebreitet und verstärkt; es besteht weiterhin ein Gradient mit hoher Expression ventrolateral und geringerer Expression dorsomedial (Abb. 24). Innerhalb der LGE gibt es eine starke Anfärbung in der dorsalen LGE, eine schwächere in der ventralen LGE (Abb. 24 C). Es besteht also eine hohe Übereinstimmung zwischen den frühen Expressionsdomänen von Pax6 und taulacZ an E10.5 und E11.5.

Der Großteil der radialen Gliazellen des Palliums exprimiert Pax6 von E13.5 bis E17.5 (Götz et al. 1998). In der X-Gal-Färbung sind die an E10.5 angefärbten Zellen zunächst von neuroepithelialer Morphologie, das heißt, alle Somata erstrecken sich von der ventrikulären bis zur pialen Oberfläche und sind vollständig angefärbt (nicht gezeigt, vgl. Abb. 18 A). Ab E11.5 tritt eine subpiale Anfärbung von Endfüßen auf (Pfeilspitzen in Abb. 24 B, C, F), die sich von lateral nach medial ausbreitet. Diese Färbung fällt während der gesamten Embryonalentwicklung auf (vgl. Abb. 25, Abb. 26). Sie tritt nur in Bereichen auf, wo  $\beta$ -Galactosidase exprimiert wird. An der subpialen Oberfläche beispielsweise der MGE fehlt die Färbung (Abb. 24 C). In der LGE ist die subpiale Färbung im dorsalen Teil stärker als im ventralen (Abb. 24 C). Die Anfärbung der glialen Endfüße erreicht ihr Maximum zwischen E14.5 und E16.5 (nicht gezeigt) und nimmt danach ab. An E18.5 ist die subpiale Färbung wieder etwas schwächer (Abb. 26). Entlang der pallial-subpallialen Grenze verlaufen radiale Gliazellen in einer dicken Schicht („gliale Palisade“; Edwards et al. 1990). Entlang dieser Fasern wandern Neuronen und Glia von der cortikalen Ventrikulärzone zu ventrolateralen und ventralen Palliumabschnitten („seitliche cortikale Wanderung“; scW; Bayer et al. 1991). Dieses Faserbündel ist in der X-Gal-Färbung stark angefärbt (Abb. 26 A, C). Im caudalen Telencephalon spaltet es sich nach kurzer Strecke in einen proximalen und einen distalen Ast auf (Abb. 26 C). Somit sind in der  $P_{\text{hPax6}}$ -taulacZ Maus im Cortex und in der LGE Pax6-positive radiale Gliazellen angefärbt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Lokalisationsstudien von Pax6 und radialen Gliamarkern (Götz et al. 1998).

Die Somata der lacZ-exprimierenden Zellen, darunter die radialen Gliazellen, liegen in der cortikalen Ventrikulär- und Subventrikulärzone, wie die mRNA-ISH zeigt (Abb. 27 B, D), und sie stimmen in ihrer Lage mit den Pax6-mRNA-exprimierenden Zellen überein (Abb. 27 A, C). In der lacZ-mRNA-ISH tritt außer der somatischen auch eine Färbung von Zellfortsätzen auf. Diese bilden ein deutliches subpiales Band (Abb. 27 B, D), das bei höherer Vergrößerung zu radialen Fasern aufgelöst wird (nicht gezeigt). Dieses Band fehlt in den Bereichen, wo keine Pax6-exprimierenden radialen Gliazellen vorhanden sind (vgl. Hypothalamus in Abb. 27 B), und es tritt auch nur in der  $P_{\text{hPax6}}$ -taulacZ-Maus, nicht in der lacZ-ISH an Wildtyp-Mäusen auf (nicht gezeigt). Offenbar wird also die lacZ-mRNA im Gegensatz zur Pax6-mRNA in die Fortsätze der radialen Gliazellen transportiert und kann dort per In-situ-Hybridisierung nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Pax6- mit der lacZ-mRNA-ISH zeigt einige Zellpopulationen auf, die zwar Pax6, aber kein lacZ exprimieren. Entlang der pallial-subpallialen Grenze scheint im rostralen Telencephalon an E13.5 eine Population Pax6-positiver Zellen zur Oberfläche des Paläocortex zu strömen, wo sie die Marginalzone des Tuberculum olfactorium besiedelt (Puelles et al. 2000). Dieser Wanderungsstrom ist an E14.5 in mRNA-ISHs in der  $P_{\text{hPax6}}$ -taulacZ-Maus für Pax6 stark positiv, für lacZ jedoch kaum (nicht gezeigt). An E18.5 sind diese Zellen als Färbung der Marginalzone des Paläocortex (PCx)

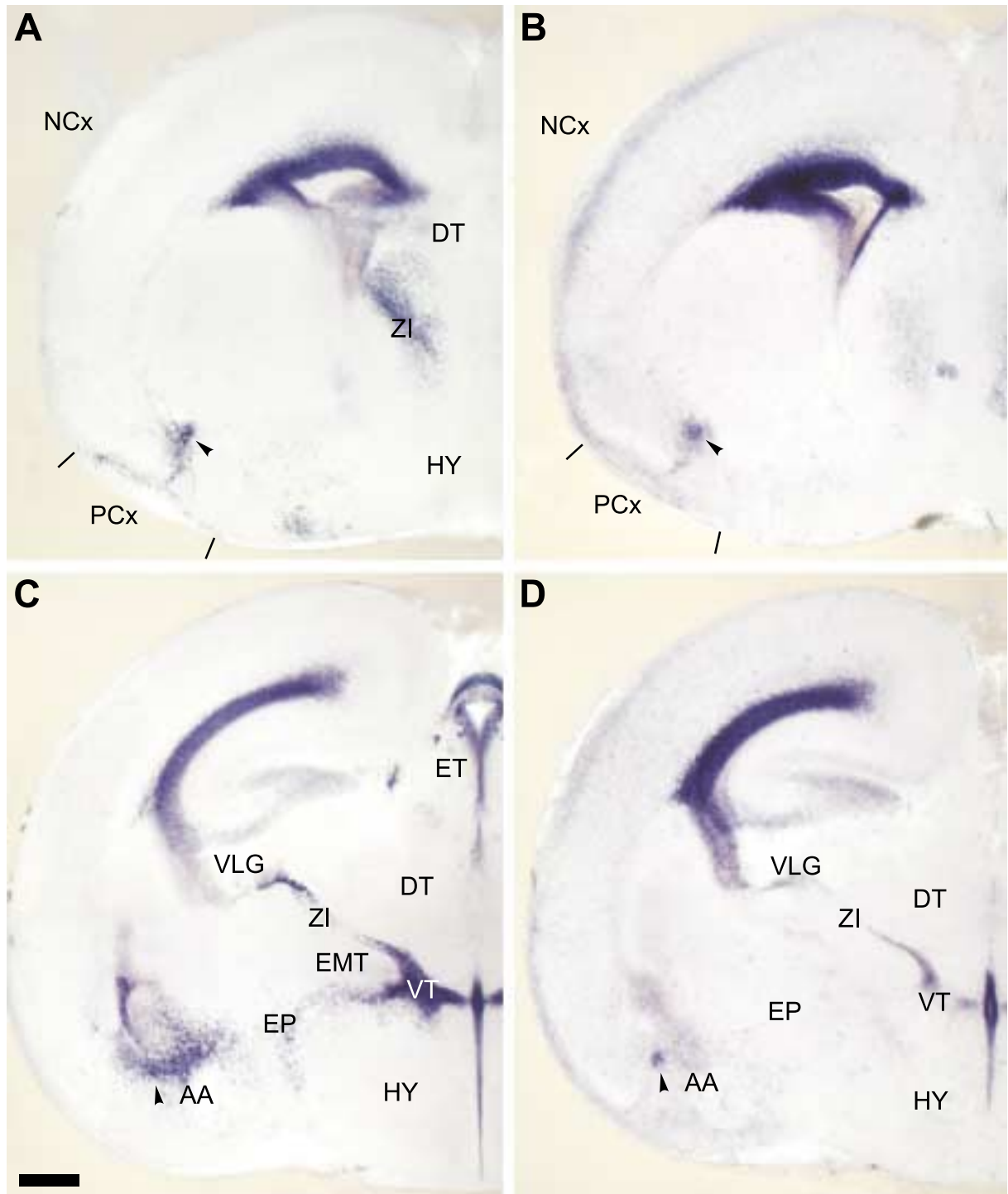


**Abb. 26: Prosencephalon an E18.5 I**

X-Gal-Färbungen von Wildtyp (A, C) und  $Pax6^{Sey/Sey}$ -Maus (B, D). Frontalschnitte (SD: 100 $\mu$ m, Vib.). Die Schnittebenen von A und B sowie den weiter caudal gelegenen C und D wurden an vergleichbarer Position gewählt. Beschreibung im Text. Balken: 400  $\mu$ m

in der  $Pax6$ -mRNA-ISH sichtbar (Abb. 27 A),  $lacZ$  exprimieren sie jedoch nicht (Abb. 27 B). Eine kleine Population von Zellen in der Intermediärzone ist  $lacZ$ -positiv (Pfeilspitze in Abb. 27 B). Es scheint sich um den proximalen Anteil einer  $Pax6$ -positiven Population zu handeln (vgl. Pfeilspitze in Abb. 27 A).





**Abb. 27: Prosencephalon an E18.5 II**

Pax6- (A, C) und lacZ-mRNA-ISH (B, D) von Wildtyp. Benachbarte Frontalschnitte. Die Schnittebenen von A und B sind mit Abb. 26 A, die von C und D mit Abb. 26 C vergleichbar. Beschreibung im Text. Balken: 400  $\mu$ m

Im caudalen Telencephalon besiedeln Pax6-positive Zellen ventrale Abschnitte des Palliums und des Subpalliums, die im Adulttier als „Amygdala“ („AA“) bezeichnet werden (Stoykova et al. 1996). Eine exakte Klärung, welche embryonalen Hirnteile Anteile zur späteren Amygdala beisteuern, steht noch aus (Puelles et al. 2000; Yun et al. 2001). Diese Zellpopulationen sind auch in der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Maus

Pax6-mRNA-positiv (Abb. 27 C). Sie exprimieren jedoch keine lacZ-mRNA (Abb. 27 D), bis auf eine kleine Subpopulation (Pfeilspitze in Abb. 27 D). Sowohl im rostralen Telencephalon (Abb. 27 A, B) als auch im caudalen Telencephalon (Abb. 27 C, D) gibt es folglich Zellpopulationen, die Pax6 exprimieren, lacZ jedoch nicht.

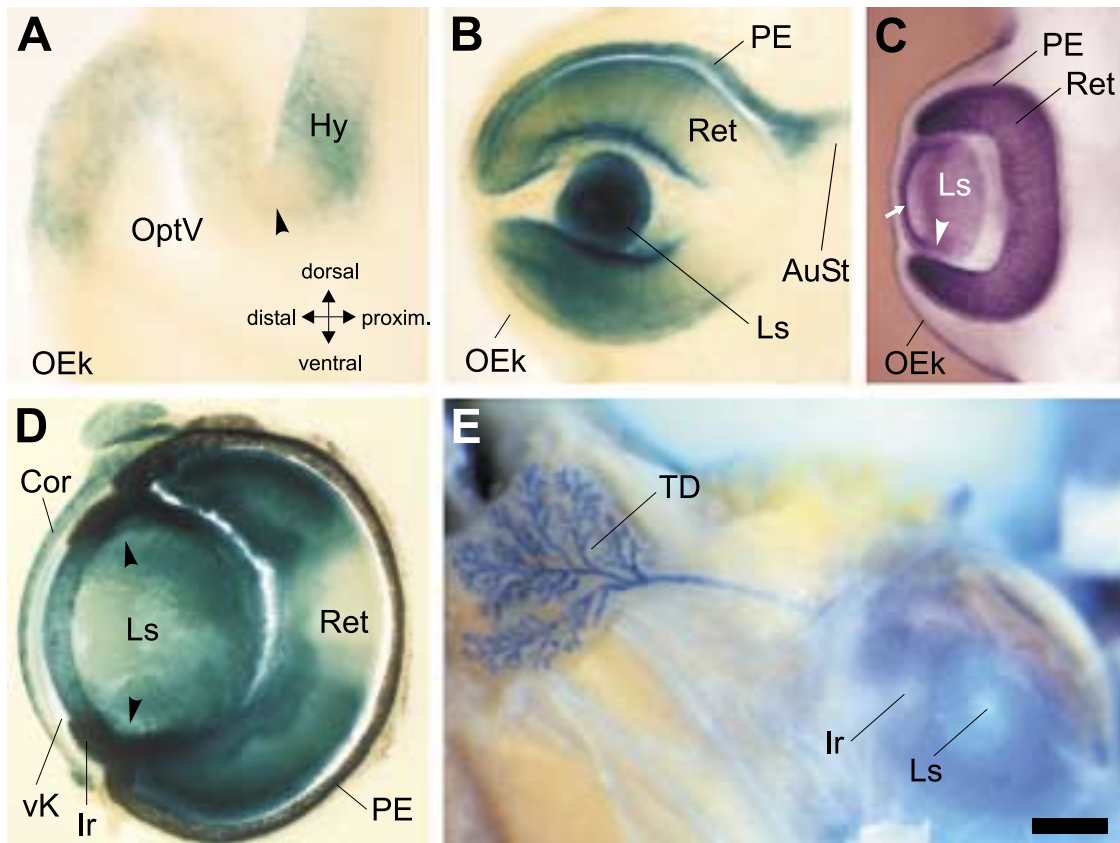
In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen sind die kortikalen Primordien an E12.5 unterentwickelt (Stoykova et al. 1996). Ferner ist die Schichtbildung im Cortex deutlich gestört und postmitotische Zellen akkumulieren in Knötchen in der Subventrikulärzone, ohne in die oberen Schichten zu wandern (Schmahl et al. 1993). Pax6-mRNA wird auch in der Mutanten in der Ventrikulär- und Subventrikulärzone von Pallium und Teilen des Subpalliums exprimiert (Stoykova et al. 1996). In der  $P_{hpax6}$ -taulacZ-Maus wird  $\beta$ -Galactosidase wie im Wildtyp ab E10.5 exprimiert (nicht gezeigt), und sie wird auch im gesamten Pallium nachgewiesen, wie an E12.5 illustriert wird (vgl. Abb. 25 E–H mit A–D). Hier ist auch deutlich, dass die kortikalen Anlagen gegenüber dem Wildtyp gedrungener wirken. Sie sind stärker und gleichförmiger angefärbt als im Wildtyp. An E18.5 ist die X-Gal-Färbung in ventrikulären Bereichen von Pallium und Subpallium weit ausgedehnt (Neocortex und Striatum in Abb. 26 B, Archicortex in D). Dabei handelt es sich vermutlich um die Zellen, die in der Subventrikulärzone akkumulieren. Häufig treten zwischen der Subventrikulärzone und der Intermediärzone ektopische Anfärbungen auf (Pfeilspitzen in Abb. 26 B, D). Bei höherer Vergrößerung wird deutlich, dass diese Anfärbungen Ansammlungen von Zellen sind (nicht gezeigt). Die Natur dieser Zellen ist unklar. taulacZ wird wie Pax6 im Cortex der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus exprimiert.  $\beta$ -Galactosidase färbt auch ektopische Zellen in der Subventrikulär- und Intermediärzone der Mutanten an.

Radiale Gliazellen haben in Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen eine unregelmäßige Form. Sie kontaktieren auch hier sowohl ventrikuläre als auch piaie Oberfläche, sind jedoch eher von S-förmiger als radialer Gestalt (Götz et al. 1998). An E12.5 lässt die X-Gal-Anfärbung keinen Schluss auf Unterschiede in der Morphologie radialer Gliazellen zwischen Wildtyp und Mutante zu (vgl. Abb. 25 E–H mit A–D). An E18.5 ist in der X-Gal-Färbung die subpiaie Anfärbung in der Mutanten etwa mit der im Wildtyp vergleichbar (vgl. Abb. 26 B mit A). In den mittleren Schichten zwischen der stark angefärbten Ventrikulär- und Subventrikulärzone und den subpiaien Endfüßen ist die Anfärbung in der Mutanten jedoch stärker als im Wildtyp, und bei höherer Vergrößerung werden Fasern sichtbar (nicht gezeigt). Das gliale Faserbündel an der Grenze zwischen Cortex und Striatum ist auch in der Mutante angefärbt (scW in Abb. 26 B, D). Es scheint weniger kompakt zu sein als im Wildtyp, und die Aufspaltung in zwei Faserbündel ist nicht sichtbar. Es sind also in der X-Gal-Färbung subtile Unterschiede in der Morphologie der radialen Gliazellen der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Maus im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen.

**Zusammenfassung Telencephalon.** tau- $\beta$ -Galactosidase wird im Telencephalon ab E10.5 im Pallium, besonders stark in ventralen und lateralen Anteilen, und in der LGE exprimiert. Radiale Gliazellen exprimieren  $\beta$ -Galactosidase bis E18.5. Besonders die gebündelten Gliafasern entlang der pallial-subpallialen Grenze sind stark angefärbt. In der Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mutanten wird die veränderte Morphologie und die ektopische Lage von radialen Gliazellen durch die  $\beta$ -Galactosidase-Anfärbung dargestellt. Pax6-positive Zellen, die zur Oberfläche des Paläocortex und in die Amygdala wandern, sind für  $\beta$ -Galactosidase nur teilweise positiv.

### 3.3.7 Auge

Pax6 wird ab E8 in einer breiten Region des Prosencephalons exprimiert, die das zukünftige Augenbläschen einschließt. Auch im Oberflächenektoderm wird Pax6 an E8 in einer breiten Region exprimiert, die das Prosencephalon bedeckt. Die Expression im Oberflächenektoderm wird bis E9.5 auf die sich entwickelnde Linsenplakode beschränkt (Grindley et al. 1995). In  $P_{hpax6}$ -taulacZ-Mäusen wird  $\beta$ -Galactosidase, wie oben beschrieben wurde, erst ab E9.5 im Prosencephalon exprimiert. Zu diesem



**Abb. 28: Auge**

X-Gal-Färbungen (A, B, D, E), Pax6-mRNA-ISH (C). Coronalschnitte (A–D; SD: 100µm, Vib.). **A:** Ab 9.5 ist das Augenbläschen (OptV) angefärbt. Im proximalen Teil (Pfeilspitze) ist die Färbung geringer als im distalen Teil. Im Oberflächenektoderm (OEK) ist eine schwache Anfärbung vorhanden. **B:** An E11.5 sind sowohl Pigmentepithelschicht (PE) als auch Retina (Ret) angefärbt, während die Anfärbung des Augenstiels (AuSt) weiter abgenommen hat. Ein proximaler Teil der Retina ist nur schwach angefärbt. Die Linse ist stark und das Oberflächenektoderm schwach angefärbt. **C:** In der Pax6-ISH ist die Retina gleichmäßig angefärbt. In der Linse wird Pax6 im vorderen Blatt (Pfeil) und in der Äquatorialzone (Pfeilspitze) stärker als in der restlichen Linse exprimiert. Das Oberflächenektoderm ist ebenfalls Pax6-positiv. **D:** An E17.5 exprimieren weiterhin Retina, Pigmentepithel und Linse  $\beta$ -Galactosidase. In der Linse ist die stärkere Expression im vorderen Blatt (vgl. C) und in der Äquatorialzone (Pfeilspitzen) deutlich. Aus dem Pax6-positiven Oberflächenektoderm haben sich Cornea (Cor, angefärbt) und Tränendrüse entwickelt. **E:** Die Tränendrüse (TD) ist an P0 deutlich angefärbt. Haut und Bindegewebe sowie Schädelknochen wurden entfernt. Temporal (t) und nasal (n) wie angegeben. Weitere Abkürzungen: vordere Kammer (vK), Iris (Ir). Balken: 100µm (A, B), 150µm (C), 300µm (D, E),

Zeitpunkt wird sie auch im Augenbläschen (Abb. 28 A) und in der Linsenplakode nachgewiesen (Pfeil in Abb. 28 A). Die Expression von *taulacZ* setzt somit an E9.5 genau dort ein, wo Pax6 zu diesem Zeitpunkt exprimiert wird.

**Neurale Derivate (Retina, Iris und Pigmentepithel).** Ab E9.5 wird die Pax6-Expression im Augenbläschen nach und nach auf die distalen Bereiche beschränkt, aus denen sich der Augenbecher mit der Retina (Ret) und dem Pigmentepithel (PE) entwickelt (Grindley et al. 1995). Im proximalen Augenbläschen, aus dem sich der Augenstiel (AuSt) entwickelt, wird Pax6 durch Pax2 reprimiert (Schwarz et al. 2000). In der X-Gal-Färbung erreicht die  $\beta$ -Galactosidase-Expression im proximalen Augenbläschen (Pfeilspitze in Abb. 28 A) zu Beginn an E9.5 nicht das Expressionsniveau des distalen

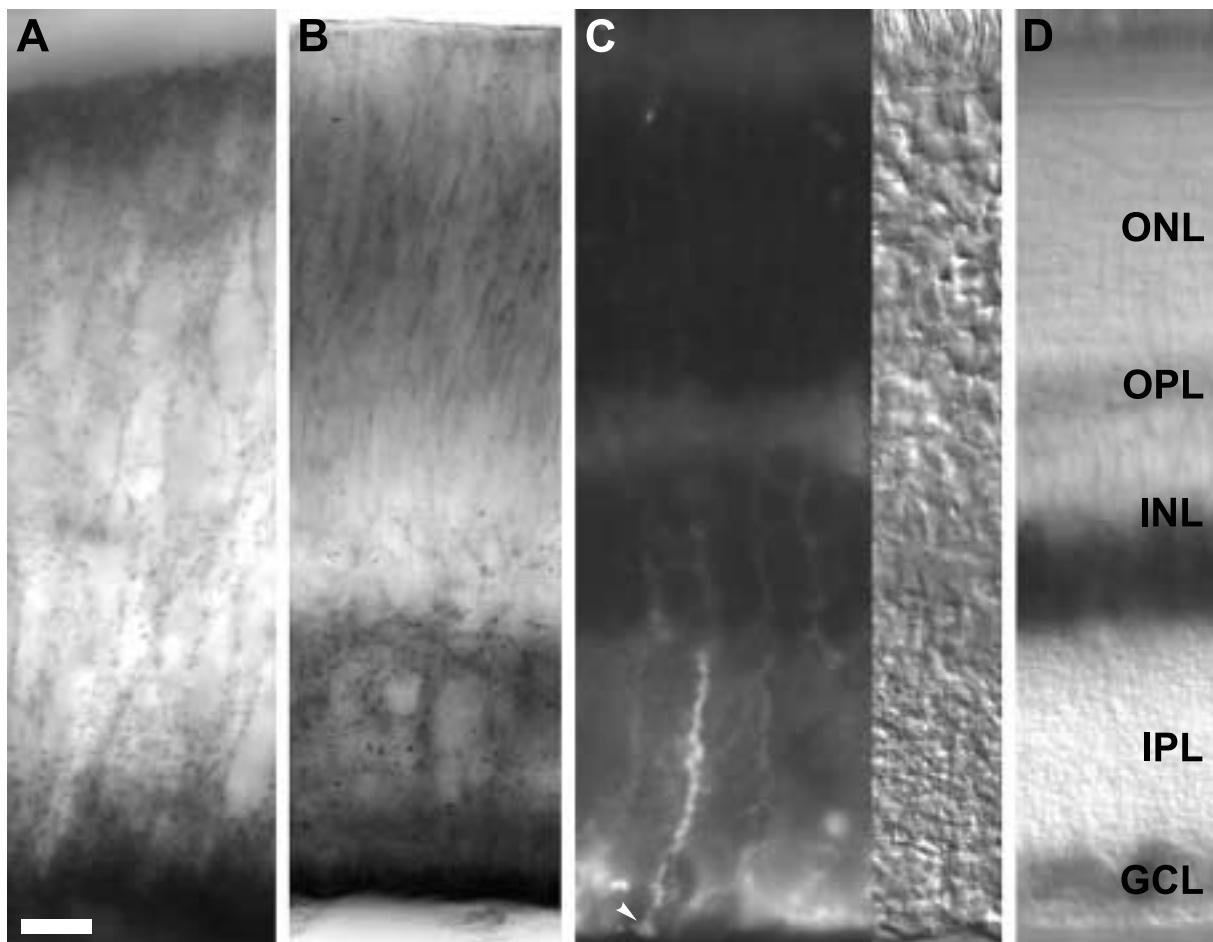
Teils. Sie wird im Augenstiel an den Folgetagen weiter reduziert (Abb. 28 B, Abb. 24 E, F). Am längsten bleibt sie im dorsalen Teil des Augenstiels bestehen. Wie Pax6 wird die Expression von taulacZ im Augenstiel reduziert, während sie im Augenbecher stark bleibt.

Zur Pax6-mRNA-Expression, die gleichmäßig in der gesamten Retina vorliegt (Abb. 28 C), unterscheidet sich die  $\beta$ -Galactosidase-Expression darin, dass sie in einer zentralen Zone der Retina um den Eintrittspunkt des Sehnervs herum reduziert ist (Abb. 28 B, D). Diese Zone hat keine scharfen Grenzen sondern geht graduell in den  $\beta$ -Galactosidase-positiven Bereich über. Unklar ist, ob die Expression von  $\beta$ -Galactosidase auf der mRNA- oder Protein-Ebene reduziert ist. In der Entwicklung wird taulacZ wie Pax6 in der Retina exprimiert, mit Ausnahme eines schwach exprimierenden Bereichs in der zentralen Retina.

Pax6 wird von allen proliferativen Vorläuferzellen während der Entwicklung der Retina exprimiert; von vielen postmitotischen Zellen wird es ausgeschaltet (Walther und Gruss 1991; Hitchcock et al. 1996; Marquardt et al. 2001).  $\beta$ -Galactosidase wird während der gesamten Embryonalentwicklung in der Retina exprimiert (Abb. 28 B, D). Bei höherer Vergrößerung wird deutlich, dass an E11.5 die angefärbten Zellen von neuroepithelialer Morphologie sind (Abb. 29 A). An E18.5 sind derartige Zellen im äußeren Teil der Retina weiterhin angefärbt; im inneren Teil ist die Färbung sehr stark, besonders an der Grenze zur Basalmembran (Abb. 29 B). Die X-Gal-Färbung lässt hier keine Schlüsse auf den Typ der angefärbten Zellen zu. Eine Färbung von Ganglienzellaxonen oder von glialen Endfüßen kommt in Betracht. Ganglienzellaxone sind jedenfalls im Sehnerv in der X-Gal-Färbung im Sehnerv nicht angefärbt (nicht gezeigt). Es ist jedoch offensichtlich, dass taulacZ in den Pax6-positiven proliferativen Zellen der äußeren Schichten exprimiert wird.

Im Adultstadium exprimieren noch Zellen in der Ganglienzellschicht und in der inneren Körnerschicht (INL) Pax6, darunter Amakrinzellen und Horizontalzellen (Macdonald und Wilson 1997; Koroma et al. 1997; Jones et al. 1998). Im Hühnchen wird Pax6 außerdem in Müller-Gliazellen gefunden, die nach Läsionen der Retina wieder proliferativ werden und verschiedene Zelltypen der Retina regenerieren können (Fischer und Reh 2001). Die Somata von Müller-Zellen befinden sich ebenfalls in der INL, und es scheint, als seien in Pax6-mRNA-ISHs einzelne Müllerzellsomata angefärbt (nicht gezeigt).  $\beta$ -Galactosidase wird in X-Gal-Färbungen in den inneren Endfüßen der Müller-Zellen an der Basalmembran nachgewiesen (nicht gezeigt). In fluoreszenzimmunhistochemischen Färbungen mit einem anti- $\beta$ -Galactosidase-Primärantikörper wird der innere Teil von Müller-Zellen stark angefärbt, ihr Soma und der äußere, stark verästelte Teil nur schwach (Abb. 29 C). Der zentrale Teil der Retina ist nur schwach angefärbt. In mRNA-ISHs wird lacZ (nicht gezeigt) wie Pax6 (Abb. 29 D) in INL und GCL exprimiert, allerdings ist das Signal deutlich schwächer. Während also taulacZ-mRNA in Ganglienzellen und in Zellen der INL vorhanden ist, wird  $\beta$ -Galactosidase enzymatisch und immunhistochemisch nur in Müller-Zellen nachgewiesen. In Ganglienzellen, Amakrinzellen und Horizontalzellen, also den postmitotischen Neuronen der Retina, wird keine tau- $\beta$ -Galactosidase aus der vorhandenen mRNA hergestellt. Pax6- und taulacZ-mRNA wird in der adulten Retina parallel in den selben Zelltypen exprimiert.  $\beta$ -Galactosidase wird jedoch nur in Müller-Gliazellen nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass postmitotische Neurone sie posttranskriptionell reprimieren.

Das Pigmentepithel entwickelt sich aus dem hinteren Blatt, die Iris (Ir; Regenbogenhaut) aus dem Umschlagsrand des Augenbeckers. Die Iris exprimiert während ihrer gesamten Entwicklung Pax6, während die Pax6-Expression im Pigmentepithel nach und nach herunterreguliert wird (Walther und Gruss 1991; Grindley et al. 1995; Macdonald und Wilson 1997). Auch  $\beta$ -Galactosidase wird in X-Gal-Färbungen während der gesamten Entwicklung in der Iris nachgewiesen (Abb. 28 B, D, E). Im Pigmentepithel ist bis zur Geburt eine Expression von  $\beta$ -Galactosidase festzustellen. Es besteht hohe Übereinstimmung zwischen der Expression von Pax6 und taulacZ in der Iris und der Pigmentepithelschicht des Auges.



**Abb. 29: Retina**

X-Gal-Färbungen (A, B; SD: 100 $\mu$ m, Vib.), anti- $\beta$ -Galactosidase-Immunfluoreszenz (C; SD: 10 $\mu$ m), Pax6-mRNA-ISH (D). **A:** An E11.5 wird  $\beta$ -Galactosidase in Neuroepithelzellen exprimiert. Die punktierte Färbung markiert die Umriss der Zellen. **B:** An E17.5 wird  $\beta$ -Galactosidase weiter in neuroepithelialen Zellen der äußeren Schichten exprimiert. Im inneren Teil ist die Färbung sehr stark. Hier können keine Zelltypen unterschieden werden. **C:** In der adulten Retina ist der innere Teil von Müller-Gliazellen in der IPL und ihre Endfüße (Pfeilspitze) stark angefärbt. **D:** Pax6-mRNA wird in der adulten INL und in Ganglienzellen exprimiert. Äußere Körnerschicht (ONL), äußere Faserschicht (OPL), innere Körnerschicht (INL), innere Faserschicht (IPL), Ganglienzellschicht (GCL). Balken: 8 $\mu$ m (A), 16.7 $\mu$ m (B, D), 10.6 $\mu$ m (C).

**Oberflächenektodermdervivate (Linse, Cornea, Tränendrüse).** Die Linse entsteht, wie oben beschrieben, aus einer Einstülpung des Oberflächenektoderms, dem Linsenbläschen, das in der gesamten Entwicklung Pax6-positiv ist (Walther und Gruss 1991; Grindley et al. 1995). Besonders die proliferativen Zellen im vorderen Blatt der Linse und in der Äquatorialzone exprimieren noch im Adultstadium Pax6, während es in Linsenfasern schwächer exprimiert wird (Macdonald und Wilson 1997). In der X-Gal-Färbung ist die Linse (Ls) während der gesamten Entwicklung angefärbt (Abb. 28 B, D). In späten Stadien konzentriert sich die Färbung auf die Äquatorialzone (Pfeilspitzen in Abb. 28 D). Damit wird taulacZ auch in der sich entwickelnden Linse parallel zu Pax6 exprimiert.

Nach der Einstülpung des Linsenbläschens wird Pax6 auch im verbleibenden Oberflächenektoderm exprimiert. Aus ihm entwickeln sich die Cornea und der Bindehautsack, der sich im temporalen Bereich zur Tränendrüse einstülpt. Pax6 wird in all diesen Derivaten des Oberflächenektoderms exprimiert (Koroma et al. 1997). Nach Einstülpung der Linse wird eine schwache  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

im Oberflächenektoderm (OEk) an E11.5 nachgewiesen (Abb. 28 B). Diese verstärkt sich in späteren Stadien. Cornea (Cor) und Tränendrüse (TD) sind kräftig angefärbt (Abb. 28 D, E). Wie Pax6 wird tau- $\beta$ -Galactosidase also auch in den späteren Derivaten des Oberflächenektoderms exprimiert.

**Zusammenfassung Auge.** tau- $\beta$ -Galactosidase wird ab E9.5, zirka 1.5 Tage nach Beginn der Pax6-Expression, im Augenbläschen und in der Linsenplakode exprimiert. Sie wird kurz darauf im Augentstiel reprimiert. Abweichend von der Pax6-Expression wird  $\beta$ -Galactosidase in einem zentralen Bereich der Retina nur schwach exprimiert. Neuroepitheliale Zellen und später Müller-Gliazellen exprimieren  $\beta$ -Galactosidase. Neben der Retina exprimieren die neuralen Derivate Iris und Pigmentepithel sowie die Oberflächenektoderm-Derivate Linse, Cornea und Tränendrüse während der gesamten Augenentwicklung tau- $\beta$ -Galactosidase.

### 3.4 Darstellung neuronaler Wanderungen in vitro

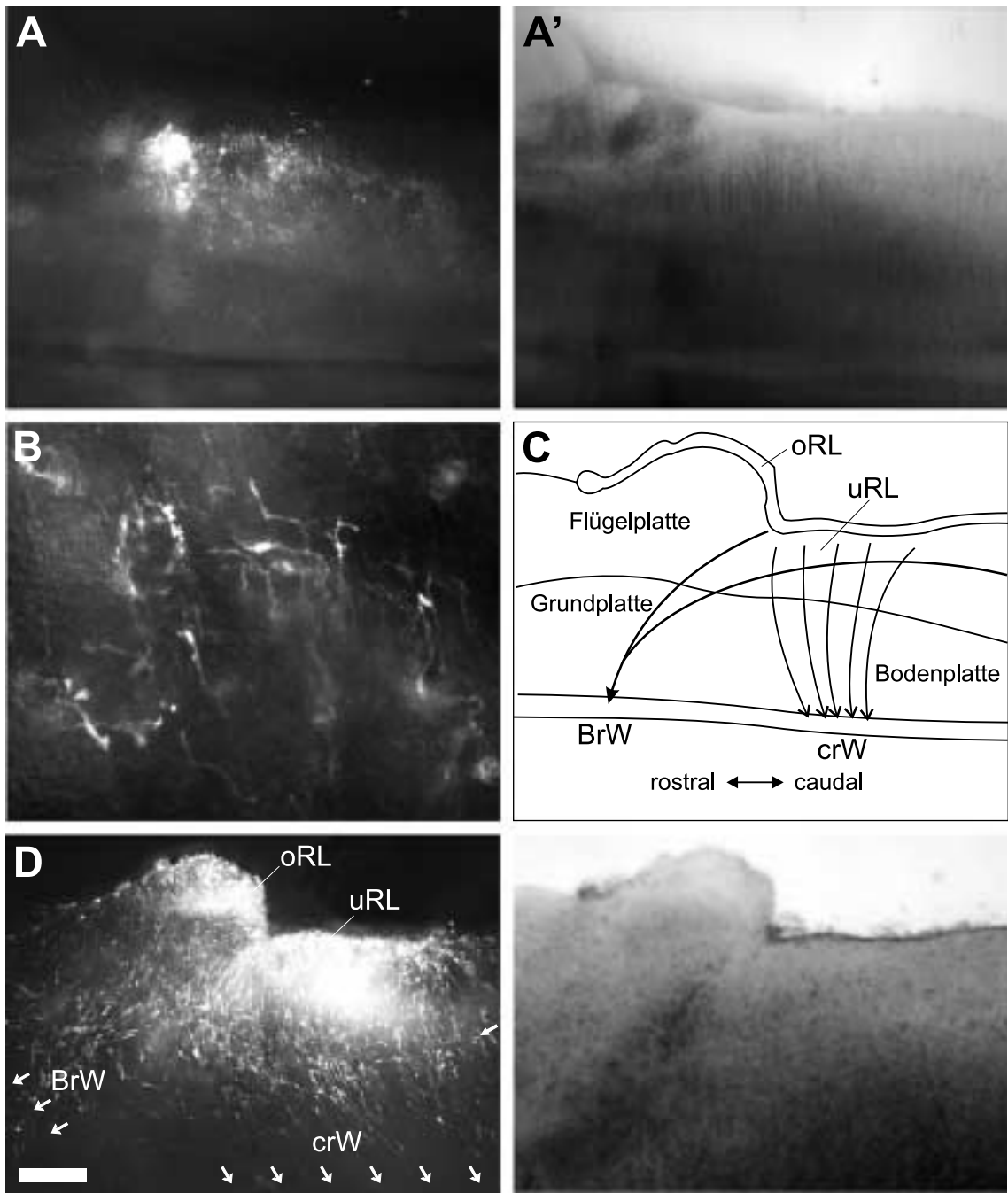
Die neuronalen Wanderungen von der Rautenlippe erfolgen während der Embryonalentwicklung im Mutterleib. Sie lassen sich daher nur schwer direkt darstellen. In einem Filterkultursystem können präparierte embryonale Medullae für mindestens eine Woche in Kultur gehalten werden. Pax6-mRNA-ISHs deuten darauf hin, dass einige Pax6-exprimierende Zellen aus der Rautenlippe auch in Kultur wandern (D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten). Dieses Kultursystem wurde verwendet, um wandernde Zellen direkt darzustellen und die Funktionsfähigkeit der  $P_{\text{hpax6}}$ -tTA-Mäuse zu überprüfen.

Um die wandernden Zellen aus der Rautenlippe direkt genetisch verändern zu können, sollte ein Gentransferverfahren etabliert werden. Der Gentransfer gelang durch ein modifiziertes Elektroporationsverfahren nach Akamatsu et al. (1999) und Miyasaka et al. (1999). Für den Transfer wurde der vierte Ventrikel von E12.5-Embryonen mit DNA-Lösung gefüllt und die Embryonen zwischen Plattenelektroden elektroporiert. Anschließend wurden die Medullae isoliert und als „Offenes-Buch“-Präparat für drei Tage in Kultur gehalten (Orientierung der Präparate siehe Abb. 30 A). Als Reportergene wurden das cytoplasmatische EGFPm oder das nukleäre EGFPmn verwendet, die durch Auflichtfluoreszenz einfach dargestellt werden konnten. Da die Elektroporation gerichtet ist, wird nur die der Anode zugewandte Hälfte des Neuralrohrs transformiert. Die andere Hälfte dient als Negativkontrolle.

Zunächst wurden Wildtyp-Mäuse mit pCMV-EGFPm elektroporiert. In diesen Konstrukten wird EGFPm unter der Kontrolle eines starken viralen Promotors exprimiert. Dies sollte zur Expression in allen Zellen führen, die die Konstrukte aufgenommen haben. Tatsächlich waren auf der elektroporierten Seite viele Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff angefüllt (Abb. 30 A), während in der nicht elektroporierten Seite keine Fluoreszenz auftrat (nicht gezeigt).

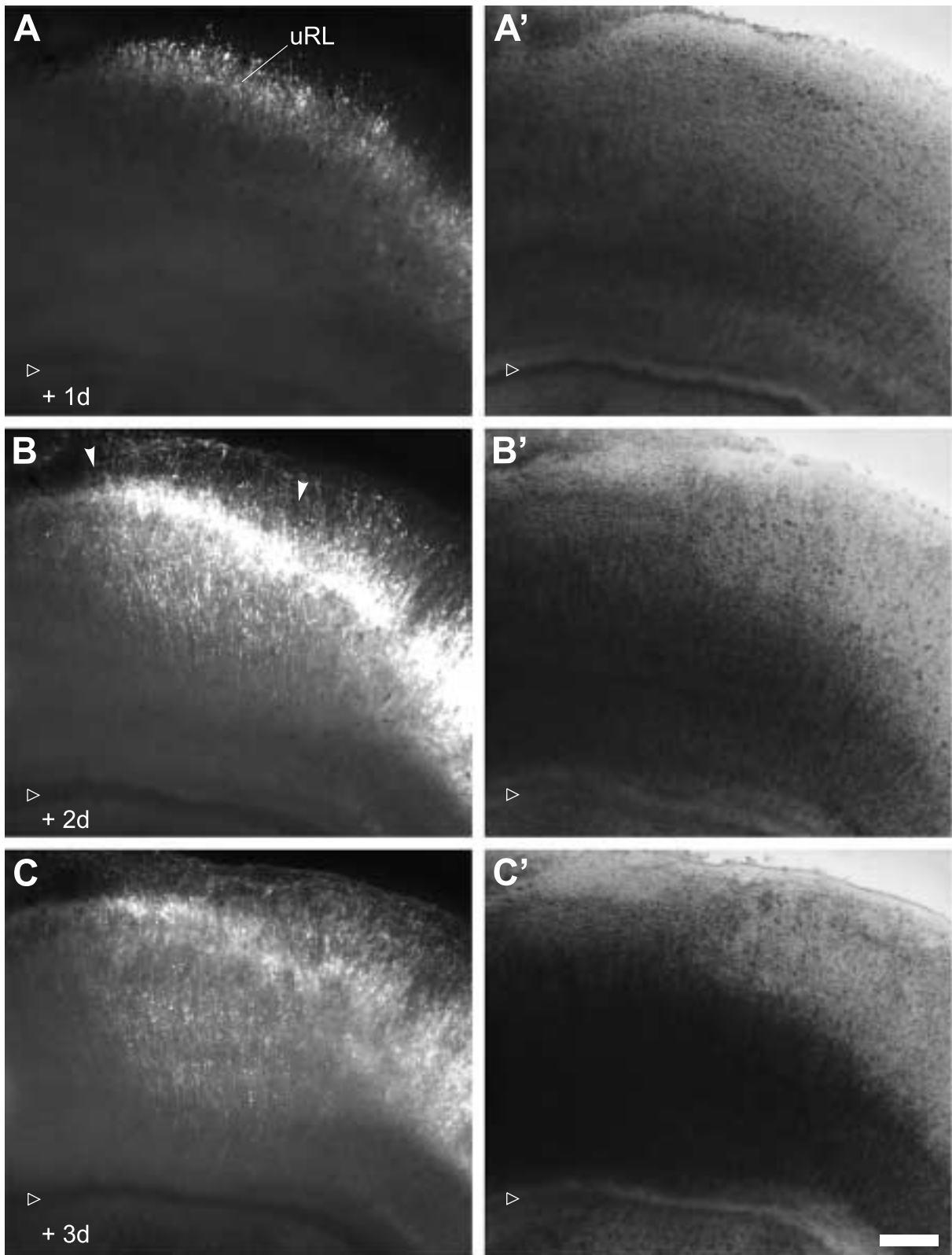
Durch die Orientierung des Präparats sind die Zellen und Fortsätze an der pialen Oberfläche gut sichtbar (Abb. 30 B), während die ventrale Oberfläche, die bei der Elektroporation exponiert war, verborgen auf der Unterseite des Gewebes liegt. Viele Fortsätze sind angefärbt, einige mit Endfüßen. Dies läßt auf eine Anfärbung von radialen Gliazellen schließen. Radiale Gliazellen sind auch der einzige Zelltyp, der sowohl die elektroporierte ventrikuläre als auch die piale Oberfläche kontaktiert. In der Rautenlippe exprimieren sehr wenige Zellen EGFPm. Sehr selten fluoreszieren Zellen mit bipolarer Morphologie, bei denen es sich um die wandernden Neurone aus der Rautenlippe handeln könnte (nicht gezeigt). Die Elektroporation von Wildtyp-Medullae mit konstitutiv aktiven Konstrukten demonstriert somit, dass die Methode grundsätzlich geeignet ist, um DNA in die Medulla zu transferieren. Allerdings werden wandernde Zellen der Rautenlippe äußerst selten transformiert, während viele radiale Gliazellen angefärbt sind.

Wie oben gezeigt wurde (Kapitel 3.3.3), ist der menschliche Pax6-Promotor geeignet, die Expression von taulacZ spezifisch in der Rautenlippe und den wandernden Neuronen zu aktivieren. Folglich sollte



**Abb. 30: Gentransfer durch Elektroporation**

Medulla-Explantatkulturen an E12.5 +48h. GFP-Fluoreszenz (B, C). **C:** Orientierung der Medulla in Filterkulturen. „Offenes-Buch“-Präparat mit der Ventrikelseite nach unten und der pialen Oberfläche nach oben. Obere (oRL) und untere (uRL) Rautenlippe und die von ihr ausgehenden externen präzerebellären Wanderungen: Brückenstrom (BrW) und cuneoreticulärer Wanderungsstrom (crW). **A, A', B:** Wildtyp-Maus transformiert mit pCMV-EGFPm. In der unteren Rautenlippe exprimieren sehr wenige Zellen GFP. Die externen präzerebellären Wanderungen sind nicht angefärbt. Die meisten fluoreszierenden Zellen haben die Morphologie von radialen Gliazellen, einige weisen Endfüße auf (vergrößert in B). **D, D':**  $P_{hPax6}$ -tTA transformiert mit pOEGFPm. Die Fluoreszenz in der unteren Rautenlippe (RL) ist sehr kräftig. Viele GFP-exprimierende Zellen von bipolarer Morphologie verlassen die Rautenlippe und folgen wie in vivo dem Pfad des cuneoreticulären (crW) und des Brückenstroms (BrW). Auf der Höhe des Pfeils biegen einige Zellen rechtwinklig zum crW ab. Obere Rautenlippe (oRL). Balken: 400  $\mu$ m (A, A'), 50  $\mu$ m (B), 250  $\mu$ m (D, D')



**Abb. 31: Cuneoreticuläre Wanderung in Medulla-Explantatkulturen**

Medulla-Explantatkultur von  $P_{hPax6}$ -tTA transformiert mit ptetO<sub>i</sub>EGFPm. Orientierung wie in Abb. 30. GFP-Fluoreszenz nach E12.5 **A**: + 1 Tag, **B**: + 2 Tage und **C**: + 3 Tage. **A'**–**C'**: korrespondierende Hellfeldaufnahmen. Viele Zellen der unteren Rautenlippe wurden transformiert und fluoreszieren. In einem breiten Abschnitt (durch Pfeilspitzen markiert) wandern viele dieser Zellen während der folgenden 2 Tage zur ventralen Mittellinie (Dreieck). Caudal von diesem Abschnitt findet keine derartige Wanderung statt. Balken: 250  $\mu$ m



in der Linie  $P_{\text{hPax6}}$ -tTA der Transaktivator tTA spezifisch in der Rautenlippe exprimiert werden. Diese Spezifität sollte ausgenutzt werden, um Reporterexpression in der Rautenlippe und den von ihr ausgehenden Wanderung zu erreichen. Dazu wurden Reporterkonstrukte in die Medullae von  $P_{\text{hPax6}}$ -tTA-Mäusen elektroporiert, deren Expression von einem Tet Response Element (TRE) kontrolliert wird. Nur in den Zellen, in denen durch das Transgen tTA exprimiert wird und in die durch Elektroporation das Reporterkonstrukt eingeführt wurde, sollte das Reporter Gen EGFPm exprimiert werden.

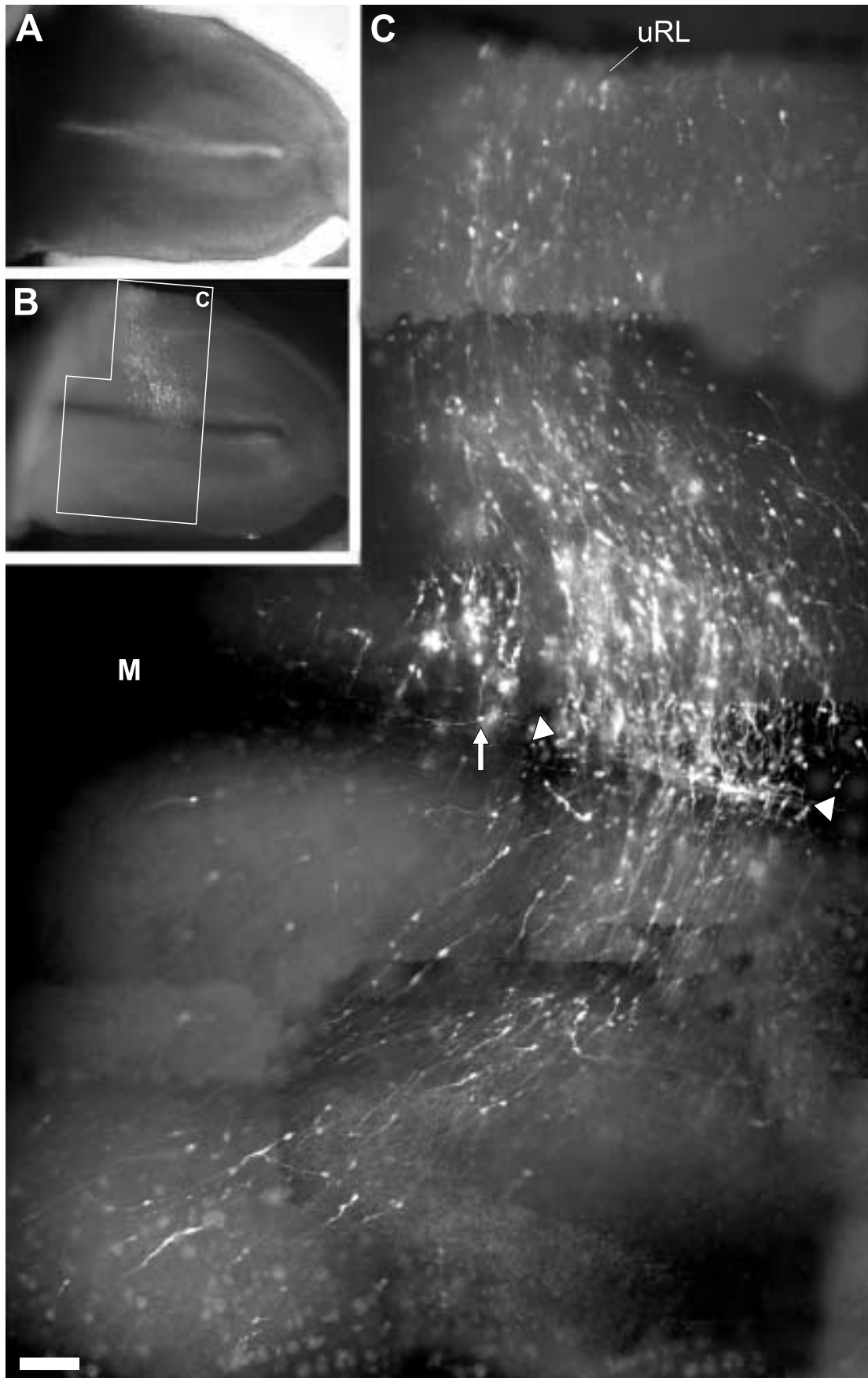
Die tTA-kontrollierten Reporterkonstrukte ptetOiEGFPm (cytoplasmatisch) und ptetOiEGFPmn (nukleär) wurden nun in  $P_{\text{hPax6}}$ -tTA-transgene Medullae elektroporiert. Dazu wurden  $P_{\text{hPax6}}$ -tTA-heterozygote Männchen mit Wildtyp-Weibchen verpaart und die Embryonen an E12.5 isoliert. Statistisch sind 50% der Nachkommen Träger des Transgens. Die Elektroporation erfolgte nach dem selben Verfahren wie oben beschrieben. Nach einem Tag in Kultur war etwa in der Hälfte der Präparate GFP-Fluoreszenz festzustellen. Ein Wurf wurde stichprobenweise durch PCR genotypisiert. Demnach waren 4 von 8 Präparaten positiv für das Transgen, und nur in diesen trat GFP-Fluoreszenz auf. Offenbar wird EGFP also tatsächlich nur in tTA-transgenen, nicht jedoch in Wildtyp-Medullae exprimiert, wenn diese mit Tetracyclin-kontrollierten Reporterkonstrukten transformiert werden.

In der Mehrzahl der Präparate fluoreszierten nach einem Tag viele Zellen in der Rautenlippe, während in anderen Bereichen des Präparates kaum Fluoreszenz beobachtet wurde. Gelegentlich waren radiale Gliazellen um den Sulcus limitans herum angefärbt (nicht gezeigt). Nach etwa einem Tag begannen fluoreszierende Zellen von bipolarer Morphologie aus der unteren Rautenlippe (uRL) herauszuwandern. Diese Zellen waren bei Verwendung des cytoplasmatischen EGFPm in ihrer gesamten Ausdehnung kräftig angefärbt. Bei Verwendung von nukleärem EGFPmn wurde eine weitere Verstärkung des Fluoreszenzsignals erzielt (nicht gezeigt). Wegen der mehr als ausreichenden Intensität des cytoplasmatischen Reporterkonstrukts wurde die nukleäre Variante nicht weiter verwendet.

Die meisten Zellen folgten dem cuneoreticulären Wanderungspfad (crW); einige jedoch auch dem Pfad des Brückenstroms (BrW; gezeigt nach 1.5 Tagen in Kultur in Abb. 30 C). Zellen wanderten in einem breiten Abschnitt aus der unteren Rautenlippe heraus. Über die ganze Breite dieses Abschnitts wurden Zellen beobachtet, die kurz nach Verlassen der Rautenlippe eine senkrechte Orientierung zum Großteil der übrigen Zellen einnahmen (Pfeil in Abb. 30 C). Es könnte sich dabei um Brückenstromneurone handeln. Insgesamt ähnelt dieses Präparat sehr der X-Gal-Färbung der Medulla von  $P_{\text{hPax6}}$ -taulacZ-transgenen Mäusen an E14.5 (Abb. 20 D). Die große Zahl der fluoreszierenden Zellen in Abb. 30 C lässt vermuten, dass der Großteil der cuneoreticulären Neurone transformiert wurde. Dies wurde jedoch nicht quantifiziert.

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen bezüglich der Funktionsfähigkeit der  $P_{\text{hPax6}}$ -tTA-transgenen Mäuse zu: (1) In diesen Mäusen wird der funktionelle Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA) exprimiert. Dies ist durch die Expression von elektroporierten, tTA-kontrollierten Reporterkonstrukten gezeigt. (2) Die Expression der Reporterkonstrukte ist an der pialen Oberfläche der Medulla auf die Rautenlippe und die von ihr ausgehenden Wanderungen beschränkt. Damit stimmt die Expression des Reportergens hier mit der von Pax6 überein.

Da die Visualisierung durch GFP in lebendem Gewebe erfolgt und nicht toxisch ist, konnte die Entwicklung der Präparate über mehrere Tage verfolgt werden (Abb. 31; A: nach 1 Tag, B: nach 2, C: nach 3 Tagen in Kultur). Die Wanderung – in diesem Präparat ist nur die cuneoreticuläre getroffen – geht nur von einem beschränkten Abschnitt der Rautenlippe aus (in B durch Pfeilspitzen markiert), während weiter caudal gelegene fluoreszierende Zellen offenbar nicht wandern. Die wandernden Neurone bewegen sich kontinuierlich über mehrere Tage. Die Hellfeldaufnahmen (A'–C') zeigen, dass sich die Form des Präparates während dieser Zeit nicht wesentlich ändert.



**Abb. 32: Weit vorangeschrittene cuneoreticuläre Wanderung in Medulla-Explantatkulturen**  
 Medulla-Explantatkultur von  $P_{hPax6}$ -tTA transformiert mit ptetOiEGFPm an E12.5 + 3 Tage. **B, C:** GFP-Fluoreszenz und **A:** korrespondierendes Hellfeld. Fast alle transformierten Zellen haben die untere Rautenlippe (uRL) verlassen und sind entlang des cuneoreticulären Wanderungspaths weit gewandert. Einige Zellen haben die ventrale Mittellinie (vM) überquert und sind bis zu ihren kontralateralen Zielgebieten in die Nuclei cuneatus lateralis (Ncl) und reticularis lateralis (Nrl) gewandert. Die Überquerung der Mittellinie erfolgt nur in einem permissiven Bereich (Dreiecke). Balken: 125  $\mu$ m

Die Entfernung, die die cuneoreticulären Neurone in Kultur zurücklegten, war unterschiedlich. Eine der weitesten Wanderungen nach 3 Tagen in Kultur wird in Abb. 32 gezeigt. Hier haben die meisten Zellen die Mittellinie erreicht; etliche Zellen haben sie auch überschritten und sind bis in die kontralateralen Zielgebiete der cuneoreticulären Wanderung gewandert. In allen Präparaten überquerten die Zellen die ventrale Mittellinie (vM) nur in einem schmalen permissiven Bereich, der weniger als halb so breit war wie das Ursprungsgebiet der Neurone in der Rautenlippe (in Abb. 32 durch Dreiecke markiert). Rostral und caudal davon änderten die Neurone regelmäßig kurz vor Erreichen der Mittellinie ihre Richtung und bewegten sich parallel zu ihr (Pfeil in Abb. 32 und nicht gezeigt), überquerten sie jedoch nicht.

**Zusammenfassung.** In  $P_{hPax6}$ -tTA-transgenen Mäusen wird funktionelles tTA in der Rautenlippe und den von ihr ausgehenden Wanderungen exprimiert, parallel zur Pax6-Expression. Durch Elektroporation von tTA-kontrollierten Reporterkonstrukten in Medullae von  $P_{hPax6}$ -tTA-transgenen Mäusen wird eine hochspezifische Expression in den wandernden Neuronen der externen präzerebellären Wanderungsströme erreicht. Der Gentransfer ist sehr effizient und führt zu einem hohen Anteil fluoreszierender Zellen. Es tritt praktische keine Hintergrundfluoreszenz in nicht wandernden Zellen auf. Die Zellen wandern in Kultur über weite Strecken ohne offensichtliche Beeinträchtigung. Einzelne Zellen der cuneoreticulären Wanderung können innerhalb von drei Tagen nach Überqueren der ventralen Mittellinie die kontralateralen Zielgebiete erreichen. Die Vorteile des binären Systems gegenüber der Expression von konstitutiv aktiven Reportergenen sind frappant.

## 4 Diskussion

Durch die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten YAC-transgenen Mäuselinien  $P_{hPax6}$ -taulacZ und  $P_{hPax6}$ -tTA wird ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Rolle von Pax6 während Nervenzellwanderungen geleistet. Dieses System ist modellhaft für neuronale Wanderungen im allgemeinen. Das verwendete YAC-Transgen Y593 mit dem menschlichen Pax6-Locus wird während der Entwicklung des ZNS hochspezifisch exprimiert. Eingehende Analysen der Linie  $P_{hPax6}$ -taulacZ haben gezeigt, dass das Transgen in zeitlicher und räumlicher Hinsicht weitgehend parallel zu Pax6 in diesen Zellen exprimiert wird. Diese Analysen haben zudem wegen der Lokalisierung des transgenen Reporterproteins in den Zellfortsätzen neue Einsichten in die Funktion und Rolle der Pax6/taulacZ-positiven Zellen geliefert. Die Mäuselinie  $P_{hPax6}$ -tTA ermöglicht es, in Pax6-positive Zellen gezielt beliebige DNA-Konstrukte einzubringen, wie durch Transfer des Gens für das Grün Fluoreszierende Protein demonstriert wurde. Mit diesem Marker ließ sich die Wanderung von Neuronen aus der Rautenlippe direkt darstellen. Die gewonnenen Erkenntnisse werden im folgenden diskutiert und einige vielversprechende Perspektiven umrissen.

### 4.1 Klonale Markierungskonstrukte

Durch intragenische Duplikation inaktivierte Reporter Gene bieten eine Alternative zu anderen, aufwändigeren Methoden, um Zellklone in der Entwicklung zu markieren. Inspiriert vom Reporter Gen „laacZ“ – einer inaktivierten Variante von lacZ, dem Gen für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase (Bonnerot und Nicolas 1993b) – sollten derartige klonale Marker von den Reporter Genen taulacZ und EGFP hergestellt werden. Die Duplikation in diesen Genen führt zu einer Leserasterverschiebung auf der mRNA und damit zum Abbruch der Proteinsynthese. In seltenen Fällen wird zufällig durch Genkonversion wieder das intakte Gen hergestellt. Alle klonalen Nachkommen der Zelle, in der diese somatische Rekombination stattgefunden hat, sind Träger des intakten Reporter Gens und damit genetisch markiert.

„taulaacZ“, die inaktivierte Variante von taulacZ, wurde aus taulacZ und laacZ konstruiert. Von EGFP wurden 6 verschiedene Varianten generiert, die Duplikationen von 161 bis 270 Basen Länge enthielten („EGFP161 – EGFP270“). In transienten Transfektionsexperimenten wurden diese Konstrukte getestet. Die Rekombinationshäufigkeit war je nach Länge der Duplikation unterschiedlich (Abb. 13). Die höchste Rekombinationswahrscheinlichkeit je Zellteilung ( $6 \times 10^{-4}$ ) trat bei der 270 Basenpaare langen EGFP-Duplikation auf. Sie betrug in diesen transienten Experimenten damit das Dreifache derjenigen von laacZ ( $2 \times 10^{-4}$ ). Beide sind höher als die für laacZ ermittelten Wahrscheinlichkeiten in transgenen Mäusen ( $1.4 \times 10^{-6}$  bis  $1.2 \times 10^{-5}$ ; (Bonnerot und Nicolas 1993b)).

Ursachen für die erhöhte Rekombinationswahrscheinlichkeit können sein, dass in den transienten Transfektionsexperimenten mehr als eine Kopie des inaktivierten Reporters je transformierter Zelle vorliegt und dass die Plasmid-DNA während der Transfektion beschädigt wird. Beschädigungen der DNA erhöhen die Rekombinationswahrscheinlichkeit deutlich, vermutlich weil sie die zelluläre DNA-Reparaturmaschinerie aktivieren (Lambert et al. 1999). Wird die Plasmid-DNA vor der Transfektion durch Einführen eines Doppelstrangbruchs künstlich beschädigt, lässt sich die Rekombinationswahrscheinlichkeit noch weiter erhöhen. Dazu wurde EGFP270 zwischen den beiden Duplikationen mit der Restriktionsendonuclease Nhe I geschnitten. Die Zahl fluoreszierender Zellen war gegenüber ungeschnittenem EGFP270 um ein Mehrfaches erhöht (nicht gezeigt).

Die in diesen Vorversuchen charakterisierte inaktivierte Variante von EGFP sollte zur Herstellung von tTA-kontrollierten Transreporterlinien verwendet werden. Dazu wurde das Konstrukt ptetOiEGFP270mn in Oocyten injiziert und die Gründertiere (Kürzel: TEDN) per PCR analysiert. Von

13 lebenden TEDN-Gründertieren wiesen 4 Tiere alle PCR-Transgenmerkmale auf. Zwei dieser Gründertiere wurden weiter analysiert; sie gaben die Transgenmerkmale auch an ihre Nachkommen weiter.

Aus Verpaarungen von TEDN Transreportern mit der Transaktivatorlinie  $P_{hPax6}$ -tTA wurden 3 Tiere erhalten, die beide Transgenmerkmale aufwiesen. In diesen Tieren konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden. Hierfür sind mehrere Erklärungen denkbar: (1) Die Duplikationskonstrukte weisen einen Defekt auf, (2) durch Positionseffekte wird die Expression des Transgens unterdrückt oder (3) die Stichprobengröße untersuchter Tiere ist zu klein. Die Erklärungsmöglichkeit (1) erscheint aufgrund der in Vorversuchen mit dem Konstrukt gezeigten Funktionsfähigkeit unwahrscheinlich. Möglichkeit (2), die Unterdrückung durch Positionseffekte, weist eine hohe Wahrscheinlichkeit auf. Der Vergleich mit lacZ-transgenen Mäusen zeigt, dass selbst bei Abwesenheit von Positionseffekten noch keine Aussage über die Funktionsfähigkeit dieser Linien abgeleitet werden kann, weil die Stichprobengröße zu klein ist (3): Bei der Analyse von 3000 E11.5-Embryonen einer muskelspezifischen lacZ-Linie wurden 153  $\beta$ -Galactosidase-positive Tiere identifiziert, also jedes 20. Tier (Nicolas et al. 1996). Selbst wenn EGFP270 in transgenen Mäusen eine etwas höhere Rekombinationswahrscheinlichkeit aufweisen sollte als lacZ, ist die Zahl der Wiederholungen noch zu gering. Es sind daher weitere Untersuchungen aller 4 TEDN-Linien erforderlich. Sofern neue transgene Linien generiert werden, wäre der Einsatz eines modifizierten Konstrukts ratsam, das den Ausschluss von Positionseffekten erlaubt. Zum einen kann durch den Einbau von Chromatin-Isolatorelementen der Effekt benachbarter Regionen auf das Transgen reduziert werden. Zum anderen ließe sich ein zweiter, konstitutiv exprimierter Marker auf dem Konstrukt als Positivkontrolle für eine geglückte Integration verwenden.

## 4.2 Expressionsmuster von mPax6 und $P_{hPax6}$ -Transgenen

Pax6 wird in der Maus während der Entwicklung des ZNS in einem komplexen räumlichen und zeitlichen Muster exprimiert (Walther und Gruss 1991; Callaerts et al. 1997). Ziel war es, dieses komplexe Muster durch die Verwendung des menschlichen Pax6-Promotors ( $P_{hPax6}$ ) zu kopieren und zur Expression von Reportergenen zu nutzen. Es wurden zwei YAC-transgene Mäuselinen mit diesem Promotor generiert. Um zu zeigen, dass  $P_{hPax6}$  ausreicht, um das Pax6-Expressionsmuster in Mäusen zu kopieren, wurde die Reporterexpression in den beiden Linien  $P_{hPax6}$ -taulacZ und  $P_{hPax6}$ -tTA mit der Expression von Pax6 verglichen.

Hauptsächlich wurden  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäuse untersucht. Die  $\beta$ -Galactosidase-Expression wurde auf mRNA-Ebene (lacZ-mRNA-ISHs), als Protein (Anti- $\beta$ -Galactosidase-Antikörperfärbungen) und als funktionelles Enzym (X-Gal-Färbungen) nachgewiesen. In  $P_{hPax6}$ -tTA-Mäusen wurde in organotypischen Kulturen der Medulla der Expressionsverlauf von tTA während der externen präzerebellären Wanderungen untersucht. Dazu wurden durch Gentransfer Reporterkonstrukte eingebracht, die nur bei Anwesenheit des tTA-Protein zu einer EGFPm-Expression und damit zur Fluoreszenz der Zelle führten. Die Pax6-Expression ist in vielen Teilen des ZNS sehr detailliert beschrieben; es wurden aber zusätzlich Pax6-mRNA-ISHs und Anti-Pax6-Antikörperfärbungen für Vergleiche herangezogen, insbesondere dort, wo in der Literatur noch keine Beschreibungen vorliegen.

In dieser Arbeit wird von einer räumlich parallelen Expression (oder Koexpression) ausgegangen, wenn ein bestimmter, morphologisch abgrenzbarer Teil des ZNS, also beispielsweise eine Schicht, ein Segment oder eine longitudinale Platte, sowohl in der Reporter- als auch in der Pax6-Färbung angefärbt ist, die beiden Färbungen also kolokalisiert sind. Dies entspricht einer gewebsspezifischen Koexpression. Auf zellulärer Ebene kann der Vergleich zweier unabhängiger Färbungen oft nur Hin-

weise auf eine Kolo-kalisation der beiden untersuchten Moleküle geben. Um zu zeigen, dass beide in den selben Zellen exprimiert werden, sind, speziell bei einzelnen angefärbten Zellen, Doppelfärbungen mit beiden Nachweismethoden an ein und dem selben Präparat notwendig. Sind in einem bestimmten Gewebe *alle* Zellen in beiden Nachweismethoden angefärbt, muss natürlich von einer Kolo-kalisation beider Moleküle auch auf zellulärer Ebene ausgegangen werden.

In zeitlicher Hinsicht sind geringfügige Abweichungen von bis zu einem Tag nicht signifikant. Sie können bedingt sein durch eine unterschiedliche Zuordnung der jeweiligen Embryonen zu Entwicklungsstadien. Gerade beim Vergleich mit Literaturangaben ist eine einheitliche Zuordnung nicht vorzusetzen. Zu berücksichtigen ist auch, dass der Expressionsverlauf hier in Abständen von wenigstens einem Tag untersucht worden ist, über kürzere Unterteilungen also per se keine Aussage möglich ist. Schließlich ist der Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises auch von der Nachweisebene (mRNA, Protein oder Enzym) und der Empfindlichkeit des verwendeten Verfahrens abhängig.

#### 4.2.1 Übereinstimmungen und Unterschiede im Expressionsverlauf

Zwischen der Expression von Pax6 und taulacZ in  $P_{hPax6}$ -taulacZ-transgenen Mäusen besteht eine hohe Übereinstimmung. Sowohl die räumliche Verteilung als auch der zeitliche Ablauf decken sich im Verlauf der Entwicklung des ZNS meist. In den abweichenden Fällen fehlt die Expression von taulacZ in Pax6-exprimierendem Gewebe, während umgekehrt keine ektopische Expression von taulacZ in Pax6-negativem Gewebe festgestellt wurde. Wie unten näher ausgeführt wird, lässt sich dies am einfachsten so interpretieren, dass in der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Maus einige gewebsspezifische Enhancerelemente fehlen (siehe Kapitel 4.2.2 „Regulation der Pax6-Expression“).

**Beispiele für Übereinstimmungen:** Da die Expression von Pax6 und taulacZ in den meisten Fällen übereinstimmt, werden hier nur einige Beispiele aufgeführt. Die vielleicht bemerkenswerteste Übereinstimmung der Expression von Pax6 und taulacZ besteht hinsichtlich der Expression in Ventrikulärzonenzellen. In der Ventrikulärzone befinden sich in der Entwicklung des ZNS die mitotisch aktiven neuronalen Stammzellen. In Rückenmark (Abb. 18), Medulla (Abb. 19, Abb. 21), Diencephalon (p3), Hypothalamus, Subpallium und Pallium (Abb. 24 – Abb. 27) wird taulacZ wie Pax6 in bestimmten dorso-ventralen Abschnitten der Ventrikulärzone exprimiert. Mit Ausnahme des Diencephalons, das unten gesondert diskutiert wird, stimmt die Expression in den Ventrikulärzonenzellen sowohl von ihrem zeitlichen Verlauf als auch ihrer räumlichen Ausdehnung in allen Hirnteilen überein. Die X-Gal-Färbung offenbart, dass es sich bei den meisten dieser ventrikulären Zellen um radiale Gliazellen handelt.

Nicht allein die Aktivierung und räumliche Ausdehnung der Expression stimmt hier überein, sondern auch ihre Beendigung in den postmitotischen Zellen. Wie bei Pax6 findet man in den meisten Bereichen des ZNS keine taulacZ-Expression in den Zellen, die die Ventrikulärzone verlassen und entlang von radialen Gliazellfasern in die äußeren Zonen des Neuralrohrs wandern. Das bedeutet, dass taulacZ in den meisten postmitotischen Zellen ausgeschaltet wird.

In der unteren Rautenlippe und den von ihr ausgehenden externen präzerebellären Wanderungen sowie in den Zellen am dorsalen Rand der Flügelplatte des Rückenmarks wurden keine Unterschiede in der Expression von taulacZ und Pax6 festgestellt. Die Zellen des Brückenstroms sind während ihrer gesamten Wanderung stark angefärbt (Abb. 22), während die des cuneoreticulären Wanderungsstroms schwächer angefärbt und in der X-Gal-Färbung erst nach Kontrastverstärkung gut sichtbar sind (Abb. 20 D). In den  $P_{hPax6}$ -tTA-Mäusen sind beide Wanderungen nach Gentransfer von Reporterkonstrukten angefärbt (Abb. 30 C). Das Ausschalten der taulacZ-Expression erfolgt wie das von Pax6 erst mit Erreichen der Zielgebiete, nicht direkt nach der letzten Zellteilung.

Die im folgenden dargestellten Unterschiede in der Expression können danach klassifiziert werden, ob die Expression von *taulacZ* komplett fehlt, zu spät einsetzt oder zu früh beendet wird.

***Fehlende taulacZ-Expression.*** *taulacZ*-Expression fehlt komplett in der Pax6-positiven proximalen Population von Intermediärzonenzellen in der Medulla (Abb. 21). Sie fehlt auch in Pax6-positiven Intermediärzonenzellen an ähnlicher dorso-ventraler Position im Mesencephalon und im posterioren Prätektum (p1; beides nicht gezeigt) und möglicherweise auch in den Intermediärzonenzellen des Rückenmarks (Abb. 18). Aufgrund der ähnlichen Position dieser Zellpopulationen werden sie im folgenden als eine Gruppe behandelt („Intermediärzonenzellen“). Zu beachten ist allerdings, dass die distale Population von Intermediärzonenzellen der Medulla, die sowohl Pax6 als auch *lacZ* exprimiert, in dieser Gruppe nicht enthalten ist.

***Zu spät einsetzende taulacZ-Expression.*** In Prosencephalon, Auge und Oberflächenektoderm der Kopfreion beginnt die *taulacZ*-Expression etwa 1 Tag später als die Pax6-Expression (nicht gezeigt). Da *taulacZ* im Rückenmark etwa zeitgleich mit Pax6 ab E8.5 exprimiert wird, scheint diese Abweichung signifikant zu sein. Von diesen frühen Stadien wurden nur X-Gal-Färbungen angefertigt, so dass auch ein posttranskriptioneller Effekt als Ursache in Betracht kommt.

Noch wesentlich länger, nämlich für 4 Tage, fehlt die Expression von *taulacZ* in p1 und p2 im Diencephalon (Abb. 24, Abb. 25 und nicht gezeigt). Dies ist sicherlich die auffälligste Abweichung des *taulacZ*- vom Pax6-Expressionsmuster im gesamten ZNS.

***Zu früh beendete taulacZ-Expression.*** Die Zellen der oberen Rautenlippe exprimieren zwar zunächst sowohl *taulacZ* als auch Pax6 (Abb. 23 A–D), jedoch ist die Expression von *taulacZ* nicht dauerhaft. (Die an E14.5 ebenfalls auftretende Diskrepanz zwischen *lacZ*-mRNA-Expression und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wird in Kapitel 4.2.4 „Posttranskriptionelle Inhibition der tau- $\beta$ -Galactosidase“ behandelt). An E18.5, wenn diese Zellen das gesamte Kleinhirn besiedelt haben und die äußere Körnerzellschicht bilden, wird gar keine *taulacZ*-Expression mehr gefunden (Abb. 23 E–H). Auch die adulte Pax6-Expression in Körnerzellen wird von *taulacZ* nicht kopiert (nicht gezeigt).

Zwei der Wanderungen von Pax6-exprimierenden Zellen im Telencephalon sind zwar anfänglich für *taulacZ* positiv, schalten diese Expression jedoch früher aus als die Pax6-Expression. Dies sind die Wanderung zum Nucleus entopeduncularis im Hypothalamus und die Wanderung zur Marginalzone der Paläocortex im Pallium. Bezüglich des Expressionsverlaufs von *taulacZ* ähneln sie somit den Körnerzellen des Kleinhirns.

Eventuell nimmt die *taulacZ*-Expression auch in einigen Pax6-positiven Zellen der Amygdala einen ähnlichen Verlauf. Bei diesen Zellen ist die Herkunft unklar. An E18.5 exprimieren sie jedenfalls kein *taulacZ*, obwohl sie Pax6-positiv sind (Abb. 27). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Pax6 in diesen Zellen zu keinem Zeitpunkt exprimiert wird.

## 4.2.2 Regulation der Pax6-Expression

Die gewebs- und entwicklungsspezifische Expression von Pax6 wird durch eine Vielzahl von cis- und trans-Elementen, Enhancern und Silencern, kontrolliert. Identifiziert wurden bislang Elemente, die eine Expression in den folgenden Geweben bewirken (Kammandel et al. 1999; siehe Abb. 2): Pankreas (Element A, vor Exon 0), Linse und andere ektodermale Derivate des Auges (Element B, vor Exon 0), nasale und temporale Retina (Element D oder  $\alpha$ -Element, zwischen Exon 4 und 5). Ferner wurde eine 5 kb große Region zwischen Exon 0 und Exon 1 isoliert, die offenbar Elemente enthält, die zur Expression im dorsalen Telencephalon, im Rhombencephalon und im Rückenmark führen (Element C). Diese Region wurde jedoch von den Autoren nicht näher analysiert, wie überhaupt ein präziser Vergleich der endogenen Pax6-Expression mit der transgenen Reporterexpression im ZNS, vor

allem deren Zeitverlauf, nicht gezeigt wird (Kammandel et al. 1999). All diese Elemente zusammen ergeben noch nicht das komplette Expressionsmuster von Pax6, so dass davon ausgegangen werden muss, dass zusätzliche, weiter vom Pax6-Gen entfernte Kontrollelemente existieren. Beim Menschen führen über 100 kb von der transkribierten Region entfernte chromosomale Bruchpunkte zu einem Aniridia-Phänotyp, was auf weit entfernte Kontrollelemente schließen lässt (Fantès et al. 1995).

Die Elemente A – D sind im YAC Y593 und seinen Derivaten, die hier zur Herstellung von  $P_{hPax6}$ -Linien verwendet wurden, vollständig enthalten. Ihre Sequenzen weisen zwischen Maus und Mensch mehr als 95% Identität auf (Kammandel et al. 1999). Soweit aus den Abbildungen in Kammandel et al. (1999) ersichtlich, sind die von den Elementen B, C und D kontrollierten Expressionsdomänen auch in  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen angefärbt. Der Pankreas (Element A) wurde nicht untersucht. Keines der veröffentlichten Kontrollelemente scheint jedoch zu einer frühen Expression in p1 und p2 zu führen. Möglicherweise liegt ein regionspezifische Enhancer für p1 und p2 außerhalb des bislang untersuchten Bereichs und ist auch in  $P_{hPax6}$ -taulacZ nicht enthalten. Für die weitere Diskussion wird die Hypothese aufgestellt, dass in dieser Linie ein „p1/p2-Enhancer“ fehlt.

Die Körnerzellen des Kleinhirns, die Zellen des Nucleus entopeduncularis im Hypothalamus und die Marginalzonenzellen des Paläocortex weisen in der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Maus eine bemerkenswerte Parallelität im Expressionsverlauf von taulacZ auf. In allen Zelltypen wird taulacZ zunächst exprimiert (um E14.5 herum), später (E18.5) jedoch nicht mehr, während Pax6 bis ins Adultstadium in diesen Zellen vorhanden ist. Diesen Zellen ist weiterhin gemeinsam, dass es sich um Neuronen handelt und dass sie relativ lange Strecken wandern. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten, besonders wegen der parallelen Regulation der taulacZ-Expression, läßt sich die Hypothese formulieren, dass für die dauerhafte Expression von Pax6 (oder taulacZ) in diesen Zellen die selben genetischen Kontrollelemente erforderlich sind, und dass diese Elemente in der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Linie nicht funktionell sind (fehlende „dauerhafte neuronale Expression“).

Ein weiterer Zelltyp, in dem die Reporterexpression von der Pax6-Expression abweicht, sind die Intermediärzonenzellen in Medulla, Mesencephalon, Prätectum und eventuell im Rückenmark. Auch diese fehlende Expression lässt sich am einfachsten durch die Abwesenheit von gemeinsamen, zelltypspezifischen Kontrollelementen erklären (fehlender „Intermediärzonenzellen-Enhancer“).

Sowohl bei den Intermediärzonenzellen als auch bei der zuvor betrachteten dauerhaften neuronalen Expression besteht natürlich die Möglichkeit, dass die Expression in den diversen Zellpopulation vollkommen unabhängig voneinander reguliert wird. Dies würde jedoch bedeuten, dass zufällig genau die Kontrollelemente fehlen oder inaktiv sind, die in Zellen, die sich aufgrund ihrer Position (Intermediärzonenzellen) oder ihrer Wanderung und ihres Expressionsverlauf (Kleinhirn, Nucleus entopeduncularis, Paläocortex) ähneln, für die Expression von Pax6 erforderlich sind. Da letztere Möglichkeit deutlich komplexer ist, wird hier die einfacherere Hypothese bevorzugt. Das heißt, dass es neben ortsspezifischen auch zelltypspezifische Kontrollelemente in der Pax6-Region gibt, die Körnerzellen des Kleinhirns, die Zellen des Nucleus entopeduncularis im Hypothalamus und die Marginalzonenzellen des Paläocortex einen derartigen, die Intermediärzonenzellen in Medulla, Mesencephalon, Prätectum und eventuell im Rückenmark einen weiteren, von einem zelltypspezifischen Kontrollelement kontrollierten Zelltyp bilden und dass diese beiden zelltypspezifischen Kontrollelemente in der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Maus inaktiv sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten also darauf hin, dass zusätzlich zu den identifizierten 4 Elementen (Kammandel et al. 1999) noch mindestens 3 weitere Kontrollelemente an der Steuerung der Pax6-Expression beteiligt sind. Dies sind der regionspezifische p1/p2-Enhancer und die zelltypspezifischen Enhancer für die dauerhafte neuronale Expression und die Expression in Intermediärzellen. Aufgrund des jeweils unterschiedlichen Expressionsverlaufs ist es unwahrscheinlich, dass diese En-



hancer voneinander abhängig oder gar miteinander identisch sind. Durch Vergleich der nicht-kodierenden genomischen Sequenzen aus der Pax6-Region von Mensch, Pufferfisch und Maus werden einige bislang nicht beschriebene konservierte Elemente identifiziert, die zusätzliche Kontrollelemente sein könnten (D. Engelkamp, unveröffentlichte Daten).

Verschiedene Ursachen kommen für das Fehlen oder die Inaktivität dieser Kontrollelemente in der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Maus in Betracht: (1) die Elemente liegen außerhalb der auf dem YAC Y593 enthaltenen Region (je etwa 200 kb beiderseits des menschlichen Pax6-Gens), (2) die menschlichen Elemente sind in Y593 enthalten, jedoch in der Maus inaktiv, (3) durch die Einführung des Reportergens taulacZ in Y593 wurden die Elemente inaktiviert oder (4) der YAC Y593-CtaulacZ ist nur unvollständig oder in mehreren Teilen in das Genom der Linie  $P_{hPax6}$ -taulacZ integriert.

Die Analyse von Y593-transgenen Mäusen spricht – zumindest im Kleinhirn – gegen die Möglichkeiten (1) und (2) (Schedl et al. 1996). Eine der dort beschriebenen Y593-transgenen Linien (PAX88) weist 2 – offenbar vollständige – Kopien des YACs auf. Diese Linie führt zur Rettung des Phänotyps von homo- und heterozygoten Pax6<sup>Sev</sup>-Mutanten. In einer anderen Linie (PAX130) mit ebenfalls 2 Kopien ist das YAC nur teilweise integriert und bricht 3' vom Pax6-Gen ab, nach etwa 7 – 15 kb. Diese Linie rettet den homozygoten Pax6<sup>Sev/Sev</sup>-Phänotyp nicht. Im Kleinhirn ist die Menge menschlicher Pax6-mRNA in PAX130 auf weniger als 10% reduziert, verglichen mit der Maus-Pax6-mRNA. In PAX88 wird die transgene hPax6-mRNA etwa gleich stark wie mPax6-mRNA exprimiert (Schedl et al. 1996). Dies zeigt, dass Y593 offenbar ausreicht, um ein normales Expressionsniveau von Pax6 im Kleinhirn zu erreichen. Die Erklärungen (1) und (2) sind somit unwahrscheinlich. Die Expression ist jedoch von Kontrollelementen abhängig, die in der Linie PAX130 fehlen und möglicherweise im 3'-Bereich von Pax6 liegen. In der Linie  $P_{hPax6}$ -taulacZ ist die Expression im adulten Kleinhirn deutlich reduziert: Bergmann-Gliazellen exprimieren das Reportergen, die wesentlich zahlreicheren Körnerzellen dagegen nicht (nicht gezeigt). Zusammen unterstützen diese Daten die Hypothese (4), dass die reduzierte Expression im Kleinhirn durch eine partielle Integration des YACs in der Linie  $P_{hPax6}$ -taulacZ verursacht ist. Die fehlenden Kontrollelemente befinden sich vermutlich 3' von Pax6.

Um direkt zu zeigen, dass in  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen der YAC nur partiell integriert ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Durch den hier angewandten PCR-Nachweis der Transgenintegration lassen sich nur kurze Fragmente nachweisen, ohne allerdings Aussagen über ihre Position und damit über die Integrität des YACs über größere Bereiche zu erlauben. Über das Vorhandensein der restlichen, weit größeren Abschnitte der YAC-DNA im Genom der transgenen Mäuse kann keine direkte Aussage getroffen werden.

Hinweise auf die Ursache der beobachteten Abweichungen in  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen kann auch eine Untersuchung des Expressionsmusters in der Linie  $P_{hPax6}$ -tTA geben. Sofern dort die selben Abweichungen der Reportergenexpression von der Pax6-Expression gefunden werden, spricht dies dafür, dass auf dem YAC Y593 einige Kontrollelemente fehlen (1) oder inaktiv sind (2) oder durch die Insertion des Reportergens inaktiviert wurden (3). Sollten dagegen keine oder vollkommen andersartige Abweichungen gefunden werden, sind diese vermutlich durch unvollständige Integration des YAC bedingt (4). Vorläufige Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass tTA in der Embryonalentwicklung in allen Körnerzellen exprimiert wird, also keine Abweichungen zur Pax6-Expression vorhanden sind (D. Engelkamp und S. Flunkert, unveröffentlichte Daten). Damit scheint es sehr wahrscheinlich, dass die fehlende Expression in den Körnerzellen von  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen durch eine partielle Integration des YACs bedingt ist, die zum Verlust eines Körnerzellspezifischen Enhancers führt (4).

### 4.2.3 Pax6 exprimierende Zelltypen

Bislang konnte die Morphologie Pax6-exprimierender Zellen nicht direkt dargestellt werden. Zu Aussagen über Zelltypen gelangte man ausschließlich über aufwändige Kolokalisationsuntersuchungen von Zelltyp-Markern mit dem nukleären Pax6-Protein oder der Pax6-mRNA. Durch die transgene Linie  $P_{hPax6}$ -taulacZ wird die Darstellung der Morphologie und damit die Zuordnung der Pax6-positiven Zellen zu verschiedenen Zelltypen radikal vereinfacht. Anhand ihrer Morphologie und des Verlaufs ihrer Expression wird hier eine Einteilung der Pax6-exprimierenden Zellen in Klassen vorgeschlagen. Pax6-exprimierende Zellen dieser Klassen werden jeweils in mehreren Hirnteilen gefunden und befinden sich dort in vergleichbaren Positionen. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Expression von Pax6 nicht bloß zufällig mit bestimmten Zelltypen korreliert ist, sondern dass es einen ursächlichen Zusammenhang gibt.

**Neuroepithelzellen.** Pax6 wird erstmals in Neuroepithelzellen unmittelbar nach Verschluss des Neuralrohrs aktiviert. Neuroepithelzellen sind die frühen Stammzellen des Nervensystems mit hoher Teilungsaktivität. Ihr Soma befindet sich in der Nähe des Ventrikels. Von ihm gehen zwei Fortsätze aus, mit denen die Zellen sowohl die apikale als auch die basale Oberfläche des Neuroepithels kontaktieren. Bis auf die Zellen der Dach- und der Bodenplatte wird Pax6 im gesamten Querschnitt des Neuralrohrs in Rückenmark, den Rhombomeren 2 bis 7 und im Prosencephalon einschließlich des Augenbläschens ab etwa E8 exprimiert (Walther und Gruss 1991; Grindley et al. 1995). Aufgrund des Erscheinungsbildes in X-Gal-Färbungen von  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen sind in allen diesen Regionen Neuroepithelzellen angefärbt. Ihre charakteristische Ausdehnung von der apikalen bis zur basalen Oberfläche des Neuroepithels mit Endfüßen an beiden Oberflächen ist gut zu erkennen. Die Endfüße sind in der X-Gal-Färbung als stark angefärbte Punkte gut zu erkennen, während die Fortsätze und das Zellsoma schwächer angefärbt sind (vgl. Abb. 18 B, Abb. 19 A, Abb. 28 A). In  $Pax6^{Sey/Sey}$ -Mäusen sind bezüglich der Anfärbung und der Gestalt von Neuroepithelzellen keine Unterschiede zu erkennen.

**Radiale Gliazellen.** Radiale Gliazellen weisen die selbe Morphologie wie Neuroepithelzellen auf mit zwei langen Fortsätzen und einem ventrikelnahen Soma. Sie sind ebenfalls Stammzellen und generieren Neuronen und Gliazellen (Noctor et al. 2001). Pax6 wird in radialen Gliazellen des Palliums stark exprimiert, wie durch Dissoziation kortikaler Zellen und anschließende Immunfluoreszenzfärbung gezeigt wurde (Götz et al. 1998). In dieser Arbeit wird bestätigt, dass der menschliche Pax6-Promotor tatsächlich in den radialen Gliazellen des Palliums aktiv ist. Doch nicht nur im Pallium wird Pax6 in radialen Gliazellen exprimiert: Auch in Subpallium, Retina, Hypothalamus, Thalamus, Medulla und Rückenmark werden in X-Gal-Färbungen von  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen während der Embryonalentwicklung radiale Gliazellen angefärbt. Dies wird in dieser Arbeit erstmals demonstriert.

Damit wird Pax6 mit Ausnahme von Kleinhirn und Mesencephalon in allen Hirnteilen, in denen es während der ZNS-Entwicklung nachzuweisen ist, außer in verschiedenen postmitotischen Zelltypen auch in radialen Gliazellen exprimiert. Da radiale Gliazellen nach den Neuroepithelzellen die proliferierenden Stammzellen während der embryonalen Neurogenese sind (Noctor et al. 2001), ist es reizvoll zu spekulieren, dass auch die postmitotisch Pax6-exprimierenden Neurone aus Pax6-positiven radialen Gliazellen hervorgehen. Die Stammzellen könnten so – neben der Generierung – mit Hilfe ihrer radialen Fasern auch die Leitung ihrer Tochterzellen in ihre endgültige Position sicherstellen. Diese Hypothese kann mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit generierten inaktivierten EGFP-Variante als klonalem Marker direkt überprüft werden. Die Anfärbung von Pax6-positiven radialen Gliazellen in ihrer gesamten Ausdehnung durch den transgenen Reporter tau- $\beta$ -Galactosidase wird durch Kolokalisationsuntersuchungen die Identifizierung und Untersuchung von Subtypen radialer Gliazellen in situ ermöglichen.

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen sind die radialen Gliazellen im Pallium von unregelmäßiger Gestalt (Götz et al. 1998) und es treten Störungen in der Schichtbildung des Cortex auf mit ektopischen Akkumulationen von postmitotischen Zellen in der Subventrikulärzone (Schmahl et al. 1993). In X-Gal-Färbungen von Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-P<sub>hPax6</sub>-taulacZ-Mäusen sind radiale Gliazellen und ektopische Zellen in der Subventrikulärzone angefärbt. Auch hier kann die periphere Lokalisierung des Reportergens in Kollokalisierungsstudien zur Aufklärung der Ursachen dieses Phänotyps beitragen. Die vergleichende Untersuchung verschiedener Hirnteile lässt Rückschlüsse auf mögliche allgemeine Defekte radialer Gliazellen zu und könnte so helfen, eine generelle Erklärung für die zentralnervösen Defekte von Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen aufzustellen.

In der adulten Retina sind vereinzelte Müllerzellen, der spezialisierte Gliazelltyp der Retina, stark für  $\beta$ -Galactosidase immunreaktiv (Abb. 29 C). In-situ-Hybridisierungen mit Proben gegen lacZ- und Pax6-mRNA ergaben ein identisches Färbemuster mit einzelnen positiven Zellen in der Position der Müllerzellsomata (nicht gezeigt), so dass es sich bei diesen Müllerzellen höchstwahrscheinlich um Pax6-positive Zellen handelt. Expression in adulten Müllerzellen wurde für Pax6 in der Maus bisher nicht beschrieben. Im Hühnchen haben Müllerzellen das Potential, nach langer Ruhephase mitotisch aktiv zu werden und die neuronalen Zelltypen der Retina zu regenerieren. Bei akuter Schädigung der Retina treten einige Müllerzellen wieder in den Zellzyklus ein und exprimieren dann unter anderem Pax6 (Fischer und Reh 2001). In der Retina der Maus ist Pax6 für die Multipotenz von Stammzellen während der Embryonalentwicklung erforderlich (Marquardt et al. 2001). Möglicherweise handelt es sich bei den Pax6- und  $\beta$ -Galactosidase-positiven Müllerzellen um teilungsaktive Zellen. Die Markierung mit  $\beta$ -Galactosidase wird weitere Untersuchungen dieser Zellen erlauben.

**Ependymzellen.** Als Ependymzellen werden Zellen an der apikalen Oberfläche des Neuroepithels bezeichnet, die in direktem Kontakt mit dem Liquor stehen. Im Gegensatz zu radialer Glia weisen sie keine langen Fortsätze auf. In der Flügelplatte des Rückenmarks sind Zellen beschrieben worden, die Pax6-mRNA bis mindestens E15.5 exprimieren und deren Soma an den Zentralkanal angrenzt. Aufgrund ihrer Lage wurden sie als Ependymzellen bezeichnet (Walther und Gruss 1991). Auch in der X-Gal-Färbung von P<sub>hPax6</sub>-taulacZ-Mäusen werden in dieser Position Zellen angefärbt. Viele dieser Zellen sind radiale Gliazellen. Im dorsalen Teil der Flügelplatte tritt jedoch keine Anfärbung von langen basalen Fortsätzen und Endfüßen auf, so dass es sich um Ependymzellen zu handeln scheint (Abb. 18 H).

Außerhalb des Rückenmarks ist bislang keine Expression von Pax6 in Ependymzellen beschrieben worden. Die X-Gal-Färbung von P<sub>hPax6</sub>-taulacZ-Mäusen zeigt jedoch einen Streifen vom Mesencephalon bis an die Spitze des Prosencephalons, in dem entlang der Mittellinie Zellen in der Ventrikulärzone schwach angefärbt sind (vgl. Abb. 26 C und Abb. 27 C, D). Diese Zellen scheinen Ependymzellen zu sein. In einer Negativkontrolle, der mRNA-ISH von Wildtyp-Mäusen mit lacZ, ist dieser Streifen nicht angefärbt. Augenscheinlich haben diese Zelle keine radiale Morphologie und sind auch weniger stark für Pax6 positiv als radiale Gliazellen. Obwohl diese Ependymzellen bislang nicht beschrieben werden, sind sie doch auf Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Färbungen verschiedener Autoren zu erkennen (Kawano et al. 1999; Vitalis et al. 2000; Valverde et al. 2000). Diese Expression ist durchgängig von E12.5 bis mindestens E18.5. In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen ist die Expression in diesen Zellen auffälliger. Die Funktion dieser Zellen ist unklar.

**Kommissurale Projektionen.** In X-Gal-Färbungen von Rückenmark und Medulla sind Fasern in der ventralen Kommissur transient um E11.5-E12.5 angefärbt (Abb. 18 D, Abb. 19 F). Dies lässt auf eine Expression von taulacZ und Pax6 in Zellen schließen, die über die ventrale Kommissur projizieren. In der Kommissur selbst sind nur Fasern angefärbt, keine Somata. Wo sich die Somata dieser Projektionsneurone befinden, lässt sich anhand der X-Gal-Färbungen nicht mit Sicherheit ermitteln. Bis in die stark angefärbte Ventrikulärzone lassen sich die Fasern verfolgen, dann verlieren sie sich vor dem

Hintergrund der stark angefärbten Radialglia-Somata. Im Rückenmark gibt es eine Vielzahl von Zellpopulationen, die Fortsätze in die ventrale Kommissur entsenden mit Somata sowohl in der Ventrikulär- als auch der Intermediärzone (Wentworth 1984; Silos-Santiago und Snider 1992). Aufgrund des Verlaufs der angefärbten Fasern könnte es sich um junge kommissurale Neurone handeln, die die Ventrikulärzone noch nicht verlassen haben. Pax6-Expression wurde in Neuronen, die über die ventrale Kommissur projizieren, bislang nicht beschrieben.

**Intermediärzonenzellen.** Im Vorderhorn des Rückenmarks gibt es eine Gruppe von Pax6-positiven Zellen, die aus der Ventrikulärzone radial dorthin wandern (Walther und Gruss 1991). Diese Zellen lassen sich in X-Gal-Färbungen nicht zweifelsfrei identifizieren, da sie sich in einem Gebiet befinden, das von stark angefärbten Pax6-positiven Radialgliafasern durchzogen wird (vgl. Abb. 18 D, E). Auch in der Medulla befinden sich in der ventralen Intermediärzone Pax6-positive Zellen (D. Engelkamp, unveröffentlicht). Sie bilden zwei Populationen, eine proximale, näher am Ventrikel gelegene, und eine distale (Abb. 21 C, E). Von diesen beiden Pax6-positiven Populationen exprimiert in  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen nur die distale taulacZ. Ferner sind an vergleichbarer Position im Mesencephalon und in p1 Intermediärzonenzellen Pax6-positiv, die wie die proximale Population im Rhombencephalon taulacZ nicht exprimieren.

Alle diese Intermediärzonenzellen liegen in einem von vielen Pax6/taulacZ-positiven radialen Gliazelten durchzogenen Bereich. Die Hypothese, dass Pax6-positive Stammzellen Pax6-positive Tochterzellen generieren und diese entlang der Fasern der Mutterzelle zu ihrem Zielort gelangen, drängt sich bei Betrachtung der Medulla geradezu auf (vgl. Abb. 21 A mit C). In Pax6<sup>Sey/Sey</sup>-Mäusen fehlt offenbar eine der beiden Pax6-positiven Populationen im Mesencephalon (Abb. 21 D); es scheint daher, als sei Pax6 zumindest teilweise für die Entstehung oder die richtige Wanderung von Intermediärzonenzellen erforderlich.

**Zellen am dorsalen Rand der Flügelplatte.** In Rückenmark, Medulla und im Prosencephalon in p1 sind Zellen an der Grenze zwischen Flügel- und Dachplatte Pax6-positiv (vgl. Abb. 18 F, G, Abb. 21 H, Abb. 25 A). Diese Zellen ähneln mit ihrer langen, gestreckten Gestalt und ihren angefärbten Endfüßen Neuroepithelzellen. Pax6-Expression setzt in diesen Zellen relativ spät, ab E11.5 ein (Engelkamp et al. 1999). Außer durch Pax6 werden die Zellen in Medulla und Rückenmark durch einige weitere Markermoleküle, darunter MATH-1, charakterisiert (Wingate 2001). Weitere Untersuchungen können zeigen, ob auch mit den Zellen in p1 Gemeinsamkeiten bestehen, die über die Position und die Expression von Pax6 hinausgehen.

**Neurophil wandernde Zellen.** Viele tangential wandernde Neurone exprimieren Pax6, so zum Beispiel fast alle Wanderungen von der Rautenlippe (Engelkamp et al. 1999). Weiter wird Pax6 in der tangentialen Kettenwanderung zum Riechkolben exprimiert (nicht gezeigt). Pax6 ist für diese tangentialen Wanderungen erforderlich, wie der Phänotyp der Small-eye-Mutante mit Wanderungsdefekten der Körnerzellen, des cuneoreticulären Stroms und des Brückenstroms zeigt (Engelkamp et al. 1999).

#### 4.2.4 Posttranskriptionelle Inhibition der tau-β-Galactosidase

In einigen Hirnregionen konnte keine β-Galactosidase-Aktivität in der X-Gal-Färbung nachgewiesen werden, obwohl lacZ-mRNA vorhanden war. Dies war zum Beispiel der Fall an E14.5 im Kleinhirn (laterale Ventrikulärzone und mediale EGL) und in der adulten Retina (Ganglienzellen, Amakrinzellen, Horizontalzellen). In der Medulla war die β-Galactosidase-Aktivität in r5 und r6 von E9.5 bis P0 deutlich reduziert, obwohl die lacZ-mRNA gleichmäßig in allen Rhombomeren exprimiert wurde. In diesen Regionen findet also eine Transkription der taulacZ-DNA in mRNA statt. Posttranskriptionell wird jedoch die Expression von funktioneller β-Galactosidase reduziert, beziehungsweise verhindert. Diese Inhibition kann verschiedene Ursachen haben.

Die mRNA, die vom YAC Y593-*taulacZ* hergestellt wird, enthält die ersten 8 Exons des menschlichen Pax6-Gens, danach eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und schließlich das *taulacZ*-Gen. Durch die mRNA-ISH wird das *lacZ*-Gen nachgewiesen. Da bezüglich der Anfärbung in ISHs kein Unterschied zu anderen *taulacZ*-exprimierenden Regionen besteht, ist davon auszugehen, dass die mRNA auch in den betroffenen Regionen vollständig hergestellt wird und nicht etwa alternativ gespleißt oder unvollständig prozessiert wird. Alternatives Spleißen wurde für Pax6 gezeigt (Mountford und Smith 1995). Durch Antikörperfärbungen wurde in der adulten Retina gezeigt, dass die Abwesenheit der Färbung nicht durch eine gestörte enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase zu erklären ist, sondern dass das Protein dort tatsächlich nicht vorhanden ist.

Die Translation von *taulacZ* wird nicht durch die 5'-Kappe sondern durch die IRES initiiert. Es ist denkbar, dass die Aktivität der IRES in den betroffenen Regionen reduziert ist. Derartige Effekte wurden in transgenen Mäusen bisher jedoch nicht beschrieben (Mountford und Smith 1995). Denkbar wäre auch eine Inhibition der Translation durch einen spezifischen Faktor. Dieser müsste an die Pax6-, an die *tau*- oder an die *lacZ*-Sequenz auf der mRNA binden. Für keine dieser Komponenten sind derartige Effekte bekannt.

Am wahrscheinlichsten erscheint eine Beeinflussung der Expression durch den *tau*-Anteil von *tau*- $\beta$ -Galactosidase. *lacZ* ist ein etabliertes Reportergen, für das keine gewebsspezifische Inhibition bekannt ist (MacGregor et al. 1991). *tau* dagegen kann einen Einfluss auf zelluläre Funktionen haben, gerade in Nervenzellen (siehe Kapitel 4.2.5 „Einfluss von *tau*-Fusionsproteinen auf zelluläre Funktionen“).

Auffällig ist, dass (außer in der Medulla) die posttranskriptionelle Inhibition nur in Neuronen auftritt, und dass diese mit der Differenzierung und Reifung der Zellen zuzunehmen scheint. So wird *tau*- $\beta$ -Galactosidase in der sich entwickelnden Retina in vielen neuronalen Zelltypen nachgewiesen. Alle diese Zelltypen schalten die Proteinexpression im Adultstadium aus. Müller-Gliazellen der Retina exprimieren das funktionelle Enzym dagegen auch noch im Adultstadium. Es könnte also eine neurosenspezifische Inhibition von Proteinsynthese und -transport oder ein stark beschleunigter Abbau von *tau*- $\beta$ -Galactosidase die Ursache für die Abwesenheit des Proteins in diesen Zellen sein. Weitere Untersuchungen, bei denen zum einen *taulacZ* mit Hilfe anderer Promotoren, zum anderen alternative Reportergene unter Kontrolle von  $P_{hPax6}$  exprimiert werden, können diese Hypothese überprüfen.

## 4.2.5 Einfluss von *tau*-Fusionsproteinen auf zelluläre Funktionen

Der *tau*-Anteil von *tau*-Fusionsproteinen kann einen Einfluss auf die Entwicklung und die Funktion von Neuronen haben. Dies wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* direkt gezeigt: Überexpression von *tau*-GFP führt hier zum Verlust von Axonen, Faszikulierungsdefekten, reduzierten sensorischen Verästelungen und axonalen Anschwellungen (Williams et al. 2000). *taulacZ*- und *tau*-Transreporterlinien führen bei Einkreuzen in 5–10% der *Drosophila*-Transaktivatorlinien zur Letalität oder Entwicklungsdefekten, die jedoch nicht eindeutig auf neuronale Defekte zurückzuführen sind (Ito et al. 1997).

*tau* ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das sowohl für die Entwicklung wie für die Stabilisierung von Mikrotubuli wichtig ist (Drechsel et al. 1992). Diese wiederum sind für Wachstum und Funktion von Neuronen unabdingbar (Miller und Joshi 1996). Während der Entwicklung des Nervensystems sind die Auswirkungen von *tau*-Fusionsproteinen noch gering. In *Drosophila* treten die beobachteten Defekte von ektopischer *tau*-GFP-Expression erst mit der Ausreifung der Neuronen auf, oft erst im Adultstadium (Williams et al. 2000). *tau* ist mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert, zum Beispiel der Alzheimerschen Demenz. Transgene Mausmodelle, die verschiedene Isoformen von menschlichen *tau* überexprimieren, weisen neuropathologische Defekte auf, die teilweise denen menschlicher neurodegenerativer Erkrankungen entsprechen (Götz 2001). Auch die Defekte in *tau*-

GFP-überexprimierenden Fliegen sind den Veränderungen bei menschlichen Erkrankungen ähnlich (Williams et al. 2000).

Sofern *taulacZ* auch in der Maus die Ausreifung von Neuronen beeinträchtigt, könnte dies eine Erklärung für die beobachtete posttranskriptionelle Inhibition der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität sein. Diese Inhibition ist besonders auffällig in der adulten Retina, wo *taulacZ*-mRNA in Ganglienzellen, Amakrinzellen und Horizontalzellen (alles Neurone) und in Müller-Gliazellen gefunden wird, das Protein jedoch nur in den Müller-Gliazellen nachzuweisen ist. Für die weitere Aufklärung der Rolle von radialen Gliazellen sind andererseits keine störenden Auswirkungen der *taulacZ*-Expression zu erwarten.

Die immer klarer werdenden Einschränkungen, die mit tau-Fusionsproteinen als Reportergenen verbunden sind, werfen die Frage auf, ob die weitere Verwendung von *taulacZ* sinnvoll und notwendig ist. Eine Alternative ist das Gen für die menschliche placentale alkalische Phosphatase (PLAP). Seine cDNA ist mit weniger als 2 kb etwa halb so lang wie die von *lacZ*. Durch einen Glykosylphosphatidylinositolanker ist es in der Zellmembran verankert, in der es sich durch zweidimensionale Diffusion verteilt und Neuriten vollständig anfärbt (Fields-Berry et al. 1992). In transgenen Mäusen wurde es erstmals zur Darstellung dopaminerger Neurone der Retina verwendet (Gustincich et al. 1997) und erfährt seitdem eine immer weitere Verbreitung. Die mit PLAP erhaltenen histochemischen Anfärbungen sind denen mit *taulacZ* mindestens gleichwertig. Das Reaktionsprodukt lässt sich auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen darstellen und ist unmittelbar außerhalb der Zellmembran lokalisiert (Gustincich et al. 1997).

Eine weitere Alternative ist der Vitalfarbstoff Grün Fluoreszierendes Protein (GFP). Wie in dieser Arbeit gezeigt, lässt sich durch den Einsatz des binären Tetracyclin-Reportersystems eine so deutliche Verstärkung der Reportergenexpression erreichen, dass frei diffusibles GFP die Zelle vollständig ausfüllt und eine mit Golgi-Imprägnierungen vergleichbare Feinheit der Darstellung erreicht wird. Für dauerhafte Präparate kann das Gewebe mit Paraformaldehyd fixiert werden und GFP direkt durch seine Fluoreszenz oder immunhistochemisch nachgewiesen werden.

### 4.3 Tangentiale Wanderung in vitro

Mit der YAC-transgenen Linie  $P_{hPax6}$ -tTA wurde ein Werkzeug hergestellt, das die gezielte und hochspezifische Expression von beliebigen Transgenen in Pax6-exprimierenden Zellen ermöglicht. In einem ersten Experiment wurde in Pax6-positive Zellen der Rautenlippe das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) eingeführt und das Wanderungsverhalten in vitro über mehrere Tage dargestellt. Dazu wurden zunächst die technischen Voraussetzungen geschaffen: eine GFP-Variante mit starker Fluoreszenz in Maus-Embryonen und die Linie  $P_{hPax6}$ -tTA wurden hergestellt, der Gentransfer durch Elektroporation sowie ein Filterkultursystem der Medulla wurden etabliert.

Konstrukte mit dem Promotor/Enhancer des Zytomegalievirus (CMV-Promotor) werden hauptsächlich in radialen Gliazellen exprimiert (Abb. 30 A, B), jedoch kaum in Zellen der Rautenlippe. Die Zellen der Rautenlippe sind in der Lage, DNA aufzunehmen, wie die Elektroporation von tTA-kontrollierten Reporterkonstrukten zeigt. Obwohl sie also vermutlich auch CMV-Konstrukte aufnehmen, führt dies zu keiner Expression. Der CMV-Promotor wird häufig als starker Promotor in Säugetiersystemen eingesetzt. Er ist in den meisten Zelltypen hochaktiv, kann aber durch verschiedene Faktoren wie zellulären Stress (Larsson et al. 1998) oder intrazelluläre Signalmoleküle wie cAMP (Neuman et al. 1995) moduliert werden. Möglicherweise ist die Ursache für die geringe Expression von CMV-Konstrukten in der Rautenlippe eine zelltypspezifische Inhibition des Promotors.

Durch Elektroporation von tTA-kontrollierten Reporterkonstrukten konnte in Medulla-Filterkulturen von  $P_{hPax6}$ -tTA-Mäusen dagegen eine starke und hochspezifische Expression in der Rautenlippe erzielt werden (Abb. 30 C, Abb. 31). Der Anteil transformierter Zellen an der Gesamtzahl der Transgen-exprimierenden Zellen in der Rautenlippe war bemerkenswert hoch. Dies zeigt der Vergleich mit der X-Gal-Färbung der Medulla der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Maus (Abb. 20 D). Die Zahl markierter wandernder Zellen schien in den GFP-Präparaten etwa gleich hoch zu sein. Um die Transformationseffizienz genau zu bestimmen, sind Doppelfärbung mit Pax6-Antikörpern erforderlich.

Durch die Expression von EGFPm wurde die Wanderungsfähigkeit der Zellen offenbar nicht beeinträchtigt, denn diese wanderten in vitro entlang der Pfade von Brückenstrom und cuneoreticulärem Strom. Einige Zellen erreichten nach 3 Tagen in Kultur die kontralateralen Nuclei reticularis lateralis und cuneatus lateralis (Abb. 32). Dies zeigt, dass die elektroporierten Zellen sich in Kultur weitgehend organotypisch entwickeln. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen war je nach Präparat unterschiedlich und schien von der genauen Lage der Präparate auf dem Filter abzuhängen. Bei dem in Abb. 32 gezeigten Präparat entsprach die Geschwindigkeit in etwa derjenigen in vivo.

Aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit bietet dieses Kultursystem hervorragende Möglichkeiten, experimentell in die Wanderung einzugreifen und auf diese Weise die Mechanismen neuronaler Wanderung besser verstehen zu lernen. Die wandernden Zellen des cuneoreticulären Stroms überqueren die Mittellinie nur in einem schmalen Bereich (Pfeilspitzen in Abb. 32 C). Durch einfache Transplantationsexperimente ließe sich zeigen, ob dies durch eine anziehende Wirkung dieses Bereichs oder durch die Abstoßung der angrenzenden Bereiche erreicht wird. Die molekularen Mechanismen dieser zielgerichteten Wanderung lassen sich durch die Möglichkeit der einfachen Transformation der wandernden Zellen aufklären.

Die starke und hochspezifische Expression demonstriert eindrucksvoll, dass die Strategie hinter der Generierung der  $P_{hPax6}$ -tTA-transgenen Mäuselinie richtig war und auch in der Praxis funktioniert: (1) Die Expression von tTA (und mittelbar die von Reporterkonstrukten) ist auf Pax6-exprimierende Zellen beschränkt, Pax6-negative Zellen exprimieren die Reporterkonstrukte nicht. (2) Durch den Transaktivator wird eine Verstärkung der Expression erzielt, so dass das Expressionsniveau in der Rautenlippe deutlich über dem eines starken konstitutiven Promotors liegt. Bei Verwendung cytoplasmatischen EGFPms sind wandernde Neurone über ihre gesamte Ausdehnung angefärbt. (3) Mit Hilfe der  $P_{hPax6}$ -tTA-Mäuse können beliebige Reporterkonstrukte nun auf einfache Weise in Pax6-positive Zellen eingeführt werden.

## 4.4 Ausblick

### 4.4.1 Möglichkeiten mit $P_{hPax6}$ -taulacZ Mäusen

Die periphere Markierung von Pax6-exprimierenden Zellen mit tau- $\beta$ -Galactosidase erlaubt auf einfache Weise Kolokalisierungsuntersuchungen von peripheren Markern und damit die nähere Aufklärung des Zelltyps und der Funktion Pax6-positiver Zellen. Mit Hilfe der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäuse ließen sich die Pax6-exprimierenden Zellen in verschiedenen Teilen des Nervensystems beispielsweise darauf untersuchen, welchem Zelltyp sie aufgrund ihrer Intermediärfilamentexpression zuzurechnen sind (radiale Gliazellen exprimieren RC2 und Nestin, Astrozyten GFAP und Neuronen Neurofilamente), welche Neurotransmitter und Neurotransmitterrezeptoren sie exprimieren sowie welche Signalproteinrezeptoren sich in ihren Wachstumskegeln befinden.

Die Entwicklung radialer Gliazellen aus Neuroepithelzellen sowie ihre unterschiedlichen Phasen während Neurogenese und Gliogenese lassen sich mithilfe der  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäuse näher aufklären. Für

radiale Gliazellen sind eine Reihe von immunocytochemischen Markern verfügbar, die meist Intermediärfilamente oder damit assoziierte Proteine anfärben: Vimentin (Pixley und de Vellis 1984; Meyer et al. 1989; färbt auch Astrozyten an), Nestin (Hockfield und McKay 1985; Frederiksen und McKay 1988; färbt auch multipotente neurale Stammzellen), RC1 (Edwards et al. 1990), RC2 (Misson et al. 1988), das Lipid-bindende Protein BLBP (Feng et al. 1994; Kurtz et al. 1994) und der gliale Glutamat-Transporter GLAST (Shibata et al. 1997). Diese radialen Gliazellmarker werden nicht homogen exprimiert. Eine Untersuchung der Markerexpression in Doppel- und Dreifachfärbungen zeigt, dass  $RC2^+ GLAST^+ BLBP^+$  radiale Gliazellen multipotente Stammzellen sind, während  $RC^+ BLBP^-$  Zellen nur während der Neurogenese auftreten (Hartfuss et al. 2001). taulacZ kann als Marker dienen, der die Verfolgung radialer Gliazellen über die gesamte Entwicklung ermöglicht und so bei der Aufstellung einer Entwicklungssequenz hilfreich sein kann.

Besonders interessant wird sein, ob Pax6-positive Zellen in vergleichbaren Positionen in verschiedenen Hirnabschnitten die selben Marker exprimieren. Sofern dies der Fall ist, kann es sich um homologe Populationen handeln, bei der möglicherweise Pax6 an der Determinierung bestimmter Zelltypen beteiligt ist.

#### 4.4.2 Möglichkeiten mit $P_{hPax6}$ -tTA-Mäusen

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte YAC-transgene Mäuselinie  $P_{hPax6}$ -tTA bildet den Ausgangspunkt für ein neuartiges System zur Beobachtung und gezielten Beeinflussung von wandernden Neuronen. Erstmals können beliebige Expressionskonstrukte gezielt, hocheffizient und schnell in wandernde Neurone eingebracht werden, ohne störende Hintergrundexpression in anderen Zellen. So wird die Beobachtung des Verhaltens modifizierter Zellen in einem unveränderten Umfeld möglich, wodurch nicht-zellautonome Effekte ausgeschlossen werden können. Experimente, die unter Verwendung konventioneller transgener Techniken Jahre dauern, sind nun innerhalb von Wochen durchführbar. Die entscheidende Innovation ist die Kombination des binären Tetracyclin-kontrollierten Expressionssystems mit dem Gentransfer durch Elektroporation. Für die Beobachtung über mehrere Tage wurde ein Kultursystem entwickelt, das eine organotypische Entwicklung und vielfältige experimentelle Eingriffe ermöglicht. Zusammengenommen bilden diese Elemente ein vielversprechendes neues System zur Aufklärung des Ablaufs und der Mechanismen tangentialer neuronaler Wanderungen.

Interessant ist zum Beispiel die Frage, welche Rolle der Chemoattraktor Netrin-1 bei den Wanderungen von der unteren Rautenlippe spielt. Der Netrin-Rezeptor DCC wird von den Brückenstrom-Neuronen exprimiert, und diese reagieren auch positiv auf Netrin-1; allerdings ist Netrin-1 nicht für das Verlassen der Rautenlippe notwendig (Yee et al. 1999; Alcantara et al. 2000). Das Netrin-System ist möglicherweise für einen Teil der Wanderung erforderlich. Durch die ektopische Expression von dominant negativen Netrin-Rezeptoren in den wandernden Zellen ließe sich gezielt dieses Signalsystem ausschalten und analysieren, welche Route die Zellen dann nehmen.

Besonders interessant erscheint die Überquerung der Mittellinie durch die Neuronen des cuneoreticulären Stroms. Allem Anschein nach gibt es einen permissiven Bereich, in dem allein die Mittellinie überquert wird. Verschiedene Transplantationsexperimente, zum Beispiel das komplette Herausschneiden der Mittellinie oder das Verschieben des permissiven Bereichs nach rostral oder caudal, können Hinweise auf die Natur dieses Bereichs geben. Welches die molekularen Mechanismen des Überquerens der Mittellinie sind, lässt sich wiederum durch ektopische Expression von Rezeptormolekülen oder dominant negativen Varianten davon aufklären. Moleküle aus den Netrin- und Slit-Signalsystemen spielen bei diesem Prozess vermutlich eine wichtige Rolle.

Bei der Elektroporation und Kultur ist man nicht auf die Medulla und das Rautenhirn beschränkt. Beliebige andere Bereiche des ZNS lassen sich ebenfalls elektroporieren und kultivieren. Da in den



meisten Fällen Wanderungen nicht an der Oberfläche verlaufen, sind Schnittkulturen oft geeigneter als Ganzpräparate in der Offenes-Buch-Konfiguration. Dazu wird ein Dickschnitt angefertigt, dieser vertikal mit Reporterkonstrukten elektroporiert und dann kultiviert. Auf diese Weise lassen sich radiale und tangential Wanderungen im Tel- und Diencephalon darstellen (Marin et al. 2001).

Die hier beschriebenen Varianten von GFP, die durch Einfügung einer internen Duplikation inaktiviert wurden, lassen sich ebenfalls transformieren und können zur Darstellung von Zellklonen genutzt werden. Damit lässt sich beispielsweise aufklären, welche Zellen teilungsaktiv sind, ob es einen festen Stammbaum von Zellen in der Rautenlippe gibt, bei dem zum Beispiel schon vor der letzten Zellteilung festgelegt wird, wohin eine Zelle wandert, und ob die wandernden Zellen selbst sich noch teilen können.

## 5 Zusammenfassung

Während der Entwicklung des Nervensystems legen junge Nervenzellen oft weite Strecken zwischen dem Ort ihrer Entstehung und ihrem endgültigen Zielort zurück. In vielen Hirnregionen ist der Transkriptionsfaktor Pax6 mit diesen Wanderungen assoziiert: Entweder wird er in den wandernden Neuronen oder in den Leitfasern, die die Wanderungsrichtung vorgeben, exprimiert. Fehlt Pax6, wie in der Mausmutante „Small eye“, so sind die meisten dieser Wanderungen verändert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Mausmodelle, die eine weitere Aufklärung der Rolle von Pax6 in diesen Wanderungen ermöglichen, sowie ein Kultursystem zur Darstellung embryonaler Wanderungen außerhalb des Mutterleibs entwickelt.

In der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten YAC-transgenen Mäuselinie  $P_{hPax6}$ -taulacZ wird das Reportergen taulacZ unter der Kontrolle des Pax6-Promotors exprimiert. Dadurch ist dort, wo Pax6 im Zellkern vorliegt, der Rest der Zelle über seine gesamte Ausdehnung mit der vom taulacZ-Transgen kodierten tau- $\beta$ -Galactosidase markiert. Das räumlich-zeitliche Expressionsmuster von Pax6 und dem Transgen taulacZ wurde detailliert untersucht. Dabei wurde eine hohe Übereinstimmung festgestellt. Nur in wenigen Regionen oder Zelltypen fehlte die Transgenexpression zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass für diese Abweichungen das Fehlen von bislang nicht beschriebenen genetischen Kontrollelementen in der Pax6-Region verantwortlich ist. Dies sind zelltypspezifische Enhancer für die dauerhafte neuronale Expression und für Intermediärzonenzellen sowie ein regionspezifischer Enhancer für die Prosomere 1 und 2. Vermutlich ist bei der Linie  $P_{hPax6}$ -taulacZ das Transgen nur partiell in das Genom integriert.

Basierend auf der Darstellung der Zellen in ihrer gesamten Ausdehnung, die durch das taulacZ-Transgen erstmals möglich ist, wurde eine Klassifizierung Pax6-positiver Zelltypen vorgenommen. In den verschiedenen Hirnregionen exprimieren häufig die gleichen Zelltypen Pax6. Zunächst wird Pax6 in Neuroepithelzellen, später in radialen Gliazellen exprimiert. Durch die taulacZ-Färbung wird der Verlauf der langen, als Leitfasern dienenden Fortsätze der radialen Gliazellen dargestellt. Dies ermöglicht eingehende Untersuchungen der Entwicklung dieses Zelltyps. In der Pax6-Mutante „Small eye“ wiesen radiale Gliazellen im Telencephalon subtile morphologische Veränderungen auf. Die postmitotischen Zellen, die aus den Pax6-positiven radialen Gliazellen hervorgehen, schalten Pax6 meist aus.

Ohne von radialen Gliafasern geleitet zu werden, wandern Pax6-positive Neurone aus der Rautenlippe entlang verschiedener Pfade zu Kerngebieten in der Medulla, im Pons und im Kleinhirn. Auch diese Zellen sind in den  $P_{hPax6}$ -taulacZ-Mäusen durch das Transgen markiert. In der Pax6-Mutanten treten Unterschiede in der Anzahl und der Organisation dieser wandernden Zellen auf.

Mit der transgenen Mäuselinie  $P_{hPax6}$ -tTA wurde ein Werkzeug hergestellt, das die gezielte und hochspezifische Expression von beliebigen Transgenen in Pax6-exprimierenden Zellen ermöglicht. In die Pax6-positiven Zellen der Rautenlippe wurde das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) eingeführt und das Wanderungsverhalten in vitro über mehrere Tage dargestellt. Die Zellen aus der Rautenlippe wanderten in vitro entlang der Pfade von Brückenstrom und cuneoreticulärem Strom, und einige der Zellen erreichten nach 3 Tagen in Kultur die kontralateralen Nuclei reticularis lateralis und cuneatus lateralis. Dies zeigt, dass die elektroporierten Zellen sich in Kultur weitgehend organotypisch entwickeln.

Die Mäuselinie  $P_{hPax6}$ -tTA bildet den Ausgangspunkt für ein neuartiges System zur Beobachtung und gezielten Beeinflussung von wandernden Neuronen. Erstmals können beliebige Expressionskonstrukte gezielt, hocheffizient und schnell in wandernde Neurone eingebracht werden, ohne störende Hintergrundexpression in anderen Zellen. So wird die Beobachtung des Verhaltens modifizierter Zellen in einem unveränderten Umfeld möglich.

## 6 Anhang

Probe	IYAC				5'	Ex5			Rek			3'	
	1	2	3	4	1	1	2	3	1	2	3	1	
Maus-Nr.	1	+							-				
	2	+	-						-	-			
	3	-	-						-	-			
	4	-							-				
	5	+							-				
	6	-							-				
	7	+							-				
	8	+++	++				+			-	-		
	9	-								-			
	10	-								-			
	11	-								-			
	12	-								-			
	13	-								-			
	14	-								-			
	15	-								-			
	16	-								-			
	17	-								-			
	18	-	++	-	-	++	+	+	++	-	-	-	-
	19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	20	-		-	-	-	+	-	-	-		-	-
	21	-								-			
	22	-								-			
	23	+								-			
	24	-								-			
	25	-								-			
	26	-								-			
	27	-								-			
	28	-								-			
	29	-								-			
	YAC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

**Tab. 4: Genotypisierung von  $P_{Pax6}$ -tau-lacZ-Gründertieren**

Positivkontrolle: YAC Y593-CtaulacZ

**IYAC** pYAC67197.up1 pYAC7971.lo1

**5'** Pax6gen5U Pax6gen5L

**Ex5** Pax6h+m-up1 Pax6h+m-lo1

**Rek** pax29587.up1 IRES.lo1

**3'** Pax6gen3U Pax6gen3L

**kYAC** pYAC775.up1 pYAC1990.lo1

Probe	IYAC	5'		Ex5	Rek			3'		kYAC	
	1	1	2	D1	1	2	3	1	2	1	
Maus-Nr.	52	-	-		+++	-	-		-		-
	53	-	++	-	+++	-	++	++	++	++	-
	54	-	-		-	-	-		-		-
	55	-	-	+	+	-	+	+	-	++	-
	56	-	-		-	-	-		-		-
	57	-	-		-	-	-		-		-
	58	-	+		+++	-	-		-		++
	59	-	-		-	-	-		-		-
	60			-				-		-	
	61	+	-		-	-	-		-		-
	62			-				-		-	
	63	-	-		-	-	-		-		-
	64	-	-		-	-	-		-		-
	65	+	+	-	++	-	-	-	-	-	+
	66	+	+	-	++	-	-	-	-	-	+
	67	.	.	-	.	.	.	-	.	-	.
	68	-	-		+	-	-		++		-
	69	-	-		+++	-	-		-		-
	70	-	-		+	-	-		-		+
	71	-	-		-	-	-		-		-
	72	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	YAC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

**Tab. 5: Genotypisierung von  $P_{Pax6}$ -tTA-Gründertieren**

Positivkontrolle: YAC Y593-tTA

**IYAC** pYAC67197.up1 pYAC7971.lo1

**5'** Pax6gen5U Pax6gen5L

**Ex5** Pax6h+m-up1 Pax6h+m-lo1

**Rek** pax29587.up1 IRES.lo1

**3'** Pax6gen3U Pax6gen3L

**kYAC** pYAC775.up1 pYAC1990.lo1

Probe		A		B	C	D						E					
Wiederholung		1	2	1	1	1		2		3		1		2		3	
Konstrukt	Maus-Nr.					mono	dup	mono	dup	mono	dup	mono	dup	mono	dup	mono	dup
TEN	30	-		-				-	-					-	-		
TEN	31	-		-				-	-					-	-		
TEN	32	-	-	-	-	+	-	-	-			-	-	-	-		
TEN	33	+	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-		
TEN	34	-		-				-	-					-	-		
TEN	35	-		-				-	-					-	-		
TEN	36	-		-				-	-					-	-		
TEN	37									-	-					-	-
TEN	38									-	-					-	-
TEN	73	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-			+++	-	-	-
TEN	74	+	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TEN	75									-	-					-	-
TEN	76	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-		
TEN	77	-		-				-	-					+	-		
TEDN	39	+		-				-	-					++	-		
TEDN	40	++	++	-	++	+	++	++	-			++	+++	+++	-		
TEDN	41	-		-				-	-					-	-		
TEDN	42	+	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-		
TEDN	43	+	-	+++	-	++	+++	++	+++			++	+	++	+++		
TEDN	44	+	+	+++	-	+	++	+	+++			+	+	+	+++		
TEDN	45	-	+		-	-	-	-	-			-	-	++	-		
TEDN	46	-	+	+	-	-	-	-	++			-	-	~	-		
TEDN	47	+	++	-	++	-	-	-	-			-	-	+	-		
TEDN	48	-	-	-	-	-	-	-	-			+	+++	-	-		
TEDN	49	-		-				-	-					+	-		
TEDN	50	-	-	++	-	+++	-	+++	-			+++	+++	+++	++		
TEDN	51	-	++	-	-	-	-	-	-			-	-	+	-		
ptetOiEGFP		+++	++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
ptetOiEGFP270		++	-	+++	-	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++

**Tab. 6: Genotypisierung von TEN- und TEDN-Gründertieren**

Die Primerpaare D und E lagen um die in EGFP270 duplizierte Region herum; je nach Vorhandensein der Duplikation in der genomischen DNA wurde ein kurzes monomeres (mono) oder ein langes Fragment mit Duplikation (dup) amplifiziert. Positivkontrollen: ptetOiEGFP (Monomer) und ptetOiEGFP270 (Duplikation).

- A** EGFP.up1 EGFP\_S175G.lo1
- B** EGFP1957.up1 EGFP\_S175G.lo1
- C** EGFP.up1 EGFP\_V163A.lo1
- D** EGFPgenU1 EGFPgenL1
- E** EGFPgenU2 EGFPgenL2

## 7 Literatur

- Akamatsu, W., Okano, H. J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R. B. und Okano, H. (1999): Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, S. 9885-9890.
- Alcantara, S., Ruiz, M., de Castro, F., Soriano, E. und Sotelo, C. (2000): Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127, S. 1359-1372.
- Altman, J. (1969): Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J.Comp Neurol.* 136, S. 269-293.
- Altman, J. und Bayer, S. A. (1978): Prenatal development of the cerebellar system in the rat. II. Cytogenesis and histogenesis of the inferior olive, pontine gray, and the precerebellar reticular nuclei. *J.Comp Neurol.* 179, S. 49-75.
- Altman, J. und Bayer, S. A. (1980): Development of the brain stem in the rat. I. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the lower medulla. *J.Comp Neurol.* 194, S. 1-35.
- Altman, J. und Bayer, S. A. (1987a): Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J.Comp Neurol.* 257, S. 490-512.
- Altman, J. und Bayer, S. A. (1987b): Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J.Comp Neurol.* 257, S. 513-528.
- Altman, J. und Bayer, S. A. (1987c): Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J.Comp Neurol.* 257, S. 529-552.
- Altman, J. und Bayer, S. A. (1995): *Atlas of Prenatal Rat Brain Development*. Boca Raton: CRC Press.
- Altman, J. und Bayer, S. A. (1997): *Development of the Cerebellar System: In Relation to Its Evolution, Structure and Functions*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M., Mateo, A. S. und Merchant-Larios, H. (1998): Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J.Neurosci.* 18, S. 1020-1037.
- Alvarez-Buylla, A., Theelen, M. und Nottebohm, F. (1988a): Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, S. 8722-8726.
- Alvarez-Buylla, A., Theelen, M. und Nottebohm, F. (1988b): Mapping of radial glia and of a new cell type in adult canary brain. *J.Neurosci.* 8, S. 2707-2712.
- Alvarez-Buylla, A., Theelen, M. und Nottebohm, F. (1990): Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5, S. 101-109.

- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. und Rubenstein, J. L. (1997a): Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, S. 474-476.
- Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K. und Rubenstein, J. L. (2001): Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, S. 353-363.
- Anderson, S. A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D. D., Meneses, J., Pedersen, R. und Rubenstein, J. L. (1997b): Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19, S. 27-37.
- Angevine, J. B., Jr. und Sidman, R. L. (1961): Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, S. 766-768.
- Anton, E. S., Cameron, R. S. und Rakic, P. (1996): Role of neuron-glia junctional domain proteins in the maintenance and termination of neuronal migration across the embryonic cerebral wall. *J.Neurosci.* 16, S. 2283-2293.
- Anton, E. S., Kreidberg, J. A. und Rakic, P. (1999): Distinct functions of  $\alpha 3$  and  $\alpha (v)$  integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22, S. 277-289.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1995): *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons.
- Bard, J. L., Kaufman, M. H., Dubreuil, C., Brune, R. M., Burger, A., Baldock, R. A. und Davidson, D. R. (1998): An internet-accessible database of mouse developmental anatomy based on a systematic nomenclature. *Mech.Dev.* 74, S. 111-120.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., Dai, X. F. und Simmons, J. A. (1991): Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J.Comp Neurol.* 307, S. 499-516.
- Bentivoglio, M. und Mazzarello, P. (1999): The history of radial glia. *Brain Res.Bull.* 49, S. 305-315.
- Bishop, K. M., Goudreau, G. und O'Leary, D. D. (2000): Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* 288, S. 344-349.
- Bittman, K., Owens, D. F., Kriegstein, A. R. und LoTurco, J. J. (1997): Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *J.Neurosci.* 17, S. 7037-7044.
- Bonnerot, C. und Nicolas, J. F. (1993a): Application of *LacZ* gene fusions to postimplantation development. *Methods Enzymol.* 225, S. 451-469.
- Bonnerot, C. und Nicolas, J. F. (1993b): Clonal analysis in the intact mouse embryo by intragenic homologous recombination. *C.R.Acad.Sci.III.* 316, S. 1207-1217.
- Bonnevie, K. und Brodal, A. (1946): Hereditary hydrocephalus in the house mouse. IV. The development of the cerebellar anomalies during foetal life with notes on the normal development of the mouse cerebellum. *Skr.Norske Vid.-Akad.I.M.N.Kl.* 4, S. 1-60.
- Boulder Committee (1970): Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat.Rec.* 166, S. 257-261.
- Bradke, F. und Dotti, C. G. (2000): Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr.Opin.Neurobiol.* 10, S. 574-581.
- BrainInfo (2000): <http://braininfo.rprc.washington.edu>. University of Washington, Neuroscience Division, Regional Primate Research Center.

- Brown, A., McKie, M., van Heyningen, V. und Prosser, J. (1998): The Human PAX6 Mutation Database. *Nucleic.Acids.Res.* 26, S. 259-264.
- Brunjes, P. C., Fisher, M. und Grainger, R. (1998): The small-eye mutation results in abnormalities in the lateral cortical migratory stream. *Brain Research.Developmental Brain Research* 110, S. 121-125.
- Bulfone, A., Puellas, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R. und Rubenstein, J. L. (1993): Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt- 3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J.Neurosci.* 13, S. 3155-3172.
- Byrne, G. W. und Ruddle, F. H. (1989): Multiplex gene regulation: a two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, S. 5473-5477.
- Callaerts, P., Halder, G. und Gehring, W. J. (1997): PAX-6 in development and evolution. *Annu.Rev.Neurosci.* 20, S. 483-532.
- Callahan, C. A. und Thomas, J. B. (1994): Tau-beta-galactosidase, an axon-targeted fusion protein. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91, S. 5972-5976.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, S. 802-805.
- Chanas-Sacre, G., Rogister, B., Moonen, G. und Leprince, P. (2000): Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. *J.Neurosci.Res.* 61, S. 357-363.
- Chapouton, P., Gartner, A. und Götz, M. (1999): The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development* 126, S. 5569-5579.
- Chenn, A. und McConnell, S. K. (1995): Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82, S. 631-641.
- Chu, G., Vollrath, D. und Davis, R. W. (1986): Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, S. 1582-1585.
- Chuang, S. E., Chen, A. L. und Chao, C. C. (1995): Growth of E. coli at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 23, S. 1641.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. und Falkow, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, S. 33-38.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P. und Scheff, S. (1994): Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, S. 455-459.
- Cubitt, A. B., Woollenweber, L. A. und Heim, R. (1999): Understanding structure-function relationships in the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Methods Cell Biol.* 58, S. 19-30.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I. und Curran, T. (1995): A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, S. 719-723.
- de Carlos, J. A., Lopez-Mascaraque, L. und Valverde, F. (1996): Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J.Neurosci.* 16, S. 6146-6156.
- DeDiego, I., Smith-Fernandez, A. und Fairen, A. (1994): Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur.J.Neurosci.* 6, S. 983-997.



- Denaxa, M., Chan, C. H., Parnavelas, J. G. und Karagozeos, D. (2001): The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the axons of corticofugal fibres. *Soc.Neurosci.Abstr.* 26, S. 569.
- Derer, P. (1974): Histogenesis of the neocortex of the albino rat during fetal and neonatal periods. *J.Hirnforsch.* 15, S. 49-74.
- Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H. und Kirschner, M. W. (1992): Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol.Biol.Cell* 3, S. 1141-1154.
- Edmondson, J. C. und Hatten, M. E. (1987): Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J.Neurosci.* 7, S. 1928-1934.
- Edwards, M. A., Yamamoto, M. und Caviness, V. S., Jr. (1990): Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience* 36, S. 121-144.
- Engelkamp, D., Rashbass, P., Seawright, A. und van Heyningen, V. (1999): Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 126, S. 3585-3596.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M. und Briscoe, J. (1997): Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90, S. 169-180.
- Essick, J. R. (1912): The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. *American Journal of Anatomy* 13, S. 25-54.
- Fantes, J., Redeker, B., Breen, M., Boyle, S., Brown, J., Fletcher, J., Jones, S., Bickmore, W., Fukushima, Y. und Mannens, M. (1995): Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum.Mol.Genet.* 4, S. 415-422.
- Feng, L., Hatten, M. E. und Heintz, N. (1994): Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, S. 895-908.
- Feng, Y. und Walsh, C. A. (2001): Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, S. 408-416.
- Fields-Berry, S. C., Halliday, A. L. und Cepko, C. L. (1992): A recombinant retrovirus encoding alkaline phosphatase confirms clonal boundary assignment in lineage analysis of murine retina. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, S. 693-697.
- Fischer-Fantuzzi, L. und Vesco, C. (1988): Cell-dependent efficiency of reiterated nuclear signals in a mutant simian virus 40 oncoprotein targeted to the nucleus. *Mol.Cell Biol.* 8, S. 5495-5503.
- Fischer, A. J. und Reh, T. A. (2001): Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat.Neurosci.* 4, S. 247-252.
- Forss-Petter, S., Danielson, P. E., Catsicas, S., Battenberg, E., Price, J., Nerenberg, M. und Sutcliffe, J. G. (1990): Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* 5, S. 187-197.
- Frederiksen, K. und McKay, R. D. (1988): Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J.Neurosci.* 8, S. 1144-1151.
- Gadisseux, J. F., Goffinet, A. M., Lyon, G. und Evrard, P. (1992): The human transient subpial granular layer: an optical, immunohistochemical, and ultrastructural analysis. *J.Comp Neurol.* 324, S. 94-114.

- Gähwiler, B. H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R. A. und Thompson, S. M. (1997): Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends.Neurosci.* 20, S. 471-477.
- Gaiano, N., Nye, J. S. und Fishell, G. (2000): Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, S. 395-404.
- Gao, W. Q. und Hatten, M. E. (1993): Neuronal differentiation rescued by implantation of Weaver granule cell precursors into wild-type cerebellar cortex. *Science* 260, S. 367-369.
- Gao, W. Q. und Hatten, M. E. (1994): Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development* 120, S. 1059-1070.
- Gilmore, E. C., Ohshima, T., Goffinet, A. M., Kulkarni, A. B. und Herrup, K. (1998): Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J.Neurosci.* 18, S. 6370-6377.
- Gluzman, Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, S. 175-182.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, S. 5547-5551.
- Götz, J. (2001): Tau and transgenic animal models. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 35, S. 266-286.
- Götz, M., Stoykova, A. und Gruss, P. (1998): Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21, S. 1031-1044.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* 36, S. 59-74.
- Gray, G. E., Leber, S. M. und Sanes, J. R. (1990): Migratory patterns of clonally related cells in the developing central nervous system. *Experientia* 46, S. 929-940.
- Gray, G. E. und Sanes, J. R. (1992): Lineage of radial glia in the chicken optic tectum. *Development* 114, S. 271-283.
- Greene, L. A. und Tischler, A. S. (1976): Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73, S. 2424-2428.
- Gregory, W. A., Edmondson, J. C., Hatten, M. E. und Mason, C. A. (1988): Cytology and neuron-glial apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *J.Neurosci.* 8, S. 1728-1738.
- Grindley, J. C., Davidson, D. R. und Hill, R. E. (1995): The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121, S. 1433-1442.
- Grindley, J. C., Hargett, L. K., Hill, R. E., Ross, A. und Hogan, B. L. (1997): Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6<sup>Sey-1</sup> mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon. *Mech.Dev.* 64, S. 111-126.
- Gustincich, S., Feigenspan, A., Wu, D. K., Koopman, L. J. und Raviola, E. (1997): Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron* 18, S. 723-736.
- Haas, K., Sin, W. C., Javaherian, A., Li, Z. und Cline, H. T. (2001): Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. *Neuron* 29, S. 583-591.
- Halliday, A. L. und Cepko, C. L. (1992): Generation and migration of cells in the developing striatum. *Neuron* 9, S. 15-26.

- Harkmark, W. (1954): Cell migration from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons: A morphological and experimental investigation in chick embryos. *Journal of Comparative Neurology* 100, S. 115-209.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N. und Götz, M. (2001): Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. *Dev.Biol.* 229, S. 15-30.
- Hartmann, D., De Strooper, B. und Saftig, P. (1999): Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Curr.Biol.* 9, S. 719-727.
- Hatten, M. E. (1999): Central nervous system neuronal migration. *Annual Review of Neuroscience* 22(), S. 511-539.
- Heyman, I., Faissner, A. und Lumsden, A. (1995): Cell and matrix specialisations of rhombomere boundaries. *Dev.Dyn.* 204, S. 301-315.
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D. und van Heyningen, V. (1991): Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox- containing gene. *Nature* 354, S. 522-525.
- His, W. (1891): Die Entwicklung des menschlichen Rautenhirns vom Ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. I. Verlängertes Mark. *Abhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig.Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse.* 17, S. 1-74.
- Hitchcock, P. F., Macdonald, R. E., VanDeRyt, J. T. und Wilson, S. W. (1996): Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish. *J.Neurobiol.* 29, S. 399-413.
- Ho, S. Y. und Mittal, G. S. (1996): Electroporation of cell membranes: a review. *Crit Rev.Biotechnol.* 16, S. 349-362.
- Hockfield, S. und McKay, R. D. (1985): Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J.Neurosci.* 5, S. 3310-3328.
- Hogan, B. L., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C. M., Fisher, G. und Lyon, M. F. (1986): Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 97, S. 95-110.
- Hokfelt, T., Matensson, A., Björklund, S., Kleinau, S. und Goldstein, M. (1984): Distributional maps of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain. In: Björklund, A. und T. Hokfelt (Hrsg.): *Handbook of chemical neuroanatomy. Classical transmitters in the CNS* (S. 227-379). Amsterdam: Elsevier.
- Horwitz, A. R. und Parsons, J. T. (1999): Cell migration--movin' on. *Science* 286, S. 1102-1103.
- Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P. und Cooper, J. A. (1997): Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389, S. 733-737.
- Hynes, R. O., Patel, R. und Miller, R. H. (1986): Migration of neuroblasts along preexisting axonal tracts during prenatal cerebellar development. *J.Neurosci.* 6, S. 867-876.
- Inouye, S. und Tsuji, F. I. (1994): Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 341, S. 277-280.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A. (1983): Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* 153, S. 163-168.

- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A. und Schneuwly, S. (1997): GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the Drosophila central nervous system. *Cell Tissue Res.* 290, S. 1-10.
- Jacobowitz, D. M. und Abbott, L. C. (1998): Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. Boca Raton, FL: CRC.
- Jacobson, R. H., Zhang, X. J., DuBose, R. F. und Matthews, B. W. (1994): Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature* 369, S. 761-766.
- Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Thomas, M. R. und Neal, M. J. (1998): Expression of Pax-6 mRNA in the retinal degeneration (rd) mouse. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 252, S. 236-240.
- Kahle, W. (1991): Nervensystem und Sinnesorgane (6. überarb. Aufl., Band 3). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kamei, Y., Inagaki, N., Nishizawa, M., Tsutsumi, O., Taketani, Y. und Inagaki, M. (1998): Visualization of mitotic radial glial lineage cells in the developing rat brain by Cdc2 kinase-phosphorylated vimentin. *Glia* 23, S. 191-199.
- Kammandel, B., Chowdhury, K., Stoykova, A., Aparicio, S., Brenner, S. und Gruss, P. (1999): Distinct cis-Essential Modules Direct the Time-Space Pattern of the Pax6 Gene Activity. *Dev.Biol.* 205, S. 79-97.
- Kaufman, M. H. (1992): The Atlas of Mouse Development. London: Academic Press Ltd.
- Kawano, H., Fukuda, T., Kubo, K., Horie, M., Uyemura, K., Takeuchi, K., Osumi, N., Eto, K. und Kawamura, K. (1999): Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats. *J.Comp Neurol.* 408, S. 147-160.
- Khillan, J. S., Deen, K. C., Yu, S. H., Sweet, R. W., Rosenberg, M. und Westphal, H. (1988): Gene transactivation mediated by the TAT gene of human immunodeficiency virus in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 16, S. 1423-1430.
- Kim, D. G., Kang, H. M., Jang, S. K. und Shin, H. S. (1992): Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus. *Mol.Cell Biol.* 12, S. 3636-3643.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. und Bujard, H. (1996): Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, S. 10933-10938.
- Koroma, B. M., Yang, J. M. und Sundin, O. H. (1997): The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 38, S. 108-120.
- Kouhara, H., Kurebayashi, S., Hashimoto, K., Kasayama, S., Koga, M., Kishimoto, T. und Sato, B. (1995): Ligand-independent activation of tyrosine kinase in fibroblast growth factor receptor 1 by fusion with beta-galactosidase. *Oncogene* 10, S. 2315-2322.
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnutgen, F., Bruning, G., Spener, F. und Muller, T. (1994): The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120, S. 2637-2649.
- Kwon, Y. T. und Tsai, L. H. (2000): The role of the p35/cdk5 kinase in cortical development. *Results Probl.Cell Differ.* 30, S. 241-253.
- Lambert, d. R. und Goffinet, A. M. (2001): Neuronal migration. *Mech.Dev.* 105, S. 47-56.

- Lambert, S., Saintigny, Y., Delacote, F., Amiot, F., Chaput, B., Lecomte, M., Huck, S., Bertrand, P. und Lopez, B. S. (1999): Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cell, using tandem repeat sequences. *Mutat.Res.* 433, S. 159-168.
- Lander, E. S. et al (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, S. 860-921.
- Larsson, L. I., St Onge, L., Hougaard, D. M., Sosa-Pineda, B. und Gruss, P. (1998): Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech.Dev.* 79, S. 153-159.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V. und Parnavelas, J. G. (1999): The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J.Neurosci.* 19, S. 7881-7888.
- Leber, S. M. und Sanes, J. R. (1995): Migratory paths of neurons and glia in the embryonic chick spinal cord. *J.Neurosci.* 15, S. 1236-1248.
- Lois, C. und Alvarez-Buylla, A. (1994): Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, S. 1145-1148.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. und Alvarez-Buylla, A. (1996): Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, S. 978-981.
- Lojda, Z. (1970): Indigogenic methods for glycosidases. II. An improved method for beta-D-galactosidase and its application to localization studies of the enzymes in the intestine and in other tissues. *Histochemie.* 23, S. 266-288.
- LoTurco, J. J., Blanton, M. G. und Kriegstein, A. R. (1991): Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J.Neurosci.* 11, S. 792-799.
- Lumsden, A. und Keynes, R. (1989): Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, S. 424-428.
- Lumsden, A. und Krumlauf, R. (1996): Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, S. 1109-1115.
- Luo, L. (2000): Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat.Rev.Neurosci.* 1, S. 173-180.
- Luskin, M. B. (1993): Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, S. 173-189.
- Luskin, M. B., Pearlman, A. L. und Sanes, J. R. (1988): Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1, S. 635-647.
- Macdonald, R. und Wilson, S. W. (1997): Distribution of Pax6 protein during eye development suggests discrete roles in proliferative and differentiated visual cells. *Development Genes and Evolution* 206, S. 363-369.
- MacGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M. und Herzenberg, L. A. (1991): Use of *E. coli lacZ* ( $\beta$ -Galactosidase) as a Reporter Gene. In: Murray, E. J. (Hrsg.): *Gene Transfer and Expression Protocols* (S. 217-235). Clifton, NJ: The Humana Press Inc.
- Magini, G. (1888): Nevroglia e cellule nervose cerebrali nei feti. In: *Atti del Dodicesimo Congresso della Associazione Medica Italiana* (S. 281-291). Pavia: Tipografia Fratelli Fusi.
- Malatesta, P., Hartfuss, E. und Götz, M. (2000): Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127, S. 5253-5263.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. und Rubenstein, J. L. (2001): Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin- neuropilin interactions. *Science* 293, S. 872-875.

- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. und Gruss, P. (2001): Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105, S. 43-55.
- Mastick, G. S. und Andrews, G. L. (2001): Pax6 regulates the identity of embryonic diencephalic neurons. *Mol.Cell Neurosci.* 17, S. 190-207.
- Mastick, G. S., Davis, N. M., Andrew, G. L. und Easter, S. S. J. (1997): Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development* 124, S. 1985-1997.
- Mathis, L., Bonnerot, C., Puelles, L. und Nicolas, J. F. (1997): Retrospective clonal analysis of the cerebellum using genetic lacZ/lacZ mouse mosaics. *Development* 124, S. 4089-4104.
- Mathis, L. und Nicolas, J. F. (2000): Different clonal dispersion in the rostral and caudal mouse central nervous system. *Development* 127, S. 1277-1290.
- Mathis, L., Sieur, J., Voiculescu, O., Charnay, P. und Nicolas, J. F. (1999): Successive patterns of clonal cell dispersion in relation to neuromeric subdivision in the mouse neuroepithelium. *Development* 126, S. 4095-4106.
- Meyer, G., Soria, J. M., Martinez-Galan, J. R., Martin-Clemente, B. und Fairen, A. (1998): Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J.Comp Neurol.* 397, S. 493-518.
- Meyer, S. A., Ingraham, C. A. und McCarthy, K. D. (1989): Expression of vimentin by cultured astroglia and oligodendroglia. *J.Neurosci.Res.* 24, S. 251-259.
- Miale, I. L. und Sidman, R. L. (1961): An autographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Experimental Neurology* 4, S. 277-296.
- Miles, C., Elgar, G., Coles, E., Kleinjan, D. J., van Heyningen, V. und Hastie, N. (1998): Complete sequencing of the Fugu WAGR region from WT1 to PAX6: dramatic compaction and conservation of synteny with human chromosome 11p13. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, S. 13068-13072.
- Miller, K. E. und Joshi, H. C. (1996): Tubulin transport in neurons. *J.Cell Biol.* 133, S. 1355-1366.
- Misson, J. P., Edwards, M. A., Yamamoto, M. und Caviness, V. S., Jr. (1988): Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Research.Developmental Brain Research* 44, S. 95-108.
- Miyasaka, N., Arimatsu, Y. und Takiguchihayashi, K. (1999): Foreign gene expression in an organotypic culture of cortical anlage after in vivo electroporation. *Neuroreport* 10, S. 2319-2323.
- Miyata, T., Nakajima, K., Aruga, J., Takahashi, S., Ikenaka, K., Mikoshiba, K. und Ogawa, M. (1996): Distribution of a reeler gene-related antigen in the developing cerebellum: an immunohistochemical study with an allogeneic antibody CR- 50 on normal and reeler mice. *J.Comp Neurol.* 372, S. 215-228.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. und Axel, R. (1996): Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, S. 675-686.
- Mountford, P., Zevnik, B., Duwel, A., Nichols, J., Li, M., Dani, C., Robertson, M., Chambers, I. und Smith, A. (1994): Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91, S. 4303-4307.
- Mountford, P. S. und Smith, A. G. (1995): Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends.Genet.* 11, S. 179-184.
- Müller, B. K. (1999): Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu.Rev.Neurosci.* 22, S. 351-388.

- Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y. und Okumura, J. (1997): Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 230, S. 376-380.
- Nadarajah, B., Wong, R. O. und Parnavelas, J. G. (2000): Neuronal migration directed towards the ventricular zone of the developing neocortex. *Soc.Neurosci.Abstr.* 26, S. 569.
- Nelson, L. B., Spaeth, G. L., Nowinski, T. S., Margo, C. E. und Jackson, L. (1984): Aniridia. A review. *Surv.Ophthalmol.* 28, S. 621-642.
- Nerenberg, M., Hinrichs, S. H., Reynolds, R. K., Khoury, G. und Jay, G. (1987): The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 237, S. 1324-1329.
- Neuman, K., Soosaar, A., Nornes, H. O. und Neuman, T. (1995): Orphan receptor COUP-TF I antagonizes retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J.Neurosci.Res.* 41, S. 39-48.
- Nicolas, J. F., Mathis, L., Bonnerot, C. und Saurin, W. (1996): Evidence in the mouse for self-renewing stem cells in the formation of a segmented longitudinal structure, the myotome. *Development* 122, S. 2933-2946.
- Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J. und Tsai, L. H. (1998): The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* 395, S. 194-198.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. und Kriegstein, A. R. (2001): Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, S. 714-720.
- Nornes, H. O. und Das, G. D. (1974): Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord of rat. I. An autoradiographic study--time and sites of origin and migration and settling patterns of neuroblasts. *Brain Res.* 73, S. 121-138.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. und Nishimune, Y. (1997): 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, S. 313-319.
- Okada, A., Lansford, R., Weimann, J. M., Fraser, S. E. und McConnell, S. K. (1999): Imaging cells in the developing nervous system with retrovirus expressing modified green fluorescent protein. *Exp.Neurol.* 156, S. 394-406.
- Ono, K. und Kawamura, K. (1989): Migration of immature neurons along tangentially oriented fibers in the subpial part of the fetal mouse medulla oblongata. *Exp.Brain Res.* 78, S. 290-300.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. und Rutishauser, U. (1994): N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13, S. 595-609.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. und Remington, S. J. (1996): Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, S. 1392-1395.
- Ornitz, D. M., Moreadith, R. W. und Leder, P. (1991): Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, S. 698-702.
- Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Iimura, T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S. und Eto, K. (1997): Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* 124, S. 2961-2972.
- Parnavelas, J. G. (2000): The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci.* 23, S. 126-131.

- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. und Piston, D. W. (1997): Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys.J.* 73, S. 2782-2790.
- Paxinos, G., Ashwell, K. W. und Törk, I. (1994): *Atlas of the Developing Rat Nervous System* (Ausgabe 2. San Diego: Academic Press.
- Pearlman, A. L. und Sheppard, A. M. (1996): Extracellular matrix in early cortical development. *Prog.Brain Res.* 108, S. 117-134.
- Pelletier, J. und Sonenberg, N. (1988): Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, S. 320-325.
- Phelps, P. E., Barber, R. P. und Vaughn, J. E. (1996): Nonradial migration of interneurons can be experimentally altered in spinal cord slice cultures. *Development* 122, S. 2013-2022.
- Pierce, E. T. (1973): Time of origin of neurons in the brain stem of the mouse. *Prog.Brain Res.* 40, S. 53-65.
- Pixley, S. K. und de Vellis, J. (1984): Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* 317, S. 201-209.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. und Cormier, M. J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, S. 229-233.
- Price, J. und Thurlow, L. (1988): Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* 104, S. 473-482.
- Price, J., Turner, D. und Cepko, C. (1987): Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus- mediated gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, S. 156-160.
- Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S. und Rubenstein, J. L. (2000): Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx- 2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J.Comp Neurol.* 424, S. 409-438.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A. und Temple, S. (2000): Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, S. 69-80.
- Raedler, E. und Raedler, A. (1978): Autoradiographic study of early neurogenesis in rat neocortex. *Anat.Embryol.(Berl)* 154, S. 267-284.
- Rakic, P. (1971): Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J.Comp Neurol.* 141, S. 283-312.
- Rakic, P. (1974): Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183, S. 425-427.
- Rakic, P. (1990): Principles of neural cell migration. *Experientia* 46, S. 882-891.
- Rakic, P., Knyihar-Csillik, E. und Csillik, B. (1996): Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, S. 9218-9222.
- Rakic, P., Stensas, L. J., Sayre, E. und Sidman, R. L. (1974): Computer-aided three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of cells from serial electron microscopic montages of foetal monkey brain. *Nature* 250, S. 31-34.



- Ramon y Cajal, S. (1890): Sur l'origine et les ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonnaire. *Anat.Anz.* 5, S. 85-119.
- Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S. und Lee, M. G. (1996): Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* 20, S. 102-4, 106, 108-10.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. und Reed, S. I. (1994): Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol.Cell Biol.* 14, S. 1669-1679.
- Roberts, R. C. (1967): Small eyes - a new dominant eye mutant in mouse. *Genetical Research* 9, S. 121-122.
- Rodriguez, I., Feinstein, P. und Mombaerts, P. (1999): Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97, S. 199-208.
- Rothstein, R. J. (1983): One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101, S. 202-211.
- Rubenstein, J. L., Shimamura, K., Martinez, S. und Puelles, L. (1998): Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu.Rev.Neurosci.* 21, S. 445-477.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2. Ausgabe). New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sauer, F. C. (1935): Mitosis in the neural tube. *J.Comp.Neurol.* 62, S. 377-405.
- Schaper, A. (1897): Die frühesten Differenzierungsvorgänge im Centralnervensystem. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 5, S. 81-132.
- Schedl, A. und Hammes, A. (2000): Generation of transgenic mice from plasmids, BACs and YACs. In: Jackson, I. J. und C. M. Abbott (Hrsg.): *Mouse Genetics and Transgenics - A Practical Approach* (S. 217-245). Oxford: Oxford University Press.
- Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., van Heyningen, V. und Hastie, N. D. (1996): Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86, S. 71-82.
- Schmahl, W., Knoedlseder, M., Favor, J. und Davidson, D. (1993): Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6-locus. *Acta Neuropathol.(Berl)* 86, S. 126-135.
- Schmechel, D. E. und Rakic, P. (1979): A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat.Embryol.(Berl)* 156, S. 115-152.
- Schubert, F. R., Fainsod, A., Gruenbaum, Y. und Gruss, P. (1995): Expression of the novel murine homeobox gene *Sax-1* in the developing nervous system. *Mech.Dev.* 51, S. 99-114.
- Schwartz, D. C. und Cantor, C. R. (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, S. 67-75.
- Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M. und Gruss, P. (2000): Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of *pax2* and *pax6*. *Development* 127, S. 4325-4334.

- Sheldon, M., Rice, D. S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B. W., Cooper, J. A., Goldowitz, D. und Curran, T. (1997): Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389, S. 730-733.
- Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K. und Inoue, Y. (1997): Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J.Neurosci.* 17, S. 9212-9219.
- Shimamura, K., Hartigan, D. J., Martinez, S., Puelles, L. und Rubenstein, J. L. (1995): Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, S. 3923-3933.
- Shimomura, O. und Johnson, F. H. (1975): Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72, S. 1546-1549.
- Shirasaki, R., Mirzayan, C., Tessier-Lavigne, M. und Murakami, F. (1996): Guidance of circumferentially growing axons by netrin-dependent and - independent floor plate chemotropism in the vertebrate brain. *Neuron* 17, S. 1079-1088.
- Shoukimas, G. M. und Hinds, J. W. (1978): The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis. *J.Comp Neurol.* 179, S. 795-830.
- Sidman, R. L. und Rakic, P. (1973): Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 62, S. 1-35.
- Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R. und Haseloff, J. (1996): Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr.Biol.* 6, S. 1653-1663.
- Silos-Santiago, I. und Snider, W. D. (1992): Development of commissural neurons in the embryonic rat spinal cord. *J.Comp Neurol.* 325, S. 514-526.
- Singh, S., Tang, H. K., Lee, J. Y. und Saunders, G. F. (1998): Truncation mutations in the transactivation region of PAX6 result in dominant-negative mutants. *J.Biol.Chem.* 273, S. 21531-21541.
- Soula, C., Danesin, C., Kan, P., Grob, M., Poncet, C. und Cochard, P. (2001): Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* 128, S. 1369-1379.
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. und Gruss, P. (1997): Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha- cells in mouse pancreas. *Nature* 387, S. 406-409.
- Stein, E. und Tessier-Lavigne, M. (2001): Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, S. 1928-1938.
- Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C. und Gruss, P. (1996): Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. *Development* 122, S. 3453-3465.
- Stoykova, A. und Gruss, P. (1994): Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J.Neurosci.* 14, S. 1395-1412.
- Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M. und Gruss, P. (2000): Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J.Neurosci.* 20, S. 8042-8050.
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S. und Rubenstein, J. L. (1999): Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126, S. 3359-3370.

- Swartz, M., Eberhart, J., Mastick, G. S. und Krull, C. E. (2001): Sparking new frontiers: using in vivo electroporation for genetic manipulations. *Dev.Biol.* 233, S. 13-21.
- Tamamaki, N., Fujimori, K. E. und Takauji, R. (1997): Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J.Neurosci.* 17, S. 8313-8323.
- Tan, K. und Le Douarin, N. M. (1991): Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. Application of the quail-chick chimera system. *Anat.Embryol.(Berl)* 183, S. 321-343.
- Tessier-Lavigne, M. und Goodman, C. S. (1996): The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, S. 1123-1133.
- Theiler, K. (1972): *The House Mouse: Development and Normal Stages from Fertilization to 4 weeks of Age.* Berlin: Springer-Verlag.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U. und Magnuson, T. (1993): Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, S. 1163-1174.
- Ton, C. C., Miwa, H. und Saunders, G. F. (1992): Small eye (Sey): cloning and characterization of the murine homolog of the human aniridia gene. *Genomics* 13, S. 251-256.
- Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. und McKnight, S. L. (1988): Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2, S. 718-729.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A. und Herz, J. (1999): Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, S. 689-701.
- Vaage, S. (1969): The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb.Anat.Entwicklungsgesch.* 41, S. 3-87.
- Valverde, F., de Carlos, J. A. und Lopez-Mascaraque, L. (1995): Time of origin and early fate of preplate cells in the cerebral cortex of the rat. *Cereb.Cortex* 5, S. 483-493.
- Valverde, F., Garcia, C., Lopez-Mascaraque, L. und de Carlos, J. A. (2000): Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant mice. *J.Comp Neurol.* 419, S. 485-504.
- Vitalis, T., Cases, O., Engelkamp, D., Verney, C. und Price, D. J. (2000): Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *J.Neurosci.* 20, S. 6501-6516.
- Voigt, T. (1989): Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J.Comp Neurol.* 289, S. 74-88.
- Vollrath, D. und Davis, R. W. (1987): Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucleic Acids Res.* 15, S. 7865-7876.
- Walther, C. und Gruss, P. (1991): Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, S. 1435-1449.
- Ware, M. L., Fox, J. W., Gonzalez, J. L., Davis, N. M., Lambert, d. R., Russo, C. J., Chua, S. C., Jr., Goffinet, A. M. und Walsh, C. A. (1997): Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron* 19, S. 239-249.
- Warren, N. und Price, D. J. (1997): Roles of Pax-6 in murine diencephalic development. *Development* 124, S. 1573-1582.

- Wentworth, L. E. (1984): The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. II. A Golgi analysis of sensory, commissural, and association cell differentiation. *J.Comp Neurol.* 222, S. 96-115.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M. und Alvarez-Buylla, A. (1997): Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, S. 779-791.
- Williams, D. W., Tyrer, M. und Shepherd, D. (2000): Tau and tau reporters disrupt central projections of sensory neurons in *Drosophila*. *J.Comp Neurol.* 428, S. 630-640.
- Wingate, R. J. (2001): The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11, S. 82-88.
- Wingate, R. J. und Hatten, M. E. (1999): The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development* 126, S. 4395-4404.
- Wirak, D. O., Bayney, R., Kundel, C. A., Lee, A., Scangos, G. A., Trapp, B. D. und Unterbeck, A. J. (1991): Regulatory region of human amyloid precursor protein (APP) gene promotes neuron-specific gene expression in the CNS of transgenic mice. *EMBO J.* 10, S. 289-296.
- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J. Y. und Rao, Y. (1999): Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, S. 331-336.
- Xu, P. X., Zhang, X., Heaney, S., Yoon, A., Michelson, A. M. und Maas, R. L. (1999): Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development* 126(2), S. 383-395.
- Xu, Z. P. und Saunders, G. F. (1997): Transcriptional regulation of the human PAX6 gene promoter. *J.Biol.Chem.* 272, S. 3430-3436.
- Yang, F., Moss, L. G. und Phillips, G. N., Jr. (1996): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat.Biotechnol.* 14, S. 1246-1251.
- Yee, K. T., Simon, H. H., Tessier-Lavigne, M. und O'Leary, D. M. (1999): Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* 24, S. 607-622.
- Yoshida, K., Tobet, S. A., Crandall, J. E., Jimenez, T. P. und Schwarting, G. A. (1995): The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J.Neurosci.* 15, S. 7769-7777.
- Yun, K., Potter, S. und Rubenstein, J. L. (2001): Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128, S. 193-205.
- Zernicka-Goetz, M., Pines, J., McLean, H. S., Dixon, J. P., Siemering, K. R., Haseloff, J. und Evans, M. J. (1997): Following cell fate in the living mouse embryo. *Development* 124, S. 1133-1137.
- Zheng, C., Heintz, N. und Hatten, M. E. (1996): CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science* 272, S. 417-419.
- Zhong, W., Feder, J. N., Jiang, M. M., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1996): Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* 17, S. 43-53.
- Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J. Y. und Rao, Y. (1999): Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23, S. 473-485.
- Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W. W., Guy, J. und Muzyczka, N. (1996): A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J.Virol.* 70, S. 4646-4654.

# Lebenslauf

## **Karsten Benzing**

geboren am 3. Januar 1970 in Mainz

### **Schulbesuch**

in Mainz, Bandung (Indonesien) und Helsinki (Finnland): 1976 – 1989

Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife (Reifeprüfung): Mai 1989, Deutsche Schule Helsinki

**Wehrdienst:** 1989

**Ausbildung zum Bankkaufmann:** Juli 1990 – Juni 1992, Mainzer Volksbank eG, Mainz

Kaufmannsgehilfenprüfung: Juni 1992, Industrie- und Handwerkskammer Rheinhessen

**Studium Biologie (Diplom):** Oktober 1992 – April 1998, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Diplomarbeit "Expression des Orphan-Rezeptors NCNF in der Embryogenese der Maus" am Institut für Physiologische Chemie: Februar 1997 – März 1998

Diplomprüfungen in den Fächern Zoologie (Hauptfach), Genetik, Physiologische Chemie und Immunologie: April 1998

**Promotion zum Dr. rer. nat.:** 1998 – 2002, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main, in der Abteilung Neuroanatomie