

Institut für Entwicklungsgenetik
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Institut für Molekulare Neurogenetik
Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Molekulare Faktoren, die die Entwicklung der Mittel-/Hinterhirnregion regulieren

Alexandra Blak

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Erwin Grill

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wurst
2. Univ.-Prof. Angelika Schnieke, Ph.D. (Univ. of
Edinburgh, UK)
3. Univ. Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Die Dissertation wurde am 19.10.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.01.2006 angenommen.

*Alles Wissen und alles
Vermehren unseres Wissens
endet nicht mit einem Schlußpunkt,
sondern mit einem Fragezeichen.*

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Musterbildung im zentralen Nervensystem | 5 |
| 2.1.1 | Organisationszentren im ZNS der Wirbeltiere | 5 |
| 2.1.2 | Das Mittel-/Hirnhirn Organisationszentrum (MHO) | 7 |
| 2.1.2.1 | Das genetische Netzwerk am MHO | 8 |
| 2.1.2.2 | Fgf8 ist ein Schlüsselprotein des MHO | 11 |
| 2.1.3 | Fgf8 und die Spezifizierung von dopaminergen und serotonergen Neuronen | 12 |
| 2.1.4 | Fgf Rezeptoren | 13 |
| 2.1.4.1. | Struktur der Fgfrs | 13 |
| 2.1.4.2 | Durch Fgfrs vermittelte Signaltransduktion | 14 |
| 2.1.4.3 | Expression von Fgfrs in der MHR | 17 |
| 2.1.4.4 | Fgfr Inaktivierungsstudien | 18 |
| 2.1.5 | Konditionaler Knock-out des Fgfr1 in der MHR | 21 |
| 2.2 | Neuronale Differenzierung – Neurogenese | 23 |
| 2.2.1 | Neurogenese und bHLH-Gene | 23 |
| 2.2.2 | Duale Funktion der bHLH-Gene | 25 |
| 2.2.3 | Struktur von bHLH Proteinen | 27 |
| 2.2.4 | <i>Megane</i>, ein neuer bHLH-O Transkriptionsfaktor | 28 |
| 3 | Zielsetzung der Doktorarbeit | 31 |
| 4 | Ergebnisse | 30 |
| 4.1 | Funktion des Fgf Rezeptors 2 in der Mittel-/Hirnhirn Region | 32 |
| 4.1.1 | Expressionsstudie der Fgfrs im Hinblick auf die Mittel-/Hirnhirngrenze | 33 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.1.1.1 | Expression des <i>Fgfr1</i> in der MHR der sich entwickelnden Maus | 33 |
| 4.1.1.2 | Expression des <i>Fgfr2</i> in der MHR der sich entwickelnden Maus | 34 |
| 4.1.1.3 | Expression des <i>Fgfr3</i> in der MHR der sich entwickelnden Maus | 38 |
| 4.1.2 | Inaktivierung des <i>Fgfr2</i> in der <i>En1</i> Domäne des Mittel- und Hinterhirns | 42 |
| 4.1.2.1 | Die gefloxt Fgf Rezeptor 2 Maus: <i>Fgfr2^{lox/lox}</i> | 43 |
| 4.1.2.2 | Die <i>En1^{Cre/+}</i> Maus | 46 |
| 4.1.2.3 | Expression, Aktivität und Funktionalität der <i>Cre</i> Rekombinase im <i>En1</i> -Lokus | 46 |
| 4.1.2.3.1 | <i>Nachweis der Aktivität der Cre Rekombinase in frühen embryonalen Stadien</i> | 47 |
| 4.1.2.4 | Zucht der konditionalen <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus | 49 |
| 4.1.2.5 | Nachweis der Deletion des <i>Fgfr2</i> Exon 5 im <i>En1</i> -Locus in embryonalen Stadien | 50 |
| 4.1.2.6 | Nachweis der Deletion des <i>Fgfr2</i> Exon 5 im adulten Tier | 51 |
| 4.1.3 | Phänotypische Charakterisierung der <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus | 52 |
| 4.1.3.1 | Untersuchung der Musterbildung in der <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus während der frühen Mittel- und Hinterhirnentwicklung | 52 |
| 4.1.3.2 | Untersuchung der histologischen und zellulären Integrität des ventralen Mittelhirns in der <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus während der frühen Embryonalentwicklung | 58 |
| 4.1.3.3 | Untersuchung der GABAergen, noradrenergen und serotonergen Neurone sowie der Hirnnervenkerne der <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus | 59 |
| 4.1.3.3 | Untersuchung des Expressionsmusters von Genen, die während der Spezifizierung und Differenzierung von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert werden | 60 |
| 4.1.3.4 | Untersuchung des intrazellulären FGF Signaltransduktionsweges in den <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Mäusen | 63 |
| 4.1.3.5 | Untersuchung der Ko-Expression der <i>Cre</i> Rekombinase und des <i>Fgfr2</i> im adulten Maushirn | 68 |
| 4.1.3.6 | Morphologische Untersuchung der adulten <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus | 70 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 4.1.3.6.1 | <i>Nissl-Färbung</i> | 70 |
| 4.1.3.7 | Färbung des kalzium-bindenden Proteins Parvalbumin | 71 |
| 4.1.3.8 | Cytochrom Oxidase Färbung | 72 |
| 4.1.3.9 | Untersuchung der Neurotransmittersysteme der adulten <i>En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus | 74 |
| 4.1.3.9.1 | <i>Untersuchung des GABAergen Systems</i> | 74 |
| 4.1.3.9.2 | <i>Untersuchung des serotonergen Systems</i> | 75 |
| 4.1.3.9.3 | <i>Untersuchung des dopaminergen Systems</i> | 76 |
| 4.1.3.9.4 | <i>Untersuchung des cholinergen Systems</i> | 78 |
| 4.1.4 | Herstellung der konditionalen <i>Fgfr1</i> und <i>Fgfr2</i> | |
| | Doppelmutante: <i>En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}</i> | 81 |
| 4.1.5 | Analyse der <i>En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}</i> Maus | 81 |
| 4.1.5.1 | Analyse der Hirnmorphologie | 81 |
| 4.1.5.2 | Untersuchung von neuronalen Subpopulationen sowie des dritten und vierten Hirnnervenkerns in den Doppelmutanten | 82 |
| 4.2 | Identifikation von Interaktionspartnern des proneuralen bHLH Genes <i>Megane</i> mittels des Gal4 Hefe Zwei-Hybrid Systems | 89 |
| 4.2.1 | Etablierung des Hefe Zwei-Hybrid Systems | 89 |
| 4.2.2 | Der Hefe Zwei-Hybrid Screen mit einer selbst hergestellten cDNA- Bibliothek aus E9 – E10.5 Mittelhirngewebe | 91 |
| 4.2.2.1 | Konstruktion und Screening der cDNA Bibliothek aus E9-E10.5 Mittelhirngewebe | 91 |
| 4.2.2.2 | Selektion der putativen positiven Interaktoren des unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screens | 92 |
| 4.2.2.3 | Experimente zur Verifizierung der Interaktion zwischen <i>Mgn/Nr2f2</i> und <i>Mgn/Tgfβ2</i> in Hefe | 95 |
| 4.2.2.4 | Verifizierung der Interaktion von <i>Mgn/Nr2f2</i> in kultivierten Säugetierzellen | 95 |
| 4.2.2.5 | Untersuchung der Expression von <i>Mgn</i> und <i>Nr2f2</i> <i>in vivo</i> | 96 |
| 4.2.3 | Der Hefe Zwei-Hybrid Screen mit ausgewählten bHLH Proteinen | 100 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 4.2.3.1 | Interaktion von bHLH Proteinen mit Mgn im Hefe Zwei-Hybrid System | 100 |
| 4.2.3.2 | β -Galaktosidase Test zur Verifizierung der in der Hefe erhaltenen Ergebnisse | 102 |
| 4.2.3.3 | Verifizierung der Interaktoren von Mgn/Mgn und Mgn/Mash1 in kultivierten Säugetierzellen | 104 |
| 4.2.4 | Untersuchungen zur Funktion der Interaktion von Mgn mit Mash1 | 106 |
| 4.2.4.1 | Feststellung des Expressionsmusters von <i>Mgn</i> und <i>Mash1</i> im embryonalen Gehirn | 106 |
| 4.2.4.2 | Expressionsmuster von <i>Mgn</i> , <i>Mash1</i> und dem GABAergen Marker <i>GAD67</i> im wt Mausembryo | 109 |
| 4.2.4.3 | Analyse des GABAergen Phänotyps in Knock-out Modellen von <i>Mgn</i> und <i>Mash1</i> | 111 |
| 4.2.5 | Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung von Mgn und Mash1 auf transkriptioneller Ebene | 116 |
| 5 | Diskussion | 119 |
| 5.1 | Die Rolle des <i>Fgf</i> Rezeptor 2 in der Musterbildung der MHR | 119 |
| 5.1.1 | Expression der Fgf Rezeptoren 1-4 im Mittel-/Hinterhirn Bereich | 119 |
| 5.1.2 | Besitzt Fgf8 eine repressive Wirkung auf die Fgfrs? | 121 |
| 5.1.3 | Welcher Fgfr vermittelt die musterbildende Funktion von Fgf8 an der MHG? | 122 |
| 5.1.4 | Die konditionale <i>En1</i>^{Cre/+}<i>Fgfr2</i>^{lox/lox} Mutante | 123 |
| 5.1.4.1 | Technische Aspekte | 123 |
| 5.1.4.2 | Analyse der <i>En1</i> ^{Cre/+} <i>Fgfr2</i> ^{lox/lox} Mutante: kein veränderter Phänotyp | 124 |
| 5.1.4.3 | Der unveränderte Phänotyp der <i>En1</i> ^{Cre/+} <i>Fgfr2</i> ^{lox/lox} Mutante könnte durch einen kompensatorischen Mechanismus erklärt werden | 126 |
| 5.1.4.4 | Der <i>Fgfr1</i> ist mit dem <i>Fgfr2</i> in der MHR funktionell redundant | 126 |
| 5.1.4.5 | Analyse der <i>En1</i> ^{Cre/+} <i>Fgfr1</i> ^{lox/lox} <i>Fgfr1</i> ^{lox/lox} Mutante: Verlust der dorsalen und ventralen MHR | 127 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 5.1.4.6 | Die Entwicklung der MHR ist dosisabhängig von der Stärke des Fgf8 Signals | 129 |
| 5.2 | Rolle von Mgn in der Neurogenese im Mesencephalon | 131 |
| 5.2.1 | Identifikation von Mgn-Interaktionspartner mittels des Hefe Zwei-Hybrid-Systems – unvoreingenommener Screen: Mgn interagiert mit Nr2f2 | 131 |
| 5.2.2 | Identifikation von Interaktionspartner mittels des Hefe Zwei-Hybrid-Systems – Hypothesengetriebener Screen: Mgn interagiert mit Mash1 und bildet Homodimere | 132 |
| 5.2.2.1 | <i>Mgn</i> ist mit <i>Mash1</i> in bestimmten Bereichen des sich entwickelnden Neuralrohrs ko-exprimiert | 133 |
| 5.2.2.2 | <i>Mgn</i> und <i>Mash1</i> regulieren sich gegenseitig nicht auf transkriptioneller Ebene | 134 |
| 5.2.2.3 | <i>Mgn</i> und <i>Mash1</i> Expression in der VZ ist mit der Expression von <i>GAD67</i> in unterschiedlichen Regionen des embryonalen Maushirns assoziiert | 134 |
| 5.2.2.4 | Fehlen des terminalen GABAergen Phänotyps in spezifischen Regionen der <i>Mgn</i> KO Mäuse | 135 |
| 5.2.2.5 | Fehlen des terminalen GABAergen Phänotyps in spezifischen Regionen der <i>Mash1</i> KO Mäuse | 137 |
| 5.2.3 | Die Interaktion zwischen Mgn und Mash1 ist essentiell für die Entstehung von terminal differenzierten GABAergen Neuronen | 137 |
| 5.2.4 | Unterschiedliche Kombinationen von Genen bestimmen den GABAergen Phänotyp in unterschiedlichen Regionen des sich entwickelnden ZNS | 138 |
| 6 | Material und Methoden | 140 |
| 6.1 | Geräteliste | 140 |
| 6.2 | Bezugsquellen von Enzymen, Chemikalien, Kits und anderen Verbrauchsmaterialien | 141 |
| 6.3 | Arbeitstechniken auf der Basis von Ribonukleinsäuren | 142 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 6.3.1 | Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen | 142 |
| 6.3.2 | Dephosphorylierung eines linearisierten Plasmids | 142 |
| 6.3.3 | Agarosegelelektrophorese von DNA | 142 |
| 6.3.4 | Aufreinigung von DNA | 143 |
| 6.3.4.1 | Aufreinigung eines Plasmides oder eines Fragmentes aus dem Agarosegel | 143 |
| 6.3.4.2 | Aufreinigung eines PCR-Produktes | 143 |
| 6.3.5 | Ligation | 143 |
| 6.3.5.1 | TOPO-TA Klonierung | 144 |
| 6.3.6 | Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 144 |
| 6.3.7 | Automatische DNA-Sequenzierung | 145 |
| 6.3.8 | Herstellung einer DNA-Sonde durch radioaktive Markierung | 146 |
| 6.4 | Arbeiten mit genomischer Maus-DNA | 147 |
| 6.4.1 | Extraktion von DNA aus Mausschwanz-DNA und adultem Hirngewebe | 147 |
| 6.4.2 | Extraktion von DNA aus der Amnion-Hülle von Maus Embryonen | 147 |
| 6.4.3 | Genomischer Southern-Blot und Hybridisierung mit DNA-Proben | 148 |
| 6.4.3.1 | Restriktionsenzymatischer Verdau genomischer DNA | 148 |
| 6.4.3.2 | Auftrennung der genomischen DNA im Agarosegel mit anschließendem Blotting | 148 |
| 6.4.3.3 | Hybridisierung der genomischen DNA mit einer DNA-Sonde | 148 |
| 6.5 | Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA) | 149 |
| 6.5.1 | Präparation von Gesamt-RNA aus embryonalem Hirngewebe | 149 |
| 6.5.2 | Überprüfung der Integrität der RNA mittels eines Agarose-Geles | 149 |
| 6.6 | Allgemeine Methoden zur Arbeit mit dem Prokaryonten E.coli | 150 |
| 6.6.1 | Lagerung von Bakterien | 150 |
| 6.6.2 | Herstellung transformationskompetenter Bakterien | 150 |
| 6.6.3 | Chemische Transformation von Bakterien | 151 |
| 6.6.4 | Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien | 151 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 6.7 | Allgemeine Methoden zur Arbeit mit der Hefe | |
| | <i>Sacharomyces cerevisiae</i> | 152 |
| 6.7.1 | Kultivierung und Selektion auf bestimmte Eigenschaften | 152 |
| 6.7.2 | Herstellung kompetenter Hefezellen im kleinen Maßstab | 152 |
| 6.7.3 | Transformation von Hefe im kleinen Maßstab | 153 |
| 6.7.4 | Isolation von Proteinen aus Hefe | 153 |
| 6.7.5 | Isolierung von Plasmiden aus Hefe | 154 |
| 6.7.6 | PCR aus Hefezellysat | 155 |
| 6.8 | Das Hefe Gal4 Zwei-Hybrid-System – Etablierung der | |
| | Köder- und Beute- Hefestämme | 156 |
| 6.8.1 | Verifizierung des korrekten Phänotyps der Hefe-Stämme | |
| | AH109 und Y187 | 157 |
| 6.8.2 | Herstellung der Köderproteine für den | |
| | Hefe Zwei-Hybrid Screen | 158 |
| 6.8.2.1 | Klonierung der Köderkonstrukte pGBKT7- <i>Mgn</i> und pGBKT7- <i>Ngn2</i> | 158 |
| 6.8.2.2 | Transformation der Köderplasmide pGBKT7- <i>Mgn</i> und pGBKT7- <i>Ngn2</i> in den Hefestamm AH109 | 159 |
| 6.8.2.3 | Test auf Selbstaktivierung der Hefe-Reportergene durch die Köder-Konstrukte pGBKT7- <i>Mgn</i> und pGBKT7- <i>Ngn2</i> | 159 |
| 6.8.2.4 | Überprüfung der Toxizität der pGBKT7- <i>Mgn</i> und pGBKT7- <i>Ngn2</i> Köderkonstrukte | 160 |
| 6.8.3 | Herstellung der Beuteproteine für den | |
| | Hefe Zwei-Hybrid Screen | 160 |
| 6.8.3.1 | Klonierung von <i>Mgn</i> und der bHLH Gene <i>Mash1</i> , <i>Ngn1</i> , 2, 3 und von <i>Nr2f2</i> in den Beute-Vektor pGADT7 | 160 |
| 6.8.3.2 | Transformation der Beute-Konstrukte pGADT7- <i>Mgn</i> , - <i>Mash1</i> , - <i>Ngn1</i> , - <i>Ngn2</i> , - <i>Ngn3</i> und - <i>Nr2f2</i> in den Hefestamm Y187 | 161 |
| 6.8.4 | Verpaaren zweier transformierter Hefe Stämme im | |
| | kleinen Maßstab und Selektion auf eine Interaktion | 161 |
| 6.8.5 | Screening einer konstruierten cDNA Bibliothek | |
| | auf Interaktionspartner von <i>Mgn</i> | 162 |
| 6.8.5.1 | Selektion von potentiellen Proteininteraktoren des Hefe Zwei-Hybrid Screens | 164 |

| | | |
|---------------|--|------------|
| 6.8.5.2 | β-Galaktosidase Test | 164 |
| 6.8.5.3 | Suche nach Homologien in der Blast Datenbank | 165 |
| 6.8.6 | Verifizierung der im unvoreingenommenen und hypothesengetriebenen Hefe Zwei-Hybrid Screen gefundenen Interaktionen | 165 |
| 6.8.6.1 | Isolation der Beute-Vektoren aus dem unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen | 165 |
| 6.8.6.2 | Überprüfung der Interaktionen des unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screens | 166 |
| 6.8.6.3 | Kontroll-Verpaarungen zur Verifizierung der Interaktionen aus dem unvoreingenommenen und hypothesengetriebenen Hefe Zwei-Hybrid Screen | 166 |
| 6.9 | Säugetierzellkultur | 166 |
| 6.9.1 | Klonierung von <i>Mgn</i>, <i>Mash1</i>, <i>Ngn2</i> und <i>Nr2f2</i> in Säugetier Expressionsvektoren | 166 |
| 6.9.2 | Kultivierung von Zellen | 167 |
| 6.9.3 | Transiente Transfektion von HEK Zellen | 168 |
| 6.10 | Proteinbiochemische Methoden | 168 |
| 6.10.1 | Proteingewinnung aus Zellen | 168 |
| 6.10.2 | Bestimmung der Protein Konzentration | 169 |
| 6.10.3 | Ko-Immunpräzipitation | 169 |
| 6.10.4 | Auftrennung von Proteinen auf denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gelen und Western blotting | 171 |
| 6.11 | Tierhaltung | 172 |
| 6.11.1 | Bestimmung embryonaler Stadien | 172 |
| 6.12 | Morphologische Techniken | 173 |
| 6.12.1 | Perfusion von adulten Mäusen | 173 |
| 6.12.2 | Schnittechniken | 173 |
| 6.12.2.1 | Schneiden von Gewebe mit dem Cryostat | 173 |
| 6.12.2.2 | Schneiden von Embryonen und adulten Gehirnen mit dem Mikrotom | 174 |
| 6.12.2.3 | Schneiden von adulten Hirnen mit dem Vibratom | 175 |
| 6.12.3 | Immunohistochemie und Färbungen | 175 |
| 6.12.3.1 | Immunhistochemische Färbung an frei schwimmenden Schnitten | 175 |

| | | |
|---------------|---|------------|
| 6.12.3.2 | Immunhistochemische Färbung auf Paraffin Schnitten | 176 |
| 6.12.3.3 | LacZ-Färbung | 177 |
| 6.12.3.4 | Kresylviolett –Färbung | 178 |
| 6.12.3.5 | Cytochrom-Oxidase Färbung | 178 |
| 6.12.3.6 | Acetylcholinesterase Färbung an frei schwimmenden Schnitten | 179 |
| 6.12.4 | In-situ Hybridisierung (ISH) mit radioaktiv markierten Sonden auf Paraffin-Schnitten | 180 |
| 6.12.4.1 | Herstellung der Riboprobe | 180 |
| 6.12.4.2 | Vorbehandlung der Schnitte | 180 |
| 6.12.4.3 | Hybridisierung der Schnitte | 181 |
| 6.12.4.4 | Waschen der Objektträger | 183 |
| 6.12.4.5 | Dippen der Objektträger in Fotoemulsion | 184 |
| 6.12.4.6 | Entwicklung der Objektträger | 184 |
| 6.13 | Dokumentation histologischer Ergebnisse | 185 |
| 7 | Anhang | 186 |
| 7.1 | Vektoren | 186 |
| 7.1.1 | Hefe Zwei-Hybrid System : Ködervektoren | 186 |
| 7.1.2 | Hefe Zwei-Hybrid System : Beutevektoren | 187 |
| 7.1.3 | Zellkultur: Säugetier-Expressionsvektoren | 188 |
| 7.2 | Mauslinien | 189 |
| 7.3 | Bakterien- und Hefestämme | 189 |
| 7.3.1 | Bakterien | 189 |
| 7.4 | Liste der Oligonukleotide | 190 |
| 7.5 | In-Situ Sonden | 191 |
| 7.6 | Abkürzungen | 193 |
| 8 | Danksagung | 197 |
| 9 | Literatur | 199 |

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit zwei Aspekten der Entwicklung der embryonalen Mittel-/Hinterhirnregion (MHR) der Maus: 1. der Musterbildung und 2. der Neurogenese.

Im ersten Projekt sollte der Fgf Rezeptor (Fgfr) identifiziert werden, der in der ventralen MHR die Musterbildungsfunktion von Fgf8 vermittelt.

Fgf8 operiert an der Mittel-/Hinterhirngrenze (MHG) als Schlüssel-Protein, das maßgeblich an der Musterbildung der gesamten MHR beteiligt ist. Zusätzlich ist es an der Entstehung der dopaminergen und serotonergen Neurone in der ventralen MHR beteiligt. Die Fgf Rezeptoren (Fgfrs) 1-4 sind in der Lage, Fgf Signale zu vermitteln. Expressionsstudien zeigten, dass der *Fgfr1* früh in der gesamten MHR exprimiert wird. Die konditionale Ausschaltung des *Fgfr1* mit Hilfe der *En1^{Cre/+}* Maus in der MHR spiegelte jedoch nicht den Phänotyp der konditionalen *Fgf8* MHR-spezifischen Mausmutante wider, in der die gesamte Region fehlte. Insbesondere war die ventrale MHR noch vorhanden und unverändert. Folglich muss ein anderer oder andere Fgfrs das ventrale Fgf8 Signal weiterleiten. Die von mir durchgeführte detaillierte Expressionsstudie der *Fgfrs 1-4* in frühen Embryonalstadien identifizierte spezifisch den *Fgfr2* als Kandidaten für die Vermittlung des Fgf8 Signals in der ventralen MHR. Um die Funktion des *Fgfr2* in der MHR zu untersuchen, wurde eine MHR-spezifische) konditionale *Fgfr2* KO Mutante (*En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}*) untersucht. Die Maus überlebte bis ins adulte Stadium und zeigte weder einen Musterbildungsdefekt in der frühen MHR, noch einen defekt der neuronalen Subpopulationen dieser Region. Auch im adulten Tier war die Integrität des Gewebes der MHR gewahrt. Da weder der intrazelluläre Fgf8 Signaltransduktionsweg noch die anderen Fgfrs oder die Fgf Liganden (Fgfs) in dieser Maus unverändert waren, ist eine funktionelle Redundanz der Fgf Rezeptoren 1 und 2 in der ventralen MHR wahrscheinlich.

Um die Redundanz des *Fgfr2* mit dem *Fgfr1* zu überprüfen, wurden konditionale Doppel-Knock-outs hergestellt, in denen beide Rezeptoren in der MHR fehlen. Die Mäuse überlebten nicht und wiesen eine Deletion großer Teile der MHR auf. Insgesamt lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass die Fgfrs 1 und 2 in der MHR funktionell redundant agieren und höchstwahrscheinlich gendosisabhängig die musterbildende Funktion von Fgf8 in dieser Region gewährleisten.

Im zweiten Projekt sollten Interaktionspartner eines neuen basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktors, *Megane (Mgn)* mittels des Hefe Zwei-Hybrid Screens gefunden und charakterisiert werden. *Mgn* gehört zur Familie der bHLH Gene, von denen bekannt ist, dass sie an der Spezifizierung neuronaler Subpopulationen beteiligt sind, und die Proteine ihre Funktion als Homo- und Heterodimere ausüben. Das spezifische Expressionsmuster von *Mgn* im Mittelhirn legte nahe, dass dieses neue Gen an der Spezifizierung von mesencephalen Neuronenpopulationen beteiligt sein könnte. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch nichts über die Funktion von *Mgn* bekannt war, wurde mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems nach Interaktionspartnern von *Mgn* in dieser Region gesucht, um über diese Hinweise auf eine mögliche Funktion von *Mgn* in dieser Region zu erhalten. Es wurden dazu zwei Strategien verfolgt, ein unvoreingenommener Screen mit einer cDNA Bibliothek aus ventralem Mittelhirngewebe und eine hypothesenbasierte Überprüfung der Interaktion von *Mgn* mit den proneuralen bHLH Proteinen Mash1, Ngn1, Ngn2 und Ngn3. Es wurde eine Interaktion mit dem nukleären Rezeptor Nr2r2 und mit dem bHLH Protein Mash1 gefunden. Aufgrund des Expressionsmusters von *Mgn* und *Nr2f2* ist eine gemeinsame Funktion von *Mgn* und *Nr2f2* in der Neurogenese im caudalen Mesencephalon und der lateralen ganglionischen Eminenzen des Telencephalons, möglich. Bezüglich der Interaktion von *Mgn* mit Mash1, zeigte eine Ko-Expressionsstudie der entsprechenden Gene in embryonalen Stadien, dass beide Gene im ventralen Telencephalon, im Di- und im Mesencephalon miteinander ko-exprimiert sind. In diesen Regionen sind beide Gene gleichzeitig mit dem Marker für terminal differenzierte GABAerge Neurone, *GAD67*, ko-lokalisiert, was eine gemeinsame Funktion in der Entstehung von GABAergen Neuronen im embryonalen Gehirn nahe legt. Die Untersuchung der *Mgn* und *Mash1* Knock-out (KO) Mäuse, zeigte, dass in der Tat in beiden Mausmodellen der terminale Marker *GAD67* im dorsalen Di- und Mesencephalon deletiert, und im ventralen Mesencephalon hingegen stark reduziert war. In anderen Hirnregionen war die *GAD67* Expression in beiden KO Mäusen nicht betroffen. Wir konnten durch unsere Analysen zeigen, dass *Mgn* notwendig für die Entstehung des GABAergen Phänotyps insbesondere im Prectum und Tectum ist, und die von mir gefundene direkte Interaktion zwischen *Mgn* und Mash1 wahrscheinlich eine Rolle in diesem Prozess spielt.

2 Einleitung

Nach der Befruchtung der Eizelle und Durchlaufen der Gastrulation besteht der Wirbeltier-Embryo aus drei Keimblättern. Während das Endoderm die inneren Organe und das Mesoderm Muskeln, Knochen, Bindegewebe und Blutgefäße bildet, entwickeln sich aus dem äußersten Keimblatt, dem Ektoderm, die Epidermis und das Nervensystem. Durch Wechselwirkungen von Mesoderm und Ektoderm beginnt ab dem Embryonaltag 7.0 (E7.0) der Maus die neurale Induktion, die zur Bildung der Neuralplatte aus dem embryonalen Neuroektoderm führt (Gilbert, 1997). Nach Auffaltung der Neuralplatte zum tubulären Neuralrohr entstehen am rostralen Ende des Neuralrohrs drei Gehirnbläschen, die die Anlagen von Vorder-, Mittel und Hinterhirn (Pros-, Mes- und Rhombencephalon) darstellen.

Diese primären Gehirnbläschen werden im Laufe der Embryonalentwicklung zunehmend zu morphologisch distinkten Strukturen verfeinert, aus denen schließlich die adulten Strukturen des Gehirns entstehen. Aus dem Prosencephalon bildet sich zunächst das Telencephalon und Diencephalon. Im vollständig entwickelten adulten Gehirn schließlich umfasst das Telencephalon u.a. das Riechhirn (olfaktorischer Bulbus), das Striatum (Streifenkörper) und den Cortex (Großhirnrinde). Das Diencephalon bildet Thalamus und Hypothalamus. Das Mittelhirn besteht im dorsalen Bereich aus den superioren und inferioren Colliculi und ventral u.a. aus dem Tegmentum mit dem dritten Hirnnervenkern (III), dem „red nucleus“ (RN), der „substantia nigra“ (SN) und der „ventral tegmental area“ (VTA). Aus dem anterioren Teil des Rhombencephalon, dem Metencephalon (Nachhirn; Rhombomer 1), entwickeln sich ventral die Pons, der vierte Hirnnervenkern (IV), der Locus coeruleus (LC) und dorsal das Cerebellum (Kleinhirn). Der posteriore Teil des Rhombencephalons, das Myelencephalon (Markhirn, Rhombomer 2-7), bildet schließlich die Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark) (Abb. 1).

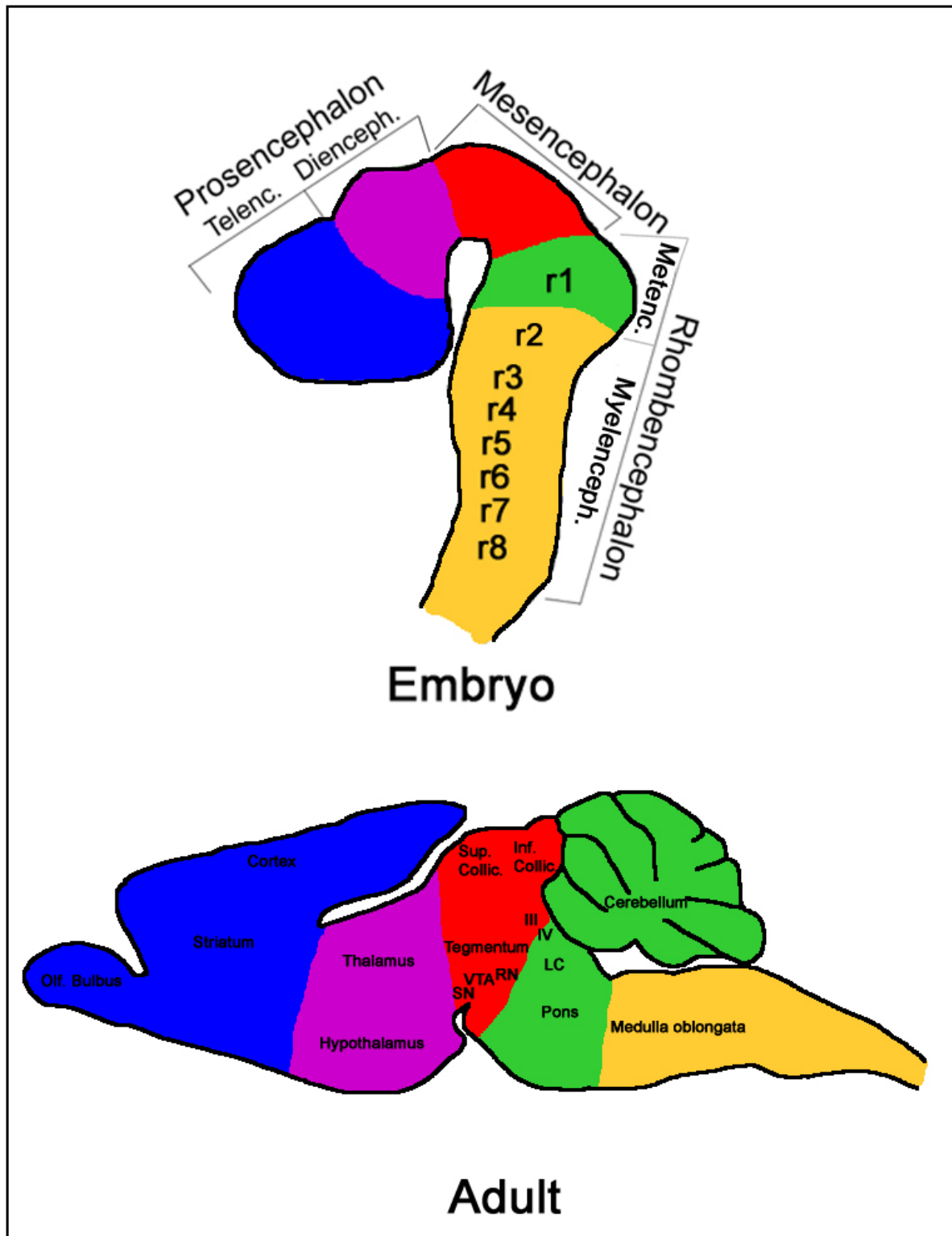


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entstehung adulter Maus-Hirnstrukturen aus dem embryonalen anterioren Neuralrohr. Während der Embryogenese (E8-E10) wird das anteriore Neuralrohr zunächst in Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon unterschieden. Ab E11 etwa kann man das Prosencephalon dann in Tel- und Diencephalon

unterteilen und das Rhombencephalon in Met- und Myelencephalon mit den Rhombomeren 1-8 (r1-r8). Diese Aufteilung ist auch noch im adulten Tier zu erkennen. SN: Substantia nigra, LC: locus coeruleus, VTA: ventral tegmental area, III: dritter Hirnnervenkern, IV: vierter Hirnnervenkern

Der Entwicklung dieser Gehirnregionen von der Embryogenese bis hin zum adulten Maushirn, liegen zwei zeitlich überlappende Prozesse zu Grunde:

1.) Auf der Gewebsebene organisieren sich die Zellpopulationen in den Wänden des Neuralrohrs zu den unterschiedlichen funktionellen Regionen des adulten Gehirns, wie z.B. dem Hypothalamus oder dem Cerebellum und 2.) Auf zellulärer Ebene differenzieren die neuroepithelialen Zellen des Neuralrohrs zu zahlreichen Subpopulationen von Nervenzellen (Neuronen) und Stützzellen (Gliazellen).

2.1 Musterbildung im zentralen Nervensystem

2.1.1 Organisationszentren im ZNS der Wirbeltiere

Bereits im Jahre 1921 konnte Hans Spemann zusammen mit Hilde Proescholdt-Mangold anhand der Urmundlippe von Amphibien-Embryonen zeigen, dass es „Organisatoren“ gibt, d.h. Zellverbände, die die Fähigkeit besitzen, durch Weitergabe entwicklungsrelevanter Informationen das Schicksal benachbarter Zellen oder Gewebe zu beeinflussen (Übersicht in Hamburger, 1969). Die Urmundlippe stellt dabei den sog. „primären“ Organisator dar, der die Ausbildung eines vollständigen Nervensystems bedingt.

Während der frühen Entwicklung des zentralen Nervensystems von Wirbeltieren spielen „sekundäre“ Organisationszentren eine bedeutende Rolle. Entlang der A/P Achse wirken dabei hauptsächlich drei Organisationszentren, die durch ihre musterbildenden Eigenschaften das Schicksal der angrenzenden Gewebe bestimmen. Das als „anterior neural ridge“ (ANR) bezeichnete Organisationszentrum, das am anterioren Ende der Neuralplatte liegt, bestimmt die Entwicklung des vorderen Teils des Neuralrohrs (Shimamura und Rubenstein, 1997). Das an der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn gelegene Mittel-/Hinterhirnorganisationszentrum (MHO) regionalisiert das Mittelhirns und das anteriore Hinterhirn (Rhombomer 1)

(Joyner 1996, Wassef und Joyner, 1997, Liu und Joyner 2001a, 2001b, Echevarria et al., 2003, Übersicht in Wurst und Bally-Cuif, 2001, Rhinn und Brand, 2001, Nakamura und Watanabe, 2005, Prakash und Wurst, 2004). Die im Diencephalon gelegene zona limitans intrathalamica (ZLI) ist zwischen Prethalamus (frühere Bezeichnung: ventraler Thalamus) und Thalamus (frühere Bezeichnung: dorsaler Thalamus) gelegen und bestimmt die Entwicklung dieser Bereiche (Übersicht in Echevarria et al., 2003, Kiecker und Lumsden, 2004). Entlang der D/V Achse bestimmt vor allem die ventral entlang des gesamten anterioren Neuralrohrs (Telencephalon bis r1) gelegene Grundplatte (GP), die Entwicklung des Nervensystems entscheidend mit (Übersicht in Echevarria et al., 2003) (Abb. 2).

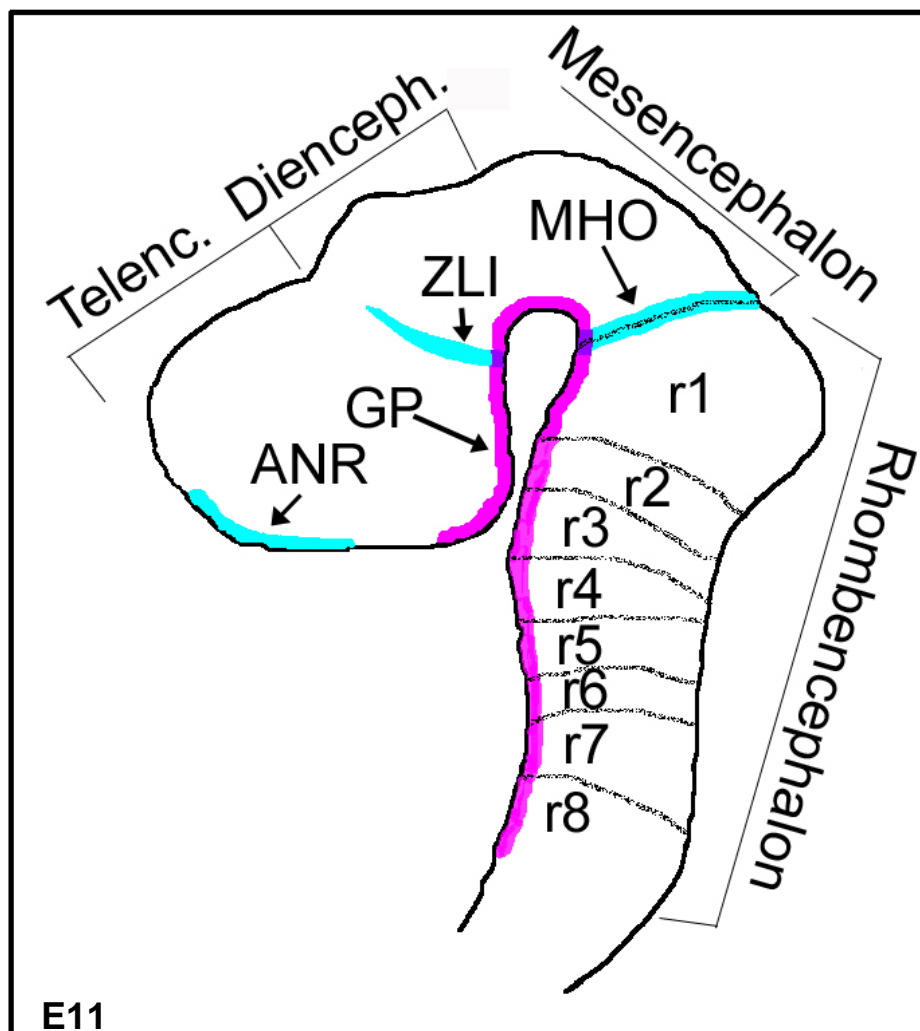


Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisationszentren im sich entwickelnden ZNS der Maus. Entlang der A/P Achse bestimmt die anterior neural ridge (ANR) die

Entwicklung des Telencephalons, die zona limitans intrathalamica (ZLI), bestimmt die Entwicklung des Diencephalons und das Mittel-/Hinterhirnorganisationszentrum (MHO) an der Grenze zwischen Mittelhirn und Hinterhirn bestimmt die Entwicklung des Mittelhirns und anterioren Hinterhirns (r1). Entlang der D/V Achse wirkt die Grundplatte an der Entwicklung des anterioren Neuralrohrs mit. Die A/P Organisationszentren sind in türkis gekennzeichnet, die Grundplatte ist in pink eingezeichnet. ANR: anterior neural ridge, GP: Grundplatte, MHO: Mittel-/Hinterhirnorganisationszentrum, ZLI: zona limitans intrathalamica

2.1.2 Das Mittel-/Hinterhirn Organisationszentrum (MHO)

Die Transplantation von Gewebe der Mittel-/Hinterhirngrenze (MHG) in das caudale Vorderhirn und rostrale Hinterhirn im Huhn zeigte Mitte der 80er Jahre, dass dieses Gewebe ektopisch die Expression von Genen, die in einem charakteristischen Muster an der MHG exprimiert werden (siehe 2.1.2.1), in den benachbarten Gehirn-Arealen induzieren kann. Dieser ektopischen Genexpression folgte die Bildung von Mittel- oder Hinterhirn-Strukturen in den angrenzenden Geweben (Martinez et al., 1991, 1995) (Abb. 3), was endgültig die Funktion dieser Region als Organisationszentrum bewies.

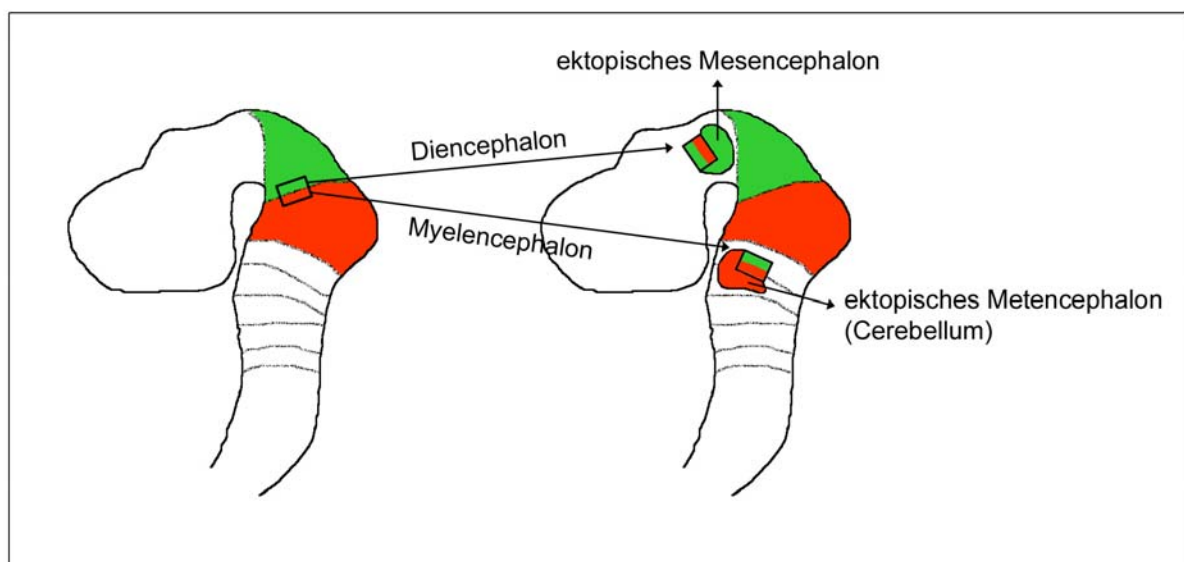


Abb. 3: Schematische Darstellung der Transplantationsexperimente von MHG-Gewebe
 Transplantiertes Mittel-/Hinterhirngewebe ist in der Lage, sowohl im caudalen Diencephalon als auch im rostralen Myelencephalon ektopisches Mittelhirn (grün) oder cerebellare

Strukturen (rot) zu induzieren. Das Mittelhirn ist grün dargestellt, Rhombomer 1 ist rot dargestellt.

2.1.2.1 Das genetische Netzwerk am MHO

Die frühe Mittel-/Hinterhirnregion (MHR) wird durch sehr spezifische Expressionsmuster der Gene *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2/5*, *En1/2*, *Fgf8* und *Wnt1* charakterisiert (Übersicht in Wurst und Bally-Cuif, 2001, Raible und Brand, 2001). Im Folgenden werden die Expressionsmuster dieser Gene während der frühen Embryonalentwicklung beschrieben.

Bereits an Tag 7.5 der Embryonalentwicklung der Maus wird das Neuroektoderm durch die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren *Otx2* und *Gbx2* regionalisiert: beide Gene markieren dabei jeweils den anterioren bzw. posterioren Epiblasten (Millet et al., 1996, Niss und Leutz, 1998, Simeone et al., 1993, Wassarman et al., 1997). Zwischen den beiden Expressionsdomänen besteht zunächst eine Lücke, die sich jedoch schließt und es sogar zu einer zeitweisen Überlappung in einer engen Domäne kommt (Garda et al., 2001). Ab dem 4-6 Somiten-Stadium (E8) grenzen die beiden Expressionsdomänen an der zukünftigen Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn aneinander (Abb. 4A).

Noch bevor sich das Neuralrohr schließt, wird der "paired-box" Transkriptionsfaktor *Pax2* über die *Otx2* und *Gbx2* Expressionsdomänen hinweg exprimiert (Roswitch und McMahon, 1995). Im 1-Somiten Embryo werden dann der Homeobox Transkriptionsfaktor Engrailed 1 (*En1*) und das sezernierte Glykoprotein *Wnt1* innerhalb der *Pax2* Domäne initiiert (Abb. 4B) (Davis und Joyner, 1988, Roswitch und McMahon, 1995, McMahon et al., 1992). *Wnt1* Expression ist von Anfang an auf das Mittelhirn begrenzt. (Abb. 4B). Bei etwa 3-5 Somiten wird die Transkription von *Pax5* und *En2* in einer breiten Domäne, welche die gesamte MHR überspannt, initiiert (Davis und Joyner, 1988, Asano und Gruss, 1992). Zur gleichen Zeit beginnt auch die *Fgf8* Expression im rostralen Teil des *Gbx2* Territoriums (Abb. 4B). Anfangs ist diese Expression noch relativ breit (ganzes Rhombomer 1), verengt sich jedoch bald zu einem Ring im anterioren Teil von Rhombomer 1 (Crossley und Martin, 1995). Dieser Ring umfasst die Deck-, Flügel und Basalplatte und lässt die Grundplatte frei (Abb. 4C).

Außer den bereits beschriebenen Verfeinerungen der *Otx2*, *Gbx2* und *Fgf8* Expressionsmuster, verengen sich auch die Expressionsdomänen der anderen MHO Gene ab E9 (Abb. 4C). Die *Wnt1* Expression verengt sich im Mittelhirn zu einem Ring, der im posterioren Teil des Mittelhirns an der MHG das Neuralrohr umschließt. Weitere Expressionsdomänen sind die dorsale und ventrale Mittellinie des Mittelhirns und des caudalen Diencephalons (Parr et al., 1993). Auch die *En1/2* und *Pax5* Expressionsdomänen verengen sich, bleiben jedoch weiterhin in einem Bereich, die MHG überspannend exprimiert (Abb. 4C). Die *Pax2* Expression hingegen beschränkt sich ab E9.5 auf Rhombomer 1.

Knock-out Maus-Modelle der MHO Gene, konditionale Inaktivierungen und Mis-Expressionen haben gezeigt dass *Pax2/5*, *En1/2*, *Wnt1* und *Fgf8* notwendig für die korrekte Entwicklung des adulten Mittelhirns und anterioren Hinterhirns sind (Übersicht in Prakash und Wurst, 2004).

Diese Studien haben außerdem deutlich gezeigt, dass diese Gene ein strikt reguliertes Netzwerk bilden und früh auch für ihren gegenseitigen Expressionserhalt zuständig sind (Abb. 4C) (McMahon et al., 1992, Liu et al., 1999, Joyner et al., 2000, Liu und Joyner 2001a, 2001b, Ye et al., 2001, Übersicht in Wurst und Bally-Cuif, 2001). Durch die Interaktion dieser Proteine wird die Entwicklung des Mittelhirns und anterioren Hinterhirns eingeleitet. (Übersicht in Wurst und Bally-Cuif, 2001, Raible und Brand, 2004). Fehlt eines dieser Gene während der frühen Gehirnentwicklung, geht zunächst die Expression der anderen MHO-Gene verloren, gefolgt von Gewebeverlust in der MHR.

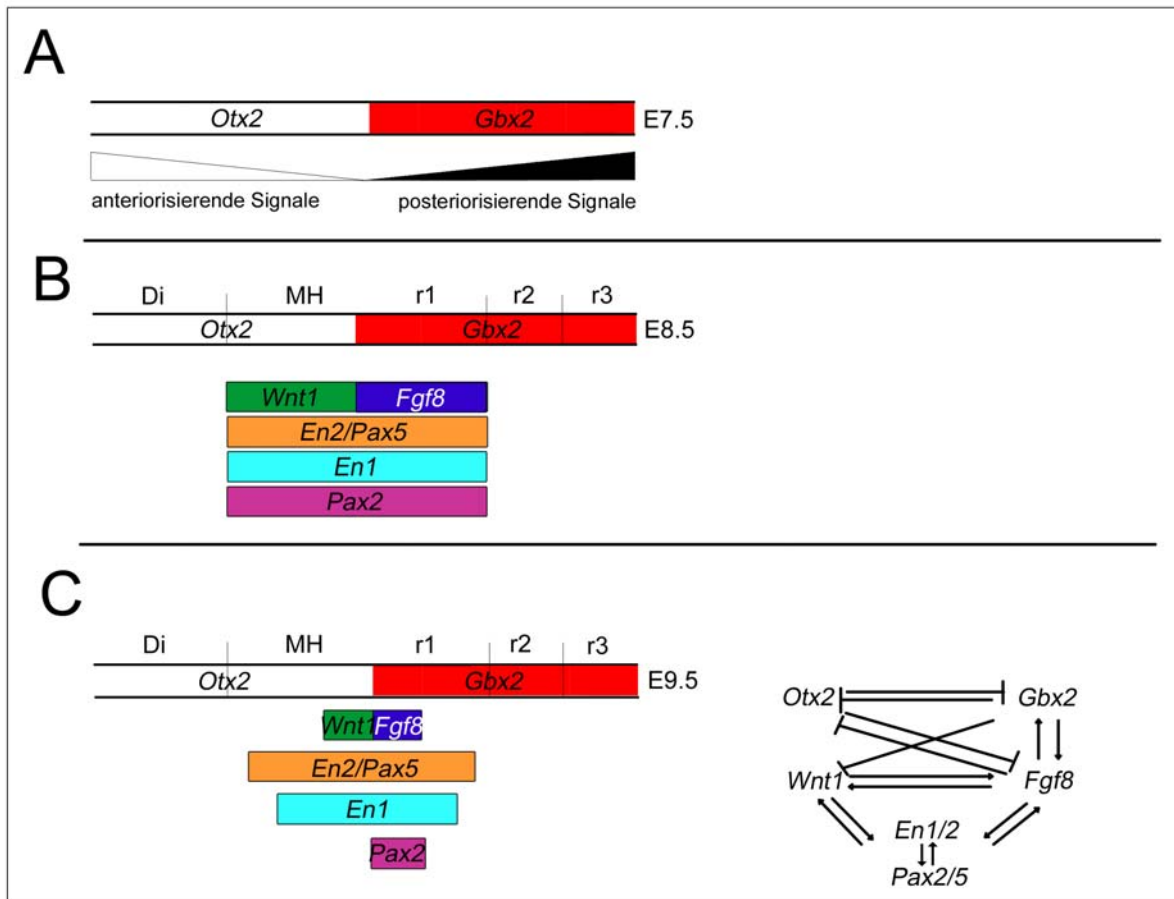


Abb. 4: Schematische Darstellung der räumlichen Beziehungen zwischen den an der MHG exprimierten Genen bei (A) E7.5, (B) E8.5 und (C) E9.5. (A) In der frühen Embryogenese (E7.5) legt die aneinander grenzende Expression von *Otx2* (weiß) und *Gbx2* (rot) fest an welcher Stelle sich die MHG bildet. Genetische Studien haben gezeigt, dass die frühe Gegenüberstellung der Expressionsdomänen von *Otx2* und *Gbx2* für die Positionierung der MHG, nicht jedoch für die initiale Expression der zeitlich nachfolgend an der MHG exprimierten Gene notwendig ist (Acampora et al., 1995, Millet et al., 1999, Acampora et al., 2001, Broccoli et al., 1999, Li und Joyner, 2001). **(B)** An der Grenze der *Otx2/Gbx2* Expression wird die Expression der Gene *Pax2/5*, *En1/2*, *Wnt1* und *Fgf8* voneinander unabhängig initiiert. Während *Pax2/5* und *En1/2* das gesamte Mittelhirn und r1 markieren, wird *Wnt1* zu diesem frühen Zeitpunkt im Mittelhirn und *Fgf8* angrenzend daran in r1 exprimiert. **(C)** Bei E9.5 haben sich die Expressionsdomänen der Gene an der MHG verfeinert. Während *En1/2* und *Pax5* weiterhin fast die gesamte MHR markieren, ist *Pax2* ebenso wie *Fgf8* nur noch in r1 exprimiert. *Wnt1* Expression beschränkt sich nun auf das caudale Mittelhirn. Etwa bei E9-E9.5 sind die Gene in ein komplexes regulatorisches Netzwerk eingebunden, welches den MHO darstellt.

2.1.2.2 Fgf8 ist ein Schlüsselprotein des MHO

Die Frage, ob eines dieser MHO-Gene alleine in der Lage ist, das genetische Netzwerk des MHO in der Maus zu etablieren, aufrechtzuerhalten und schließlich die Entwicklung des Mittel-/Hinterhirns einzuleiten, war eine zentrale Frage, die jedoch durch die Analyse von LOF-Mausmutanten der MHO-Gene aufgrund der Abhängigkeit der Gene untereinander nicht geklärt werden konnte. Schließlich gelang es mit sog. Kügelchen („bead“) Experimenten zu zeigen, dass der Fibroblastenwachstumsfaktor 8 (Fgf8) der Vermittler der MHO-Funktion ist.

Fgf8b (eine Isoform von Fgf8) getränkte beads, die in das Diencephalon von Huhn-Embryonen implantiert wurden, induzieren ein ektopisches Mittelhirn und Cerebellum (Crossley et al., 1996; Martinez et al., 1999; Shamim et al., 1999) (Abb. 5). Dieser Induktion geht die ektopische Expression der MHO Gene *Wnt1*, *En1/2*, *Pax2/5* und *Gbx2* voran. Gleichzeitig wird *Otx2* reprimiert (Crossley et al., 1996; Martinez et al., 1999; Liu et al., 1999; Liu und Joyner, 2001b). Interessanterweise, ist eine weitere ebenfalls in der MHR exprimierte Isoform, *Fgf8a*, nicht für die Musterbildungsfunktion, sondern für die Proliferation der MHR zuständig (Lee et al., 1997, Liu et al., 1999, Sato et al., 2001, Liu et al., 2003).

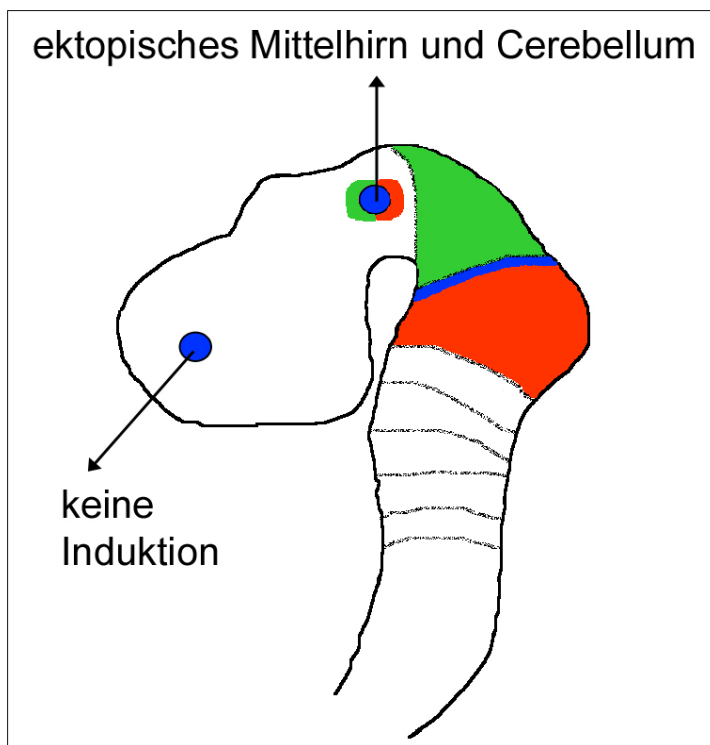


Abb. 5: Fgf8b beads (als blaue Kreise dargestellt) sind in der Lage, im Diencephalon Mittelhirn (grün) und Cerebellum (rot) zu induzieren. Das Mittelhirn ist grün gekennzeichnet, r1 ist rot gekennzeichnet.

Eine Notwendigkeit von Fgf8 für die korrekte Entwicklung der MHR konnte auch in konditionalen *Fgf8* KOs, in denen *Fgf8* in der MHR der Maus inaktiviert wurde, gezeigt werden (Chi et al., 2003). In dieser Mutante werden interessanterweise die MHO-Gene unabhängig von Fgf8 induziert, ihre Expression kann jedoch aufgrund des Fehlens von Fgf8 im regulatorischen Netzwerk (MHO) an der MHG nicht aufrechterhalten werden. Massive Apoptose setzt ein. Die MHR ist bei E10.5 vollständig deletiert (Chi et al., 2003). Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Zebrafisch *Acerebellar (ace)* Mutante, die ein Hypomorph von *Fgf8* darstellt. In dieser Mutante entwickeln sich Mittelhirn und Cerebellum nicht. Auch hier ist die Expression von MHO Genen initiiert, wird jedoch nicht aufrechterhalten (Reifers et al., 1998).

Man muss an dieser Stelle erwähnen, dass neben Fgf8 auch noch andere Fgfs (*Fgf15*, *Fgf17* und *Fgf18*) in der MHR exprimiert werden. Die Expression dieser Fgfs wird zeitlich nach der Expression von *Fgf8* initiiert (Gimeno et al., 2002, Saitsu et al., 2005, Maruoka et al., 1998; Xu et al., 2000). Eine Beteiligung an der Musterbildung in der frühen MHR konnte jedoch für Fgf17 und 18 ausgeschlossen werden (Xu et al., 2000, Liu et al., 2003, Ohuchi et al., 2000) und ist für Fgf15 nicht untersucht worden.

2.1.3 *Fgf8* und die Spezifizierung von dopaminergen und serotonergen Neuronen

In nächster Nähe zum MHO werden in der frühen Neuralentwicklung im ventralen Mittelhirn die dopaminergen Neurone des Mittelhirns und im ventralen Hinterhirn die serotonergen (5-HT) Neurone des Hinterhirns spezifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Position des MHO die Lokalisation und die Größe der dopaminergen und serotonergen Zellpopulationen bestimmt (Brodski et al., 2003).

Es wurde außerdem gezeigt, dass Fgf8 außer seiner Musterbildungsfunktion an der MHG auch einen spezifischen Effekt auf die Induktion von dopaminergen (DA) und 5-HT Neuronen besitzt. In sog. Explantatkulturen induziert Fgf8 gemeinsam mit dem sezernierten Molekül Shh, welches in der Grundplatte des Mittelhirns exprimiert wird,

ektopisch DA Neurone. Gemeinsam mit Fgf4 ist Fgf8 in der Lage, 5-HT Neurone an ektoischen Positionen zu induzieren (Ye et al., 1998, Hynes und Rosenthal, 1999).

2.1.4 Fgf Rezeptoren

Nachdem Fgf8 als Schlüsselmolekül des MHO identifiziert worden war, stellte sich die Frage nach den Rezeptoren, die das Fgf8 Signal an der MHG weiterleiten. Bereits Mitte der 80er Jahre wurde der erste Fgf Rezeptor (Fgfr) identifiziert (Übersicht in Powers et al., 2000). Bis zum heutigen Tage wurden vier Fgf Rezeptoren (Fgfrs) identifiziert, die zwischen 55 und 72% Homologie auf Proteinebene aufweisen (Johnson und Williams, 1993).

2.1.4.1 Struktur der Fgfrs

Die Fgfrs gehören zur Familie der membranständigen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (van der Geer et al., 1994). Ihr extrazellulärer Bereich bildet drei Immunglobulin-ähnliche Domänen (IgDI-III) aus, wobei die IgDII und IgDIII Domäne wichtig für die spezifische Bindung der Fgfs an die Rezeptoren sind (Wang et al., 1995b, Shi et al., 1993; Cheon et al., 1994, Zimmer et al., 1993). Die Funktion der IgDI liegt vermutlich in der Erhöhung der Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden (Wang et al., 1995a).

Der Bereich zwischen der IgDI und IgDII beherbergt eine Bindestelle für Zell-Adhäsionsmoleküle (CAM: L1, neurales CAM), welche neben den Fibroblastenwachstumsfaktoren auch die Fgfrs aktivieren können (Williams et al., 1994). Des Weiteren befindet sich dort auch die sog. „acidic box“, die durch Bindung zweiwertiger Kationen den Fgfr-Komplex stabilisiert (Chaudhuri et al., 1993). Die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne ist essentiell für die Aktivierung der Signalkaskade in der Zelle nach der Bindung eines Fgfs an den Rezeptor (s.2.2.4.2). Durch alternatives Spleißen der Exone 7,8 und 9, die für den c-terminalen Teil der IgDIII Domäne kodieren, entstehen vom Fgfr1, Fgfr2 und Fgfr3 sog. „b“ und „c“ Isoformen (Abb. 6) (Johnson et al., 1990; Chellaiah et al., 1994; Miki et al., 1992).

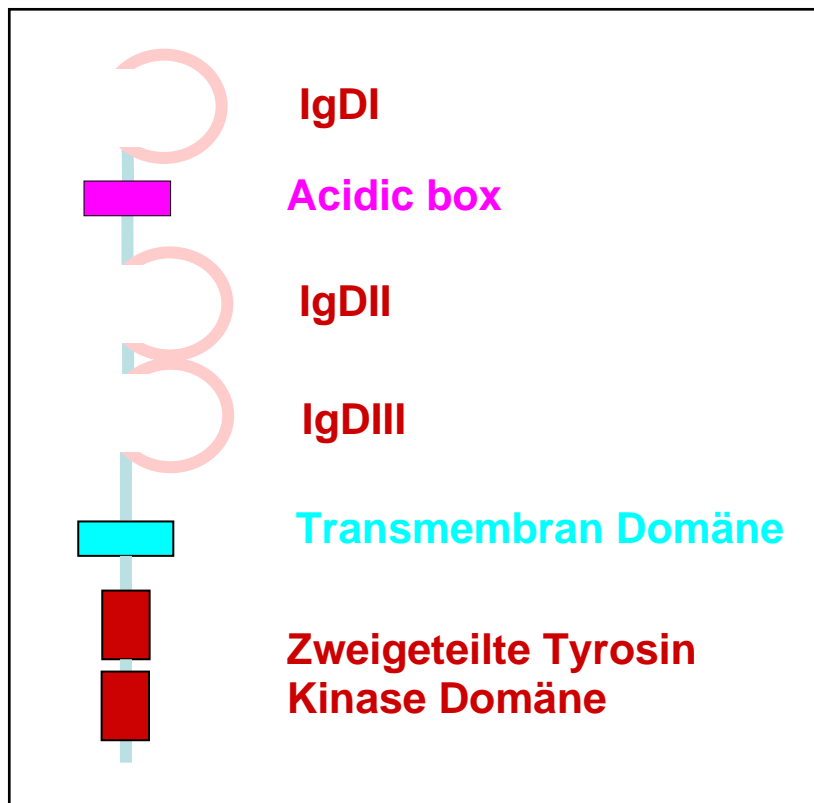


Abb. 6: Aufbau eines Fgf Rezeptors. Der extrazelluläre Bereich besteht aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig-like-D), wobei die IgDII und IgDIII Domäne wichtig für die spezifische Bindung der Fgfs an die Rezeptoren sind. Durch die „acidic box“, wird der Fgf-Rezeptor-Komplex stabilisiert. Die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne ist essentiell für die Aktivierung der Signalkaskade in der Zelle nach Bindung eines Fgf Moleküls an den Rezeptor. Durch alternatives Spleißen der IgDIII (Exons 8,9 und 10) entstehen die sog. „b“ und „c“ Isoformen.

2.1.4.2 Durch FgfRs vermittelte Signaltransduktion

Die Bindung der Fgfs an die hochaffinen FgfRs 1-4 erfolgt nach einem bestimmten Modell (Übersicht in Ornitz 2000). Jedes Fgf-Molekül bindet zunächst ein Heparansulfatproteoglykan (HSPG) Molekül (Yayon et al., 1991, Plotnikov et al., 1999). HSPGs sind ubiquitär exprimierte Makromoleküle, welche mit der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Die Bindung der Fgfs an die HSPGs erleichtert die Interaktion von Fgf und Fgfr und stabilisiert den Komplex gegen thermische Denaturierung und Proteolyse (Burgess und Maciag, 1989; Ornitz et al., 1995; Venkataraman et al., 1996). Die an der MHG exprimierten

Fgfs: *Fgf8*, *Fgf17* und *Fgf18* zeigen *in vitro* eine ähnliche Rezeptorbindespezifität (Fgfr3/Fgfr4>Fgfr2>Fgfr1) (MacArthur et al., 1995; Blunt et al., 1997; Xu et al., 2000). Durch die nach der Ligandenbindung stattfindende Bildung von Homo- und Heterodimeren der Fgfrs kommt es zu einer Aktivierung des Rezeptor-Komplexes (Bellot, 1991). Die Entstehung dieser Doppeldimere aus zwei Fgf-Molekülen und zwei Fgfr-Molekülen, führt zu einer intermolekularen Autophosphorylierung der Fgf-Rezeptoren im intrazellulären Bereich (Bellot et al., 1991). Diese Phosphorylierung aktiviert wiederum die Tyrosin-Kinase-Domäne, welche dann ihrerseits Moleküle innerhalb der verschiedenen Signalkaskaden phosphoryliert und dadurch aktiviert (Heldin, 1995; Mohammadi et al., 1996). Es können mehrere intrazelluläre Kaskaden aktiviert werden, darunter der RAS/MAPK Signalweg, der Phosphoinositol 3-Kinase/AKT (PI3K/AKT) und der Phospholipase-C γ /Protein Kinase C (PLC- γ /PKC) Signalweg (Abb. 7).

Bisher ist es jedoch nicht gelungen, einen dieser Signalwege mit einem bestimmten Rezeptortyp oder mit einer bestimmten biologischen Funktion zu assoziieren. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Signalwege unterschiedliche Zielgene aktivieren. So wird die MAPK Phosphatase 3 (Mkp3) durch den PI3K/AKT Weg aktiviert. Andere Zielgene, wie Sprouty (Spry), Sef, Erm und Pea3 sind hingegen durch den RAS/MAPK Signalweg aktiviert (Tsang et al., 2002, Niehrs und Meinhardt, 2002, Echevarria et al., 2005). Eine Regulation des Fgf Signals findet ebenfalls auf dieser Ebene statt. So inhibieren Spry, Sef und Mkp3 spezifisch den RAS/MAPK Weg in einer „Feedback“-Schleife (Impagnatiello et al., 2001; Fürthauer et al., 2002; Tsang et al., 2002, Echevarria et al., 2005).

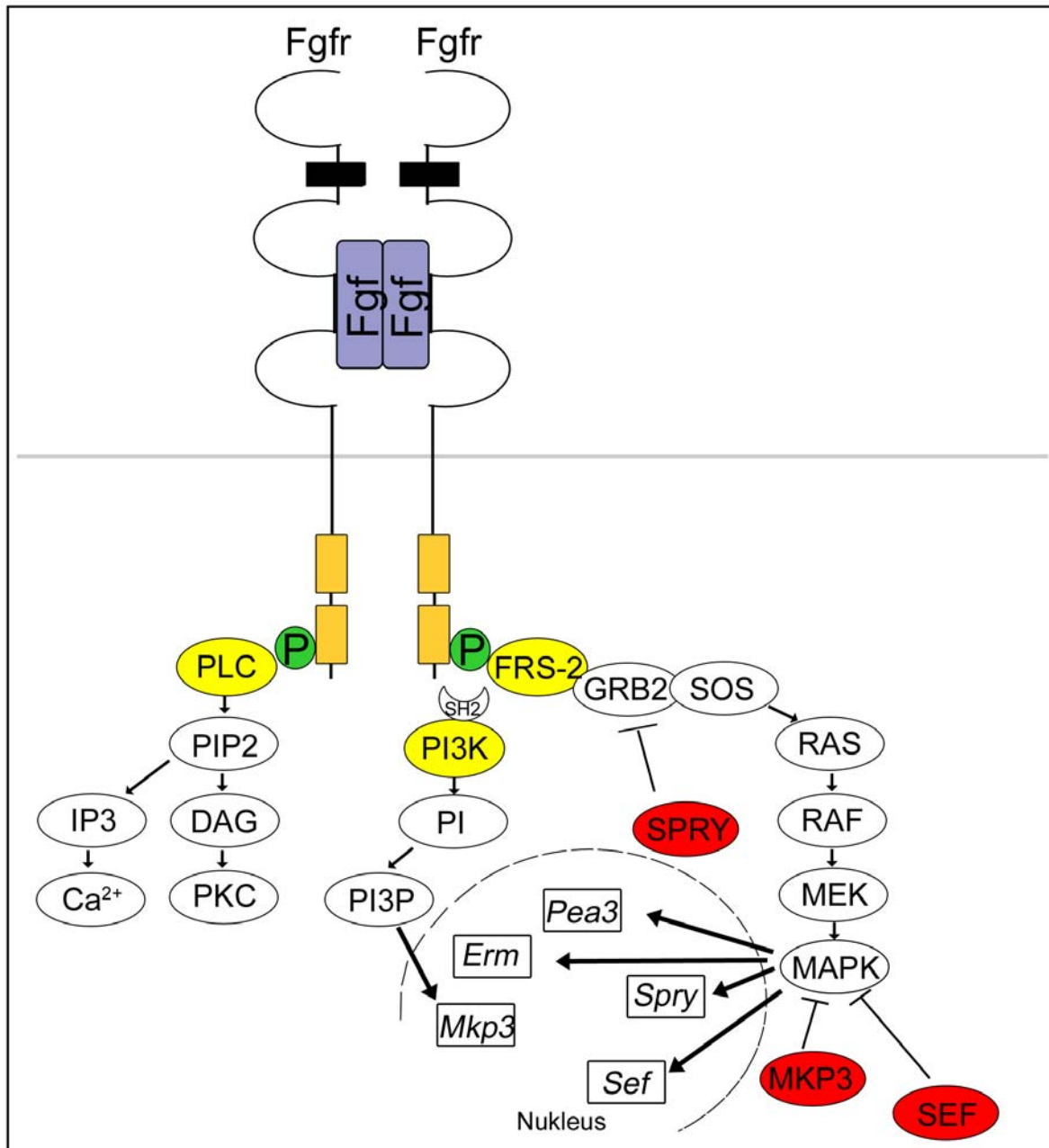


Abb. 7: Im RAS Signalweg phosphoryliert der aktivierte Fgfr das Adapterprotein FRS2 und aktiviert es somit. Dies wiederum schafft Bindestellen für den GRB2/SOS Adapterkomplex (Kouhara et al., 1997). Anschließend wird die GTPase RAS aktiviert, welche eine Reihe von MAP (mitogen-activated protein) Kinasen (RAF, MEK, MAPK) phosphoryliert (Kolch et al., 1993; Moodie et al., 1993; Stokoe and McCormick, 1997). MAPK gelangt in den Zellkern wo es Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und damit die Transkription von Ziel-Genen des Fgf Signaltransduktionsweges aktiviert (Inhibitoren (*spry*, *sef*) und Effektoren (*erm*, *Pea3*) (Aktivierungen durch die MAPK sind als schwarze Pfeile dargestellt). *Spry* (rot dargestellt) wirkt inhibierend auf den GRB2 Adapter und *Sef* (rot dargestellt) inhibiert die MAPK.

Ein weiterer dem Fgf Signal nachfolgender Weg ist der PI3K-Weg. Über diesen Weg wird nach Aktivierung der PI3K, Phosphoinositol (PI) gebildet und anschließend durch PI3P der Fgf-Inhibitor *Mkp3* aktiviert (Kawakami et al., 2003). *Mkp3* (rot dargestellt) kann wiederum die MAPK inhibieren (Camps et al., 1998, Muda et al., 1996).

PLC γ ist ein Phosphoprotein, das mit dem Fgfr-Dimer assoziiert nachdem ein Fgf-Dimer gebunden hat. Dies führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP₂) zu Inositol Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ stimuliert die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum. DAG und Ca²⁺ aktivieren die Protein Kinase C (Mohammadi et al., 1992; Peters et al., 1992). Die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration kann nachfolgend die Aktivität zahlreicher weiterer Proteine modulieren.

Diese vielschichtige Regulation beginnend mit der Ligandeninteraktion, über die Fgfr-Dimerisierung bis hin zu den intrazellulären Signalwegen, weist darauf hin, dass eine präzise Regulierung der Fgf Signalgebung kritisch für die korrekte Entwicklung der MHR zu sein scheint. Bisher konnte gezeigt werden, dass das Fgf8b Signal mittels des RAS/MAPK Signalweges weitergeleitet wird, nicht jedoch das Fgf8a Signal (Sato und Nakamura, 2004). Wie diese Regulation jedoch im Detail stattfindet und welche Rolle die Fgfrs dabei spielen ist noch ungeklärt.

2.1.4.3 Expression von Fgfrs in der MHR

Da, wie bereits erwähnt, Fgf8 in der Lage ist an alle 4 Fgfrs zu binden, würde die räumliche Korrelation der *Fgf8* Expression mit der seiner Rezeptoren einen Hinweis auf den Fgfr geben, welcher das musterbildende Signal von Fgf8 an der MHG weiterleiten könnte.

Anhand von vereinzelt Expressionsstudien der Fgfrs 1-3 an frühen Mausembryonen (E9-E10.5) war bekannt, dass der *Fgfr1* durchgehend im gesamten Neuralrohr exprimiert ist. Der Fgfr2 und der Fgfr3 werden im anterioren Mittelhirn und Hinterhirn, jedoch mit Aussparung der gesamten MHR, inklusive Rhombomer 1 exprimiert. Die Expression des *Fgfr3* wies zudem eine größere Lücke an der MHG als die Expression des *Fgfr2*, auf (Ishibashi und McMahon, 2002; Liu et al., 2003; Trokovic et al., 2003). Ein entsprechendes Expressionsmuster der Fgfrs war auch im Huhn gefunden worden (Walshe und Mason, 2000; Wilke et al., 1997). Im Zebrafisch ist der *Fgfr1* der einzige Fgfr, der an der MHG exprimiert wird (Scholpp et al., 2004,

Sleptsova-Friedrich et al., 2001). Der *Fgfr4* war außer durch RT-PCR im sich entwickelnden Neuralrohr der Maus nicht detektiert worden (Cool et al., 2002). Aufgrund dieser Studien kam ursprünglich der *Fgfr1* als einziger der vier Fgfrs für eine Funktion am MHO in Betracht.

2.1.4.4 Fgfr Inaktivierungsstudien

Um die Funktion von Fgfrs in der Maus zu definieren, wurden für alle 4 Fgfrs mutante Mäuse generiert, in denen entweder alle Spleißvarianten eines Rezeptors oder nur spezifische Varianten inaktiviert wurden. Die resultierenden Phänotypen reichen von einer frühen embryonalen Letalität bis hin zu nicht detektierbaren Veränderungen im adulten Tier (Tab. 1).

Die komplette Inaktivierung des *Fgfr1* durch homologe Rekombination (Knock-out, KO) führt zu einem letalen Phänotyp während der Gastrulation (Deng et al., 1994; Yamaguchi et al., 1994). *Fgfr1* Mutanten denen die „b“-Isoform fehlt, überleben, jedoch wurde diese Maus nicht auf Veränderungen im Gehirn untersucht (Partanen et al., 1998). Der *Fgfr2* spielt eine Funktion beim Auswachsen, der Differenzierung und Aufrechterhaltung der inneren Zellmasse des frühen Embryos. *Fgfr2* KO Tiere sterben daher auch sehr früh in der Embryogenese (Arman et al., 1998).

In *Fgfr2-b* oder *-c* Mutanten wurden Defekte der Gehirnentwicklung nicht beschrieben (De Moerlooze, 2000, Revest, 2001, Eswarakumar, 2002). Die Null-Mutante des *Fgfr3* weist Defekte der Knochen (verlängerte Knochen) und Taubheit auf (Deng et al., 1996), das Gehirn wurde jedoch bisher nicht analysiert. *Fgfr4* Null Mutanten zeigen keinen auffälligen Phänotyp (Weinstein et al., 1998). Eine Funktion der Fgfrs im Gehirn und speziell in der MHR konnte daher anhand dieser mutanten Mäuse nicht identifiziert werden.

| Gen | Art des KOs | allg. Phänotyp | Gehirn-Phänotyp | Referenz |
|---------------------|--|---|------------------------|--|
| <i>Fgfr1</i> | <i>Fgfr1</i> KO | Gastrulationsdefekte, sterben bei E8.5-9.5 | nicht analysierbar | Yamaguchi et al., 1994 Deng et al., 1994 Xu et al., 1999 |
| | <i>Fgfr1-b</i> ^{-/-} KO | Defekt in der Schwanzentwicklung | nicht analysiert | Partanen et al., 1998 |
| | <i>Fgfr1</i> Chimären | defekte Migration mesodermaler Zellen des Primitivstreifens | nicht analysiert | Ciruna et al., 1997 |
| | <i>Fgfr1</i> Hypomorph | Mutanten sterben neonatal; haben craniofaciale Defekte, Somiten- und Extremitäten-Defekte | nicht analysiert | Partanen et al., 1998 |
| <i>Fgfr2</i> | <i>Fgfr2</i> KO | sterben bei E4.5 | nicht analysierbar | Arman et al., 1998 |
| | tetraploide Fusion mit KO-Embryonen | Abnormalitäten der Extremitäten und der Lungenentwicklung | nicht analysiert | Arman, 1999 |
| | <i>Fgfr2</i> Hypomorph (IgDIII fehlt) | sterben bei E10.5 ohne Extremitäten- knospen und mit einer defekten Plazenta | nicht analysiert | Xu et al., 1998 |

| | | | | |
|----------------------|--------------------|--|------------------|---|
| | <i>Fgfr2-b</i> KO | Innenohrdefekte, Extremitäten-, Lungen- und craniofaciale Defekte | nicht analysiert | De Moerlooze et al., 2000 Revest, 2001 |
| | <i>Fgfr2-c</i> KO | Zwergenwachstum und Defekte der Schädelbildung | nicht analysiert | Eswarakumar, 2002 |
| <i>Fgfr3</i> | <i>Fgfr3</i> KO | übermäßiges Knochenwachstum und Innenohrdefekte | nicht analysiert | Colvin et al., 1996 Deng et al., 1996 |
| <i>Fgfr4:</i> | <i>Fgfr4</i> KO | kein Phänotyp | nicht analysiert | Weinstein et al., 1998 |
| | <i>Fgfr3/Fgfr4</i> | später Lungendefekt | nicht analysiert | Weinstein et al., 1998 |

Tab. 1: Fgfr LOF Studien zeigen keine spezifische Funktion der Rezeptoren an der MHG auf. Die Phänotypen reichen von früher embryonaler Letalität über Knochen-, Schädel- und Lungendefekte bis hin zu nicht detektierbaren Veränderungen. Auch die Analyse von hypomorphen und Spleißvariante-spezifischen Mutanten brachte keine Einsichten bezüglich der Funktion der Fgfrs an der MHG.

2.1.5 Konditionaler Knock-out des *Fgfr1* in der MHR

Aufgrund der publizierten Expressionsstudien bezüglich der 4 Fgfrs in der MHR, wurde dem *Fgfr1* als einzigem Fgfr eine Rolle in der Weiterleitung des musterbildenden Signals von Fgf8 in dieser Region zugewiesen. Der konventionelle Knock-out des *Fgfr1* sagte jedoch aufgrund seiner frühen Letalität nichts über die Funktion des Fgfr1 an der MHG aus, so dass eine sog. konditionale Mausmutante für den *Fgfr1* hergestellt werden müsste, mit derer Hilfe seine Funktion in der MHR untersucht werden könnte.

Die konditionale Mausmutagenese ermöglicht es, die Funktion eines Gens in einer bestimmten Region oder zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung zu erforschen, ohne jedoch andere Entwicklungsprozesse zu beeinflussen (Abb. 8). Dabei wird die Cre Rekombinase, ein Protein des Bakteriophagen P1 benutzt. Die Cre Rekombinase kann bestimmte DNA-Sequenzen, die sog. *loxP* sites, erkennen, die dazwischen gelegene DNA-Sequenz deletieren und die entstandenen Enden miteinander rekombinieren (Übersicht in Nagy 2000). Um ein Gen in einem bestimmten Gewebe auszuschalten, wird die Mauslinie, die das durch *loxP* sites flankierte, zu deletierende Gen oder Genfragment enthält, mit einer „Cre“-Maus, die die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors enthält, gekreuzt. In den Nachkommen dieser Verpaarungen ist die durch *loxP* sites flankierte genomische Sequenz von der Cre Rekombinase aus der DNA herausgeschnitten und zwar lediglich in dem Gewebe, in dem die Cre Rekombinase exprimiert wird.

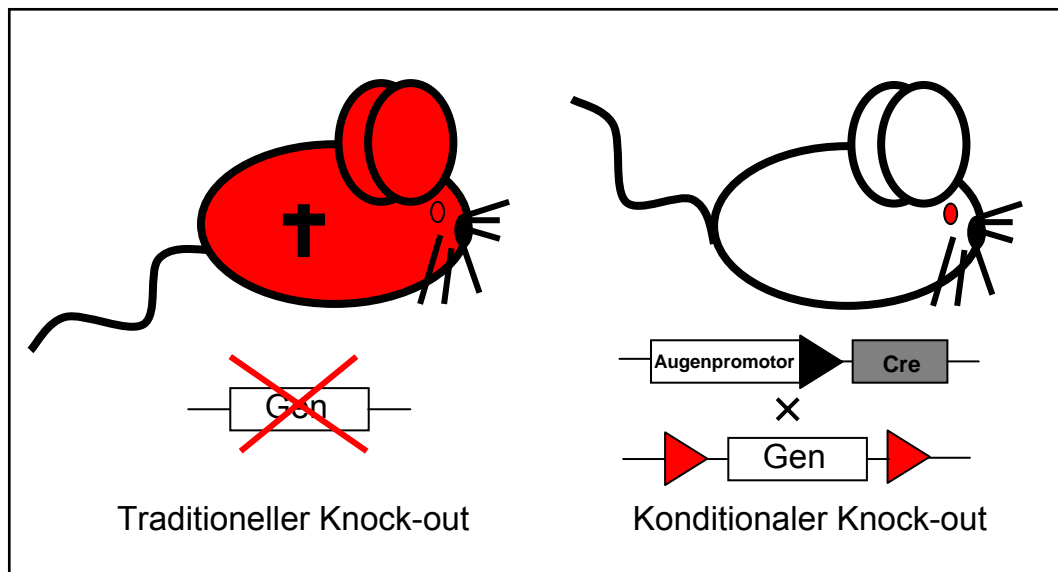


Abb. 8: Prinzip der konditionalen Mausmutagenese. Wird ein Gen, das in der frühen embryonalen Entwicklung der Maus essentiell ist, dessen Funktion man jedoch spezifisch z.B. im Auge untersuchen möchte, durch konventionellen KO im gesamten Gewebe der Maus deletiert, stirbt die Maus früh und man kann die Funktion im Auge nicht untersuchen (links, rote Maus). Wird das Gen jedoch mit Hilfe des Cre-loxP Systems (rote Dreiecke symbolisieren die loxP sites) in dem spezifischen Gewebe deletiert (hier Auge), überlebt die Maus und die Funktion des Gens im Auge kann analysiert werden (rechts, weiße Maus).

Im Zusammenhang mit der Identifizierung des Rezeptors, der für die Fgf8 Signaltransduktion in der MHR wichtig ist, wurde der *Fgfr1* unter Verwendung der *En1^{Cre/+}* Maus (Kimmel et al., 2000) während der Embryogenese in der MHR deletiert (Trokovic et al., 2003). Diese mutante Maus zeigte jedoch lediglich dorsale Defekte in der MHR. So fehlen ihr das auditorische Tektum (inferiore Colliculi) des dorsalen Mittelhirns und das Cerebellum (dorsales Hinterhirn). Ventrale Strukturen, inklusive der dopaminergen Neurone des ventralen Mittelhirns, sind jedoch unverändert.

Interessanterweise steht diese konditionale *Fgfr1* KO Maus im Gegensatz zu der konditionalen *Fgf8* KO Maus, die mit derselben *Cre*-Linie hergestellt wurde. In diesen konditionalen *Fgf8*-KO Mäusen fehlt die gesamte MHR, sowohl dorsal als auch ventral. Dies legt nahe, dass neben dem *Fgfr1* noch andere *Fgfrs* in der ventralen MHR an der Weiterleitung des Fgf8 Signals beteiligt sind. Um deren Funktion in dieser Region zu untersuchen, müssen in Analogie zur konditionalen *Fgfr1* KO Maus, ebenfalls konditionale KO-Mäuse der *Fgfrs* 2 und 3 hergestellt werden.

Die Musterbildung/Regionalisierung in der sich entwickelnden Mittel-/Hinterhirn Region und die Regulation der Neurogenese auf zellulärer Ebene sind eng aneinander geknüpft. Verfrühte Neurogenese, ohne dass sich eine genügend große Anzahl an neuronalen Vorläuferzellen bilden kann, führt zu einer Kollabierung des anterioren Neuralrohrs während der Embryonalentwicklung (Hirata et al., 2004). Daher ist es notwendig um eine korrekte Regionalisierung von Hirnstrukturen zu garantieren, dass neurale Vorläuferzellen zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung des Neuralrohrs proliferieren und damit die „Grundsubstanz“ für das sich entwickelnde Maushirn liefern. Aus diesem Grund ist auch die ab E9.5/E10 in der MHR stattfindende Neurogenese straff reguliert. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit einem neuen bHLH Gen, das an der Neurogenese im Mittelhirn beteiligt ist.

2.2 Neuronale Differenzierung - Neurogenese

Neurogenese wird definiert als die Entstehung eines terminal differenzierten Neurons aus dem Neuroepithel. Die Neurogenese läuft in mehreren Schritten ab. Mit der Induktion der Neuralplatte aus dem Ektoderm beginnt die Determinierung des neuronalen Schicksals. Die neuronalen Vorläuferzellen proliferieren und in einem weiteren Determinationsschritt entwickeln sich aus diesen neuronalen Vorläuferzellen, neuronale Vorläuferzellen bzw. gliale Vorläuferzellen, die anschließend im Falle der neuronalen Vorläuferzellen zu postmitotischen Neuronen ausdifferenzieren. Dabei entstehen unterschiedliche neuronale Zelltypen, je nach der dorso-ventralen (D/V) (Deckplatte, Flügelplatte, Basalplatte, Grundplatte) und anterior-posterioren (A/P) Lokalisation der Vorläuferzellen im Neuralrohr.

2.2.1 Neurogenese und bHLH-Gene

Eine Klasse von Genen ist maßgeblich an der Neurogenese, speziell bei der Determinierung und der Ausdifferenzierung neuronaler Vorläuferzellen zu postmitotischen Neuronen beteiligt. Es handelt sich hierbei um eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die basic helix-loop-helix Gene (bHLH). In dieser Familie

lassen sich zwei funktionell antagonistische Gruppen unterscheiden: die proneuralen bHLH Gene, die die neuronale Determinierung und Differenzierung aktivieren und die neurogenen bHLH Gene, die diese Determination/Differenzierung reprimieren. Ein feines Zusammenspiel von bHLH Aktivatoren und Repressoren garantiert die korrekte Spezifizierung von neuronalen Subpopulationen zur richtigen Zeit, an der richtigen Stelle und in der richtigen Anzahl.

Dabei legen die proneuralen Gene das neuronale Schicksal in den neuralen Vorläuferzellen fest und bringen diese schließlich auch zur terminalen Differenzierung. Die „proneurale Funktion“ der Gene *Mash1*, *Math5* und der Neurogenin (*Ngn*) Gene, alles Mitglieder der bHLH-Genfamilie, wurde in *gain-of-function* (GOF) Experimenten nachgewiesen. Diese Gene können ektopisch im Neuroektoderm neurale Vorläuferzellen zu ausdifferenzierten Neuronen umwandeln (Ma et al., 1996, Farah et al., 2000; Brown et al., 1998, Übersicht in Guillemot 1999 und Bertrand et al., 2002).

Im Gegensatz dazu halten die neurogenen Gene die neuralen Vorläuferzellen in einem proliferativen Zustand und garantieren dadurch, dass die „richtige“ Anzahl der Neurone erhalten wird, was letztendlich auch die richtige „Größe“ der späteren Struktur wie z.B. des Cortex ausmacht. So antagonisiert z.B. *Hes1*, ein neurogenes bHLH Protein, die Aktivität der proneuralen bHLH Faktoren wie *Mash1*, *Math1* und der *Ngns* und reguliert damit die neuronale Determination negativ (Chen et al., 1997, Ishibashi et al., 1995, Tomita et al., 1996a). *Loss-of-function* (LOF) Analysen haben gezeigt, dass der Verlust von *Hes1* die neuronale Differenzierung beschleunigt und zu schwerwiegenden Defekten des Nervensystems führt, da die Vorläuferzellen nicht die vorgesehene Anzahl an Zellteilungen durchlaufen und die ungehemmt wirkenden proneuralen bHLH Gene im gesamten Neuralrohr verfrüht zur Entstehung von Neuronen führen (Ishibashi et al., 1995, Hatakeyama et al., 2004). Die Bezeichnung z.B. der *Hes*-Gene als „neurogen“ stammt ebenfalls von diesen LOF Analysen, da bei deren Fehlen verfrüht Neurogenese auftritt.

Das heute geläufigste Modell in Vertebraten, nach dem die beiden eigentlich entgegengesetzten Funktionen der proneuralen und neurogenen Gene gemeinsam die Neurogenese bestimmen, basiert auf der feinen Regulation ihrer Expression. Proneurale und neurogene Gene werden gemeinsam in neuralen Vorläufern exprimiert. Dabei sind während der Proliferationsphase der Vorläuferzellen die

neurogenen bHLH Gene auf einem höheren Level exprimiert. Der Übergang von der Proliferation zur Differenzierung erfordert in der Vorläuferzelle einen Anstieg der Expression der proneuralen bHLH Gene und gleichzeitig eine Verminderung der Expression der neurogenen bHLH Gene (Ross et al., 2003, Bae et al., 2000 und Referenzen darin) (Abb. 9). Durch die ansteigende Expression der proneuralen bHLH Gene in der Vorläuferzelle wird die Expression des transmembranen Liganden *Delta* angeregt. Delta bindet in den umliegenden Zellen an seinen Rezeptor Notch und nachgeordnet von Notch werden in diesen Zellen die neurogenen Gene angeregt, die das neuronale Schicksal verhindern (Übersicht in Kageyama et al., 1997, Beatus und Lendahl, 1998). Durch diesen Mechanismus, der auch als „laterale Inhibition“ bezeichnet wird, wird eine Vorläuferzelle „ausgewählt“, die zum Neuron differenziert, während die umliegenden Zellen weiter proliferieren und deren Schicksal später determiniert wird.

2.2.2 Duale Funktion der bHLH-Gene

Interessanterweise haben in den letzten Jahren LOF Analysen von proneuralen bHLH Genen gezeigt, dass beim Fehlen eines bestimmten proneuralen bHLH Gens bestimmte neuronale Subpopulationen fehlen. Dies bedeutet, dass die proneuralen Genen nicht nur für die Determinierung und Differenzierung generell zum postmitotischen Neuron zuständig sind, sondern auch die Fähigkeit haben den Subtyp (z.B. GABAerges oder glutamaterges Neuron) einer Neuronenpopulation zu bestimmen (Abb. 9). Eine Vielzahl an proneuralen bHLH Genen konnte mit der Spezifizierung unterschiedlicher neuronaler Subpopulationen in Verbindung gebracht werden, wobei ein Gen auch eine Rolle in mehreren Subpopulationen spielen kann (Übersicht in Bertrand et al., 2002).

Dies impliziert, dass proneurale bHLH Gene mit anderen Proteinen kooperieren, um regionenspezifisch neuronale Subtypen zu generieren. Diese „regional cues“ bestimmen gemeinsam mit dem proneuralen bHLH Gen, welcher neuronale Subtyp sich während der Neurogenese entwickelt. So kann z.B. Mash1 (1) noradrenerge Neurone in sympathetischen Ganglien (Brunet und Ghysen, 1999), (2) serotonerge (5-Hydroxytryptamin (5-HT)) Neurone im ventralen Hinterhirn (Pattyn et al. 2004) und (3) GABAerge Neurone des Cortex induzieren (Fode et al. 2000).

Die Identifizierung der für die korrekte Differenzierung von neuronalen Subpopulationen notwendigen „regional cues“ steht noch am Anfang. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass z.B. für die Differenzierung der GABAergen Neurone des Telencephalons neben Mash1 die Homeoboxproteine Nkx2.1, Dlx1 und Dlx2 benötigt werden (Yun et al., 2002). In anderen Regionen, in denen GABAerge Neurone entstehen, hingegen sind die „regional cues“, die notwendig für die Entstehung dieses Neuronentyps sind, noch völlig unbekannt.

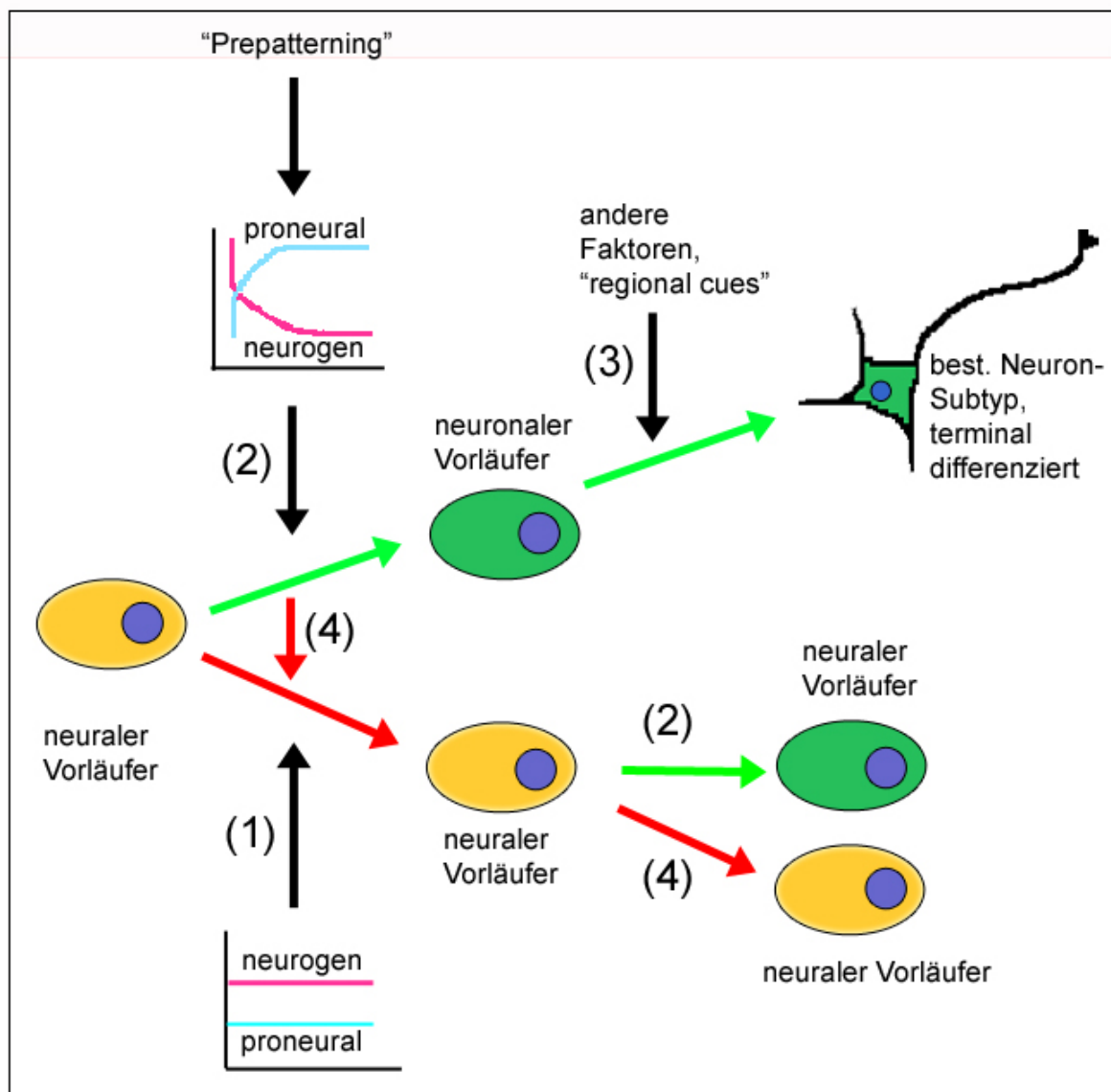


Abb. 9: Ein Modell der Entstehung von neuronalen Subpopulationen im ZNS der Vertebraten. Ein konstant höheres Expressionslevel von neurogenen bHLH Proteinen gegenüber proneuralen bHLH Proteinen hält die neurale Vorläuferzelle in einem proliferativen Zustand (1). Steigt die Konzentration an proneuralen Proteinen in einer

neuronalen Vorläuferzelle an, findet der Übergang zur Differenzierung statt (2). Gemeinsam mit anderen Faktoren, den sog. regional cues bestimmen bHLH Proteine welcher neuronale Subtyp sich entwickelt (3). Durch den Mechanismus der „lateralen Inhibition“ werden in den umliegenden Zellen weiterhin die neurogenen Gene auf einem hohen Level exprimiert, wodurch diese Zellen in einem proliferativen Zustand gehalten werden (4). Aus diesen Vorläufern können sich zu einem späteren Zeitpunkt, gesteuert durch die proneuralen bHLH Gene, erneut Neurone entwickeln oder die neuronalen Vorläuferzellen bleiben durch die laterale Inhibition weiterhin in einem proliferativen Zustand (4).

Wenn auch gezeigt wurde, dass im GABAergen Differenzierungsprozess des Telencephalons das bHLH Gen *Mash1* mit Homeoboxgenen kooperiert, können bHLH Gene auch mit anderen bHLH Genen im Prozess der terminalen Differenzierung kooperieren. Dies beweisen Experimente, in denen gezeigt wurde, dass eine Kombination der Gene von *Ngn2* und *Olig2* zur Bildung von Motoneuronen (Mizuguchi et al., 2001, Novitsch et al., 2001) führt, während jedes der beiden Gene unabhängig voneinander (möglicherweise mit anderen bisher unbekanntem Faktoren) andere Neuronen-Subpopulationen z.B. im Rückenmark (*Ngn2*) bzw. Gliazellen (*Olig2*) generiert (Sun et al., 2001, Zhou et al., 2001; Zhou und Anderson, 2002).

Die gemeinsame Aktion der bHLH Gene könnte auf eine direkte Interaktion auf Proteinebene zurückzuführen sein. Tatsächlich heterodimerisieren proneurale bHLH Proteine mit den ubiquitär vorkommenden bHLH Proteinen wie z.B. E47, wodurch sie Transkription aktivieren können. Auch die neurogenen bHLH Proteine, wie z.B. Hes1, bilden Heterodimere, sowohl untereinander (Bae et al., 2000) als auch mit proneuralen bHLH Genen, wodurch sie deren Funktion, meist durch Rekrutierung von Ko-Repressoren antagonisieren (Chen et al., 1997, Alifragis et al., 1997).

Neben der Heterodimerbildung kommt es auch zu Homodimerbildungen. Es konnte z.B. für das bHLH Protein dHand gezeigt werden, dass es als Homodimer an DNA bindet und dadurch Transkription aktivieren kann (Firulli et al., 2000). Das neurogene Hes1 agiert ebenfalls als Homodimer (Übersicht in Davis und Turner, 2001).

2.2.3 Struktur von bHLH Proteinen

Das strukturelle Motiv, das in allen bHLH Proteinen konserviert ist, ist die namensgebende bHLH Domäne. Diese besteht aus einer Abfolge basischer

Aminosäuren („basic“ region), und zwei α -Helices, die durch eine „Loop“ miteinander verbunden sind („helix-loop-helix“) (Abb. 10A). Die basische Region, die in jeder der unterschiedlichen Subfamilien der bHLH-Proteine eine andere hoch-konservierte Aminosäure enthält, ist für die Bindung an DNA verantwortlich (Abb. 3A). Als Homo- bzw. Heterodimere binden sie an sog. E-boxen (CANNTG), oder N-boxen (CACNAG) in der DNA. Die Helix-Region ist für die spezifischen Funktionen der bHLH Proteine verantwortlich, indem Protein-Protein Interaktionen mit anderen bHLH Proteinen über diese Region vermittelt werden (Übersicht in Bertrand et al., 2002). Es konnte kürzlich auch gezeigt werden, dass unterschiedliche Regionen der HLH Domäne für die duale Funktion der bHLH Proteine, neuronale Vorläuferzellen zu determinieren und in einem weiteren Schritt auch zur terminalen Differenzierung zu bringen, zuständig sind. Während die erste Helix im HLH-Motiv der Proteine für die proneurale Funktion notwendig ist, ist die zweite Helix notwendig für die Spezifizierung von Subpopulationen (Nakada et al., 2003).

bHLH Proteine sind aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften und ihrer präferentiellen Bindung an bestimmte DNA-Motive, in mehrere Gruppen eingeordnet worden (Atchley und Fitch, 1997). Eine besondere Klasse der bHLH Gene, die sog. bHLH-O Gene, die eine sog. „Orange-Domäne“ enthalten, wird nochmals in 4 Subfamilien eingeteilt (Abb. 3B). Obwohl die Funktion der Orange-Domäne noch unbekannt ist, wird angenommen, dass sie die Subfamilien-Spezifität vermittelt und außerdem wichtig für die Dimerisierungsfähigkeit der bHLH-O Proteine ist (Dawson et al., 1995, Davis und Turner, 2001).

2.2.4 *Megane, ein neuer bHLH-O Transkriptionsfaktor*

Megane (*Mgn*) ist ein neues bHLH Gen, das am Institut für Entwicklungsgenetik des GSF Forschungszentrums von Dr. Jordi Guimera durch die Benutzung degenerierter Primer für die bHLH Domäne aus cDNA aus embryonalem (E9) ventralen Mittelhirn kloniert wurde. *Mgn* besitzt vier Exons, die einen genomischen Abschnitt von 2 kb umspannen, wobei das zweite und dritte Exon für die bHLH Domäne kodieren. Das *Mgn* Transkript ist 722 bp lang und stellt ein Protein aus 251 Aminosäuren dar (etwa 29 kDa). *Mgn* zeigt zwischen 56-63% Homologie zu den Hairy und E(Spl) bHLH Proteinen. Es besitzt eine Orange-Domäne, die es der Klasse der bHLH-O Proteine

zuordnet. Im Gegensatz zu den Hairy, E(Spl) und Stra13 Familien der bHLH-O Proteine, die einen Prolin-Rest in der basischen Region besitzen, fehlt diese Aminosäure im Mgn Protein. Stattdessen besitzt Mgn einen Lysin-Rest an dieser Position. Außerdem weist Mgn kein WPRW Groucho/TLE Bindemotiv für Ko-Repressoren (Fisher et al., 1996) am C-terminus auf. Anhand dieser Strukturmerkmale, die es von den anderen Subfamilien der bHLH-O Gene unterscheidet, stellt Mgn das erste Mitglied einer neuen Subfamilie der bHLH-O Proteine dar (Abb. 10B). Die Familie der bHLH-O Proteine umfasst sowohl bHLH Proteine mit neurogener als auch mit proneuraler Funktion.

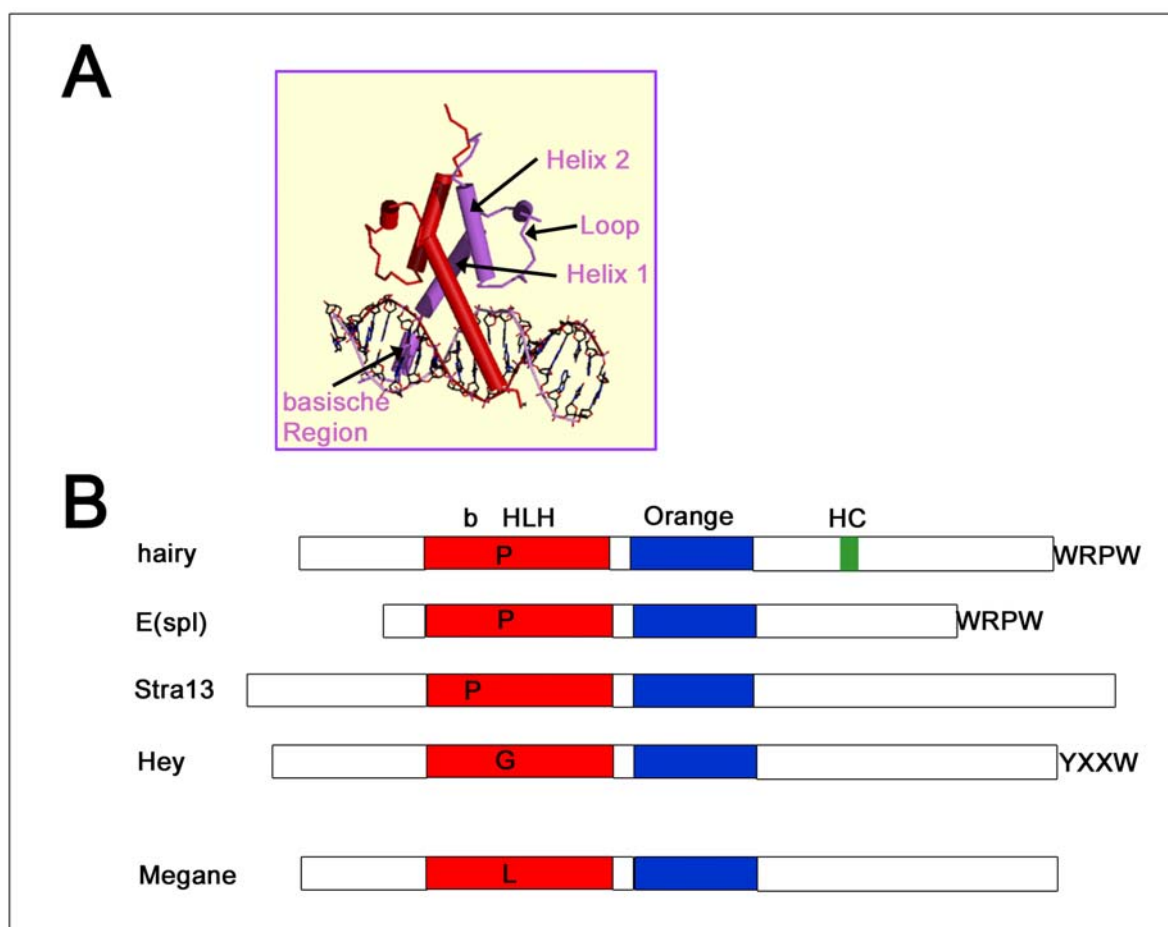


Abb. 10: Die bHLH Domäne der bHLH Transkriptionsfaktoren (A). Die Subfamilien der bHLH-O Proteine (B). (A) Die Abbildung stellt ein Heterodimer zweier bHLH Proteine dar. Die basische Region der bHLH Gene ist für die Bindung an DNA wichtig. Die beiden α -Helices sind durch eine „Loop“-Region (HLH) miteinander verbunden und vermitteln Protein-Protein Interaktionen. (B) Aufgrund von Strukturmerkmalen werden die bHLH-O Protein in vier Subfamilien eingeteilt: Die Hairy-Proteine sind gekennzeichnet durch ein konserviertes Prolin in der basischen Region der bHLH Domäne (rot), sie besitzen eine kurze Sequenz

zwischen der Orange-Domäne und dem C-terminus, die sog. HC-Domäne und außerdem eine WRPW-Domäne, die ein Bindemotiv für Ko-Repressoren darstellt. Die E(Spl) Proteine, zu denen auch die Hes Proteine gehören sind strukturell mit den Hairy-Proteinen nahe verwandt, jedoch fehlt ihnen die HC-Domäne. Die Stra13 Proteine besitzen ebenfalls ein konserviertes Prolin (an einer anderen Stelle als die Hairy und Stra13 Proteine), jedoch keine HC-Domäne und kein Bindemotiv für Ko-Repressoren. Die Hey-Proteine enthalten ein konserviertes Glycin in der bHLH-Domäne und ein C-terminales YXXW Ko-Repressor-Bindemotiv. Mgn besitzt anstelle des Glycins (Hey Proteine) oder des Prolins (E(Spl), Hairy), ein Lysin innerhalb der basischen Region und besitzt außerdem keine HC-Domäne und kein Bindemotiv für Ko-Repressoren.

Während der Entstehung dieser Arbeit wurde die Beschreibung von *Mgn* von zwei Gruppen publiziert (Miyoshi et al., 2004, Nakatani et al., 2004). Von Miyoshi et al. wurde es als sehr nah mit den *Hes* Genen verwandt identifiziert und daher *Heslike* genannt. Von Nakatani et al. wurde es jedoch in die Subfamilie der Hey-bHLH Proteine eingeordnet und *Helt* genannt (Hey-like transcriptional repressor). Es konnte in dieser Publikation gezeigt werden, dass *Mgn* Homodimere und Heterodimere mit den neurogenen bHLH Proteinen Hes5 und Hey2 bildet. In derselben Publikation wurde außerdem gezeigt, dass *Mgn* als transkriptioneller Repressor wirken kann (Nakatani et al., 2004). Die Gruppe um Kageyama konnte außerdem zeigen, dass ektopisch exprimiertes *Mgn* (*Heslike*) in *Mash1* positivem Gewebe GABAerge Neurone induzieren kann (Miyoshi et al., 2004). Zusätzlich wurde in dieser Publikation gezeigt, dass GABAerge Neurone im Mittelhirn und caudalen Diencephalon von *Mash1* KO Mäusen bei E11.5 gänzlich fehlen, während die *Mgn* (*Heslike*) Expression hochreguliert ist. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass *Mgn* (*Heslike*) und *Mash1* gemeinsam für die Entstehung von GABAergen Neuronen in diesen Regionen zuständig sind (Miyoshi et al., 2004). Ob jedoch *Mgn* für die Entstehung GABAerger Neurone notwendig ist, und ob für diese Funktion zusätzlich *Mash1* benötigt wird, ist aus diesen publizierten Daten nicht abzuleiten.

Zu Beginn dieser Arbeit war jedoch noch nichts über die Funktion von *Mgn* bekannt. Daher sollte nach Interaktionspartnern dieses Proteins gesucht werden, um *Mgn* eine mögliche Funktion im Mittelhirn zuzuordnen.

3 Zielsetzungen der Doktorarbeit

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei verschiedene Fragestellungen bezüglich der Entwicklung der Mittel-/Hinterhirnregion untersucht.

1. Es sollte der Fgf Rezeptor identifiziert werden, der die Musterbildungsfunktion von Fgf8 im ventralen Mittelhirn und ventralen anterioren Hinterhirn transduziert. Hierfür sollte zuerst eine detaillierte Expressionsstudie der Fgf Rezeptoren 1-4 in der MHR des Maus-Embryos durchgeführt werden, um den oder die Fgf Rezeptoren zu identifizieren, der/die potentielle Kandidaten für die Fgf Signal-Weiterleitung an der ventralen MHG darstellen. Diese(r) Rezeptor(en) sollten dann mit Hilfe der konditionalen Maus Mutagenese in der MHR ausgeschaltet werden. Die mutante Maus sollte in Bezug auf die Vermittlung der Musterbildungsfunktion von Fgf8 in der MHR als auch auf Veränderungen der zellulären Integrität und neuronaler Subpopulationen in der Embryonalentwicklung untersucht werden.

2. Es sollte untersucht werden, ob das neu identifizierte bHLH Gen Megane, (*Mgn*), das in der frühen Embryogenese spezifisch im Mittelhirn exprimiert wird, in der Lage ist, auf Proteinebene Homo- und Heterodimere zu bilden. Interaktionspartner von *Mgn* sollten identifiziert werden, um über diese möglicherweise Rückschlüsse auf eine Beteiligung von *Mgn* an neuronaler Spezifizierung zu erhalten. Hierfür sollte einerseits ein unvoreingenommener Hefe Zwei-Hybrid Screen mit einer cDNA Bibliothek aus embryonalem Hirngewebe durchgeführt werden, und andererseits, da gezeigt wurde, dass proneurale bHLH Gene untereinander interagieren, sollte gezielt überprüft werden ob *Mgn* Heterodimere mit den proneuralen Proteinen Mash1, Ngn1, 2 und 3 bilden kann.

4 Ergebnisse

4.1 Funktion des Fgf Rezeptors 2 in der Mittel-/Hinterhirn Region

Das sezernierte Molekül Fgf8 spielt als ein Schlüsselgen des Mittel-/Hinterhirn Organisators (MHO) eine wichtige Rolle in der Musterbildung der frühen Mittel-/Hinterhirn Region (MHR). *Loss of function* (LOF) und *gain of function* (GOF) Experimente haben gezeigt, dass Fgf8b fähig ist, einige der an der Mittel-/Hinterhirngrenze (MHG) exprimierten Gene ektopisch zu induzieren und deren Expression aufrechtzuerhalten. Fehlt *Fgf8* in der MHR entwickelt sich kein Mittelhirn und kein anteriores Hinterhirn. Auch andere Mitglieder der Fgf Familie sind an der MHG exprimiert: *Fgf15*, *Fgf17* und *Fgf18*. Diese besitzen jedoch keine Musterbildungsfunktion an der MHG, sind aber vermutlich an der Proliferation in dieser Region beteiligt.

Fgfs vermitteln ihre Funktionen über die Fgfrs (Fgfrs). Es sind 4 Fgfrs bekannt, die eine sehr hohe Homologie zueinander haben.

Zwar war die Expression der vier *Fgfr* Gene im embryonalen Maushirn bekannt, jedoch größtenteils durch sog. „whole mount“ (Ganzkörper) Färbungen an Embryonen (Ishibashi und McMahon, 2002; Liu et al., 2003; Trokovic et al., 2003). In diesen Studien ist gezeigt worden, dass der *Fgfr1* im gesamten Neuroepithel exprimiert wird, während die *Fgfr2* und *Fgfr3* Expression Lücken an der MHG aufweist. *Fgfr4* Expression wurde in der MHR nicht festgestellt. Basierend auf diesen Expressionsstudien wurde dem *Fgfr1* als einzigem der drei in der Region vorkommenden Fgfrs die Fähigkeit zugesprochen, das Fgf Signal am MHO weiterzuleiten. Erstaunlicherweise gleicht der konditionale Knock-out (KO) des *Fgfr1* in der MHR (Trokovic et al., 2003) jedoch nur dorsal dem konditionalen *Fgf8* KO in der gleichen Region (Chi et al., 2003), ventrale Zellpopulationen sind in den konditionalen *Fgfr1* KO Mäusen nicht betroffen. Wäre der *Fgfr1* tatsächlich der einzige Fgfr, der das Fgf8 Signal vermittelt, sollten sich die Phänotypen beider konditionaler KO's entsprechen. Da dies nicht der Fall ist, muss ein anderer oder andere Fgfrs an der Weiterleitung des Fgf8 Signals an der MHG zusätzlich beteiligt sein. Daher wurde die Expression aller *Fgfrs* in der MHR nochmals detailliert

überprüft, um somit den Fgfr zu identifizieren, der das Fgf8 Signal an der MHG ventral transduziert.

4.1.1 Expressionsstudie der Fgfrs im Hinblick auf die Mittel-/Hinterhirngrenze

Für diese Analyse wurden 5 embryonale Entwicklungsstadien gewählt: E8.5, E9.5, E10.5, E11.5 und E12.5. In diesen Entwicklungsstadien wird der MHO initiiert, etabliert und beeinflusst die Entwicklung angrenzender Gewebe. Um die Expression der *Fgfrs* morphologisch dem Mittel- und Hinterhirn zuordnen zu können, wurde *En1* als Marker für die MHR gewählt. *En1* Expression markiert bei E8/E8.5 das gesamte Mittelhirn und das anteriore Hinterhirn (Rhombomer 1 (r1)), zieht sich aber ab diesem Stadium immer weiter ins caudale Mittelhirn und den anterioren Teil von Rhombomer 1 zurück (Sgaier et al., 2005). Um die räumliche Korrelation der *Fgfr* Expression zu der *Fgf8* Expression zu erkennen, wurde *Fgf8* selbst als Marker gewählt. *Fgf8* wird bei E8/E8.5 im vorderen Hinterhirn exprimiert. Die *Fgf8* Expressionsdomäne umfasst zu diesem Zeitpunkt fast das gesamte Rhombomer 1 (r1). Ab E9.5 wird *Fgf8* als schmaler transversaler Ring im anterioren Teil von r1 exprimiert.

Als Methode wurde die sehr sensitive radioaktive *in-situ* Hybridisierung (ISH) gewählt. Es wurden sagittale, coronale und horizontale 5-8 µm dicke Schnitte verwendet, um auch schwächste und sehr kleine Expressionsdomänen erkennen zu können.

4.1.1.1 Expression des *Fgfr1* in der MHR der sich entwickelnden Maus

Der *Fgfr1* wird bei E8.5 im gesamten Neuroepithel der Maus exprimiert. Seine Expression überlappt sowohl mit der *Fgf8* als auch mit der *En1* Expression. Die Intensität im Neuroepithel ist schwächer, verglichen mit den Signalen im Mesenchym. Von E9.5 bis E12.5 ist der *Fgfr1* ebenfalls ubiquitär im anterioren Neuralrohr exprimiert (Abb. 11 und Abb. 15).

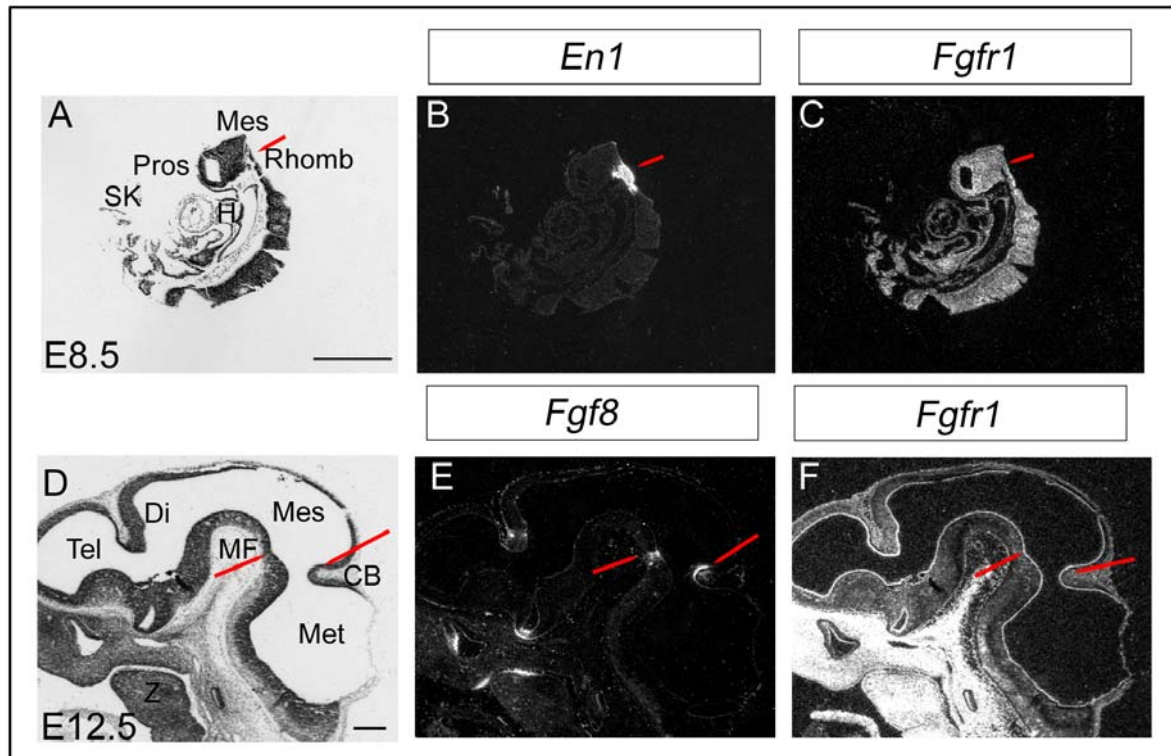


Abb. 11: Expression des *Fgfr1* in der MHR des Mausembryos. (A,B,C) Konsekutive medio-sagittalschnitte eines wildtypischen Mausembryos bei E8.5. (D,E,F) Konsekutive medio-sagittalschnitte eines wildtypischen embryonalen Maushirns bei E12.5. Radioaktive *ISH* mit der *En1* Probe (B), *Fgf8* Probe (E) und *Fgfr1* Probe (C,F). (A) und (D) sind Hellfeldaufnahmen zu (B) bzw. (E). Neben der starken mesenchymalen Expression des *Fgfr1*, ist *Fgfr1* Expression in beiden Entwicklungsstadien im gesamten Neuroepithel festzustellen (C,F). Die Expression überlappt sowohl mit der von *En1* (B) als auch mit der *Fgf8* Expression (E). Rote Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. CB: cerebellare Anlage, Di: Diencephalon, H: Herz, Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, MF: mesencephale Flexur; Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, SK: Schwanzknospe, Tel: Telencephalon, Z: Zunge. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

4.1.1.2 Expression des *Fgfr2* in der MHR der sich entwickelnden Maus

Im Gegensatz zu den bisher in der Literatur gezeigten Expressionsdaten, in denen die Expression des *Fgfr2* eine breite Lücke an der MHG aufweist, die in der A/P Achse etwa vom mittleren Teil des Mittelhirns bis weit hinter Rhombomer 1 reicht, konnten wir zeigen dass die *Fgfr2* Expression bereits bei E8.5 im gesamten Mittelhirn zu finden ist, und somit direkt an die *Fgf8* Expressionsdomäne an der MHG angrenzt.

Dieses Expressionsmuster bleibt im ventralen Mittelhirn bis E12.5 bestehen. Im Hinterhirn findet sich eine Lücke zwischen der *Fgfr2* Expression, die caudal zu r1 detektiert wird, und der *Fgf8* und *En1* Expression (beide Marker sind bei E8.5 in r1 exprimiert) (Abb. 12).

Einen Tag später (bei E9.5) reicht die *Fgfr2* Expression ebenfalls im ventralen Hinterhirn an die *Fgf8* Expression heran. Die *Fgf8* Expressionsdomäne verschmälert sich in r1 von E8.5 bis E12.5 zu einem transversalen Ring, der im anteriorsten Teil von r1 liegt. Die *Fgfr2* Expression folgt der *Fgf8* Expression Richtung MHG, so dass sie immer an die *Fgf8* Expression angrenzt. Bei ist E9.5 eine dorsale Lücke in der *Fgfr2* Expression zu erkennen, die vom anterioren Mittelhirn bis einschließlich r1 reicht (Abb. 12 J). Diese Lücke umfasst in der D/V Achse zunächst die Deck- und Flügelplatte des Neuralrohres, schließt sich jedoch fast gänzlich in ihrer D/V Ausweitung bis E12.5. Gleichzeitig wird auch die A/P Ausweitung verkleinert, so dass bei E12.5 lediglich ein kleiner Bereich der Deckplatte an der MHG frei von *Fgfr2* Expression ist (Abb. 15).

Besonders auffallend ist die durchgehende *Fgfr2* Expression ab E9.5 bis E12.5 in der Grundplatte des Mittelhirns und Hinterhirns. An der Stelle, an der *Fgf8* als transversaler Ring in r1 exprimiert wird, weist die *Fgf8* Expression ventral in der Grundplatte eine Lücke auf (Crossley und Martin, 1995). In dieser Lücke findet sich die *Fgfr2* Expression. Bei E9.5 ist die *Fgfr2* Expression zunächst sehr schwach und auf die Ventrikulärzone (VZ) des Neuralrohres beschränkt (Abb. 13). Ab E11.5 findet sich diese sehr spezifische Expression sowohl in der Ventrikulärzone als auch in der Mantelzone (MZ) des Neuralrohrs (Abb. 12 S und 15).

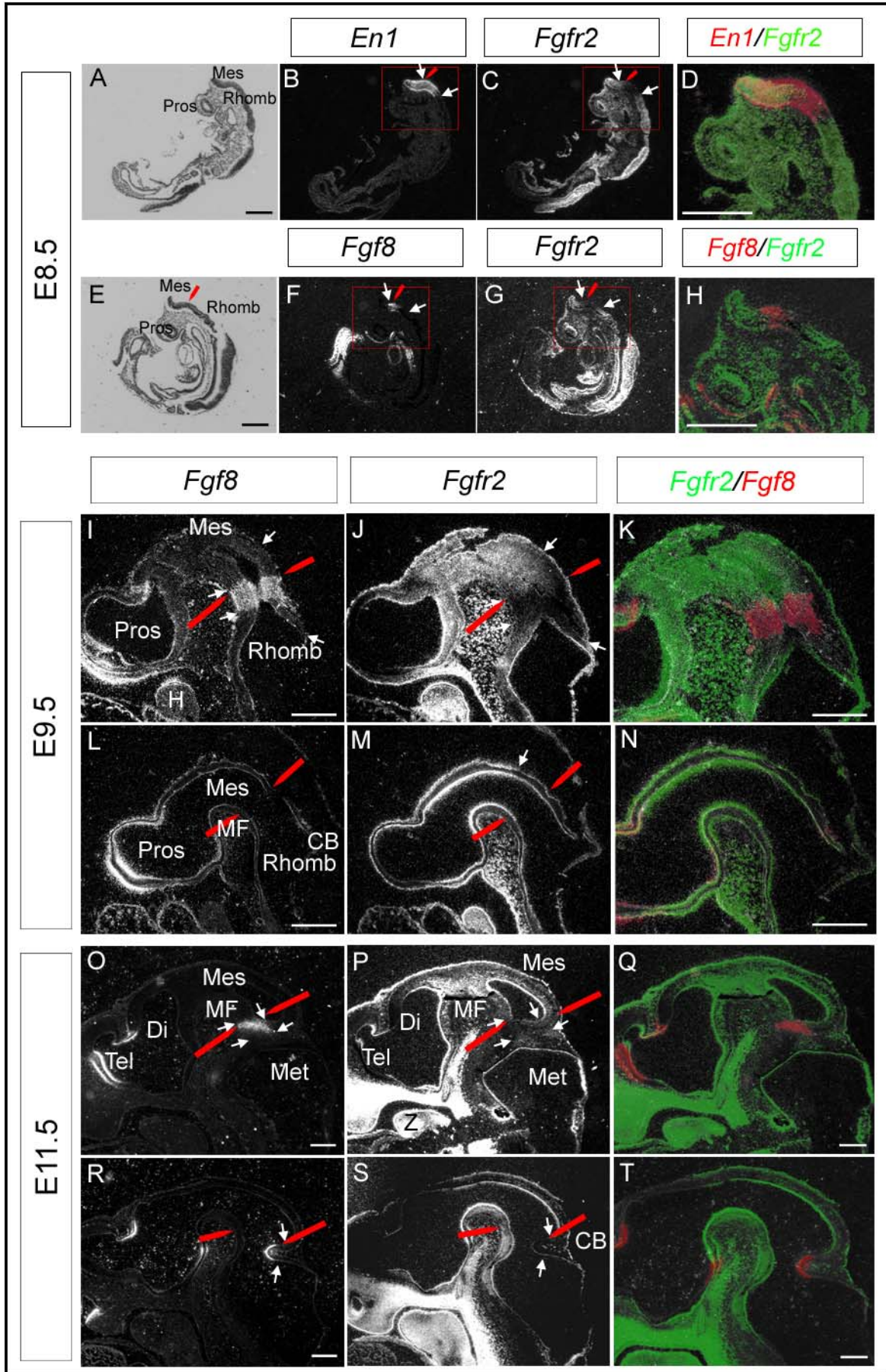


Abb. 12: Expression des *Fgfr2* in der MHR des Mausembryos. Eine radioaktive *ISH* wurde mit Proben gegen *Fgfr2* (C,G), *En1* (B) und *Fgf8* (F) an konsekutiven, sagittalen Schnitten von wildtypischen E8.5 Mausembryonen durchgeführt. (A) und (E) stellen die Hellfeldaufnahmen zu (B) bzw. (F) dar. In (D) und (H) ist eine Falschfarben-Überlagerung des rot markierten Ausschnittes in (B) und (C) bzw. (F) und (G) dargestellt. Dabei ist die *Fgfr2* Expression grün und die *Fgf8* bzw. *En1* Expression rot dargestellt. Die *Fgfr2* Expression ist bei E8.5 im Mittelhirn angrenzend an die MHG und damit an die *Fgf8* Expression zu erkennen (H). Im Hinterhirn ist eine Lücke zur *Fgf8* und *En1* Expression erkennbar (D,H). Weiße Pfeile in B,C,F,G stellen die Grenzen der *Fgfr2* Expression dar. Rote Pfeile markieren die MHG. (I-N) zeigen die Expression von *Fgfr2* (J,M) und *Fgf8* (I,L) an konsekutiven Schnitten im embryonalen Maushirn bei E9.5. (I,J,K) sind laterale Schnitte durch das E9.5 Maushirn. (L,M,N) sind medio-sagittale Schnitte durch das E9.5 Maushirn. (K) und (N) stellen Falschfarben-Überlagerungen der Expressionsdomänen in (I) und (J) bzw. (L) und (M) dar. Dabei ist die *Fgfr2* Expression grün und die *Fgf8* bzw. *En1* Expression rot dargestellt. Bei E9.5 grenzt die ventrale *Fgfr2* Expression auch im Hinterhirn an die *Fgf8* Expression an (K). Eine dorsale Lücke, die vom anterioren Mittelhirn bis r1 reicht, ist zu erkennen. *Fgfr2* Expression in der Grundplatte ist durchgehend (N). Weiße Pfeile in (I,J,L,M) markieren dorsale und ventrale Expressionsgrenzen des *Fgfr2*. Die roten Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. (O-T) zeigen die Expression von *Fgfr2* (P,S) und *Fgf8* (O,R) an konsekutiven Schnitten im embryonalen Gehirn bei E11.5. (O,P,Q) sind laterale Schnitte durch das E11.5 Maushirn. (R,S,T) sind medio-sagittale Schnitte durch das E11.5 Maushirn. (Q) und (T) stellen Falschfarben-Überlagerungen der Expressionsdomänen in (O) und (P) bzw. (R) und (S) dar. Dabei ist die *Fgfr2* Expression grün und die *Fgf8* bzw. *En1* Expression rot dargestellt. Die dorsale Lücke in der *Fgfr2* Expression hat sich in der D/V Achse verengt (T). In der Mittellinie ist der *Fgfr2* durchgehend exprimiert (T). Weiße Pfeile in (O,P,R,S) markieren dorsale bzw. ventrale Expressionsgrenzen des *Fgfr2*. Die roten Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. CB: cerebellare Anlage, Di: Diencephalon, H: Herz, Tel: Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, MF: mesencephale Flexur, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, SK: Schwanzknospe, Telencephalon, Z: Zunge. Der Maßstab beträgt 500 µm.

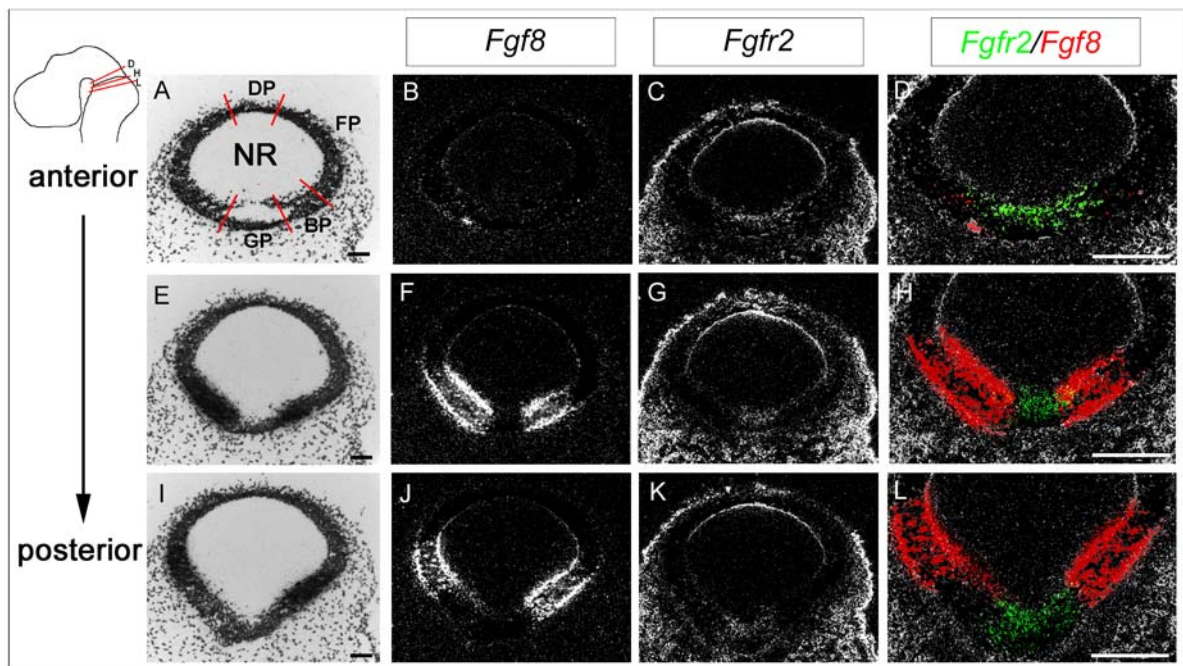


Abb. 13: *Fgfr2* Expression in der Grundplatte an der MHG. Eine Radioaktive *ISH* wurde mit Proben gegen den *Fgfr2* (C,G,K) und *Fgf8* (B,F,J) an konsekutiven, coronalen Schnitten eines E9.5 Embryos durchgeführt. Die obere Reihe repräsentiert die Ebene des posterioren Mittelhirns, die mittlere Reihe ist auf der Ebene der MHG aufgenommen und die untere Reihe entspricht dem anterioren Hinterhirn (im Embryo von anterior nach posterior). (D,H,L) Falschfarben-Überlagerungen von *Fgfr2* (grün) und *Fgf8* (rot) wurden von konsekutiven Schnitten zur besseren Darstellung der Expressionsdomänen angefertigt. (A,E,I) Hellfeld Aufnahmen der Schnitte in (B) bzw. (F) bzw. (J). BP: Basalplatte, DP: Deckplatte, FP: Flügelplatte, GP: Bodenplatte, NR: Neuralrohr. Der Maßstab beträgt 250 μ m.

4.1.1.3 Expression des *Fgfr3* in der MHR der sich entwickelnden Maus

Der *Fgfr3* ist bei E8.5 direkt angrenzend an die *Fgf8* und *En1* Expression im ventralen Hinterhirn exprimiert, während er im Mittelhirn zunächst nicht exprimiert wird. Bei E9.5 ist eine große dorsale Lücke in der Expression, die das Gebiet zwischen dem anterioren Mittelhirn bis r7 des Hinterhirns frei von *Fgfr3* Expression lässt, zu beobachten. Ventral ist der *Fgfr3* zu diesem Zeitpunkt nun auch im anterioren Mittelhirn exprimiert. Bei E9.5 verbreitert sich die *Fgfr3* Expressionsdomäne im Mittelhirn und weitet sich in der A/P Achse von anterior nach posterior Richtung MHG aus (Abb. 15). Dabei folgt die *Fgfr3* Expression der sich in der A/P Achse verschmälernden *En1* Expression eng nach. Auch im Hinterhirn

grenzt die *Fgfr3* Expression an die *En1* Expressionsdomäne an. Während sich bei E10.5 ein leichter Überlapp der beiden Expressionsdomänen feststellen lässt (Abb. 14 I-K), schließen sich bei E12.5 die Expression des *Fgfr3* (VZ) und von *En1* (MZ) im Mittel- als auch im Hinterhirn aus (Abb. 14 N-P).

Bei E12.5 ist lediglich der caudale Teil des Mittelhirns frei von *Fgfr3* Expression. Im Mittelhirn bleibt zwischen der *Fgfr3* Expression und der MHG eine kleine Lücke frei, die mehrere Zelldurchmesser umfasst. Im Hinterhirn überlappt bemerkenswerterweise in diesem Stadium die *Fgfr3* Expression mit der *Fgf8* Expression (Abb. 14 R). Die dorsale Expressions-Lücke verengt sich bis E12.5 in der dorso-ventralen Achse, wobei ihre A/P-Ausdehnung gleich bleibt. Dabei weitet sich die *Fgfr3* Expression von der Basalplatte (E9.5) in die Flügelplatte (E11.5) aus (Daten nicht gezeigt, Abb. 15).

Fgfr4 Expression konnte in der MHR nicht detektiert werden.

Diese Expressionsstudie ist kürzlich veröffentlicht worden (Blak et al., 2005).

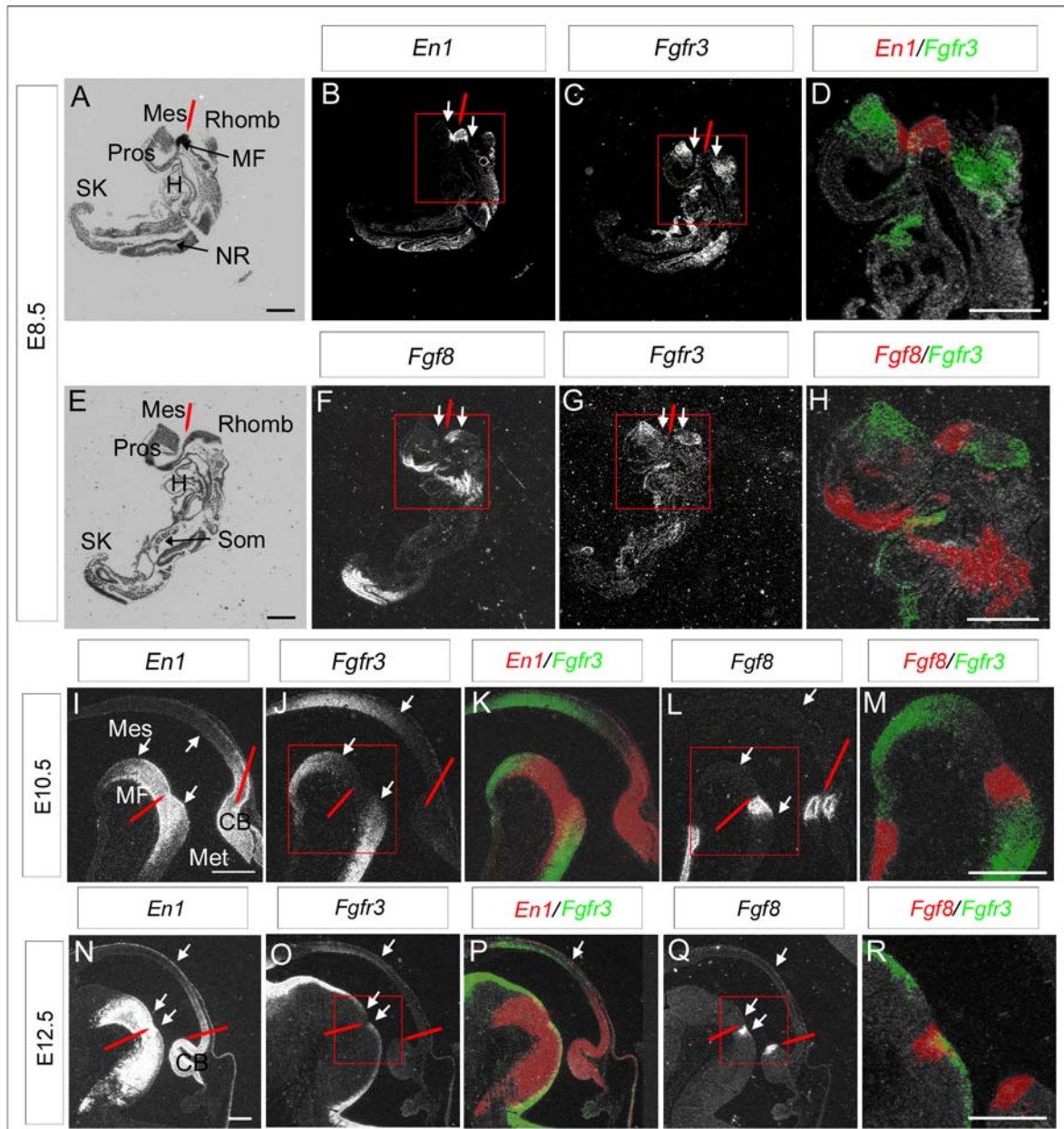


Abb. 14: Expression des *Fgfr3* in der MHR des Mausembryos. Eine radioaktive *ISH* wurde mit Proben gegen *Fgfr3* (C,G,J,O), *En1* (B,I,N) und *Fgf8* (F,L,Q) an konsekutiven, sagittalen Schnitten bei E8.5 (A-H), E10.5 (I-M) und E12.5 (N-R) durchgeführt. (A,E) Hellfeld Aufnahmen der Schnitte in (B) und (F). (D,H,K,M,P,R) Falschfarben-Überlagerungen von *Fgfr3* (grün) mit *En1* bzw. *Fgf8* (rot). Einsätze in B,C,F,G,J,L,O,Q zeigen den Ausschnitt in D,H,M,R. Bei E8.5 ist der *Fgfr3* nicht im Mittelhirn exprimiert. Im Hinterhirn grenzt der *Fgfr3* an *En1* und *Fgf8* an (D,H). Bei E10.5 hat sich die *Fgfr3* Expression ins Mittelhirn ausgeweitet und überlappt teilweise mit der *En1* Expression, die sich zu diesem Zeitpunkt in der A/P Ausweitung bereits verengt hat (K). Dorsal findet sich eine Lücke in der *Fgfr3* Expression in der MHR (K). Im ventralen Hinterhirn ist die *Fgfr3* Expression an die *Fgf8* Expression

angrenzend (**M**). Bei E12.5 ist der starke gegenseitige Ausschluss von *Fgfr3* Expression und *En1* Expression zu erkennen (**P**). Die *Fgfr3* Expression reicht im Mittelhirn nicht an die MHG heran (**R**) und überlappt im ventralen Hinterhirn sogar mit der *Fgf8* Expression (**R**). Weiße Pfeile in B,C,F,G,I,J,L,N,O,P,Q markieren dorsale bzw. ventrale Expressionsgrenzen des *Fgfr3*. Die roten Pfeile markieren die MHG ventral und dorsal. CB: cerebellare Anlage, Di: Diencephalon, H: Herz, Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, MF: mesencephale Flexur, NR: Neuralrohr, Pros: Prosencephalon, SK: Schwanzknospe, Som: Somiten, Tel: Telencephalon. Der Maßstab beträgt 500 μm .

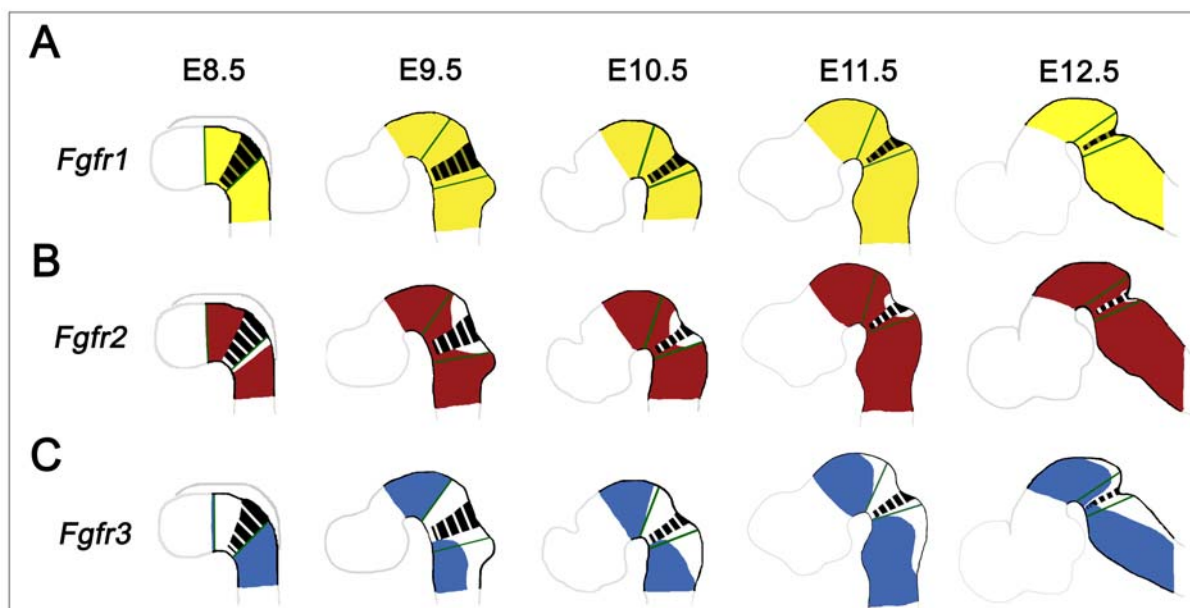


Abb. 15: Zusammenfassung der Expression des *Fgfr1*, 2 und 3 in der sich entwickelnden embryonalen MHR der Stadien E8.5 bis E12.5. (A) Expression des *Fgfr1* (gelb). **(B)** Expression des *Fgfr2* (rot). **(C)** Expression des *Fgfr3* (blau). Die Expressionsdomänen sind innerhalb der mit schwarzen Konturen markierten Bereichen eingezeichnet. Die Expression im Telencephalon und Diencephalon (graue Konturen) waren nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. **(A)** Der *Fgfr1* wird ubiquitär im Neuroepithel exprimiert und überlappt zu jedem Zeitpunkt mit der Expression von *Fgf8* (schwarze Fläche gelb durchbrochen) und *En1* (Bereich zwischen den grünen Linien). **(B)** Die *Fgfr2* Expression ist bei E8.5 im Mittelhirn an *Fgf8* angrenzend, weist im anterioren Hinterhirn jedoch eine Lücke auf. Bei E9.5 ist die *Fgfr2* Expression an die *Fgf8* Expression ventral an der MHG beiderseits angrenzend, dorsal findet sich eine Lücke in der Flügel- und Deckplatte, die sich in späteren Stadien nach dorsal hin verengt. Der *Fgfr2* ist ab E11.5 in der Flügelplatte der MHR zu finden, spart jedoch die Deckplatte aus. Der *Fgfr2* ist in der Grundplatte der MHR durchgehend exprimiert. **(C)** Die Expression des *Fgfr3* spart bei E8.5

das Mittelhirn aus, ist im anterioren Hinterhirn jedoch an die *Fgf8* und *En1* Expression angrenzend. Von E9.5 bis E12.5 weitet sich die *Fgfr3* Expression ins Mittelhirn aus. Sowohl im Mittel- als auch im Hinterhirn überlappt die *Fgfr3* Expression lediglich schwach mit der *En1* Expression. Dorsal ist eine Lücke in der MHR zu erkennen (Flügel- und Deckplatte). Diese Lücke ändert sich bis E12.5 in ihrem dorso-/ventralen Ausmaß, d.h. sie verengt sich von ventral nach dorsal, während sie in ihrer antero-/posterioren Ausweitung gleich bleibt. Im ventralen Hinterhirn grenzt die *Fgfr3* Expression ab E8.5 zunächst an die *Fgf8* Expression an und überlappt bei E12.5 mit *Fgf8*.

4.1.2 Inaktivierung des *Fgfr2* in der *En1* Domäne des Mittel- und Hinterhirns

Aufgrund der von mir durchgeführten Expressionsstudie stellen der *Fgfr1* und der *Fgfr2* gute Kandidaten für die Weiterleitung des *Fgf8* Signals am MHO dar.

Der *Fgfr1* wurde bereits von Trokovic et al. (Trokovic et al., 2003) mittels konditionaler Mausmutagenese durch Verwendung der *En1^{Cre/+}* Maus in der MHR ausgeknockt. Diese Mäuse zeigen einen dorsalen Musterbildungs-Phänotyp. Ventrale Strukturen hingegen sind in diesen Mäusen weitgehend unverändert. Ein Grund hierfür könnte sein, dass ein anderer *Fgfr* den Verlust des *Fgfr1* in der ventralen MHR kompensiert und stattdessen das *Fgf8* Signal weiterleitet. Tatsächlich grenzt die *Fgfr2* Expression bereits ab E8.5 im ventralen Mittelhirn an die *Fgf8* Expression an, und der *Fgfr2* ist außerdem durchgehend in der Grundplatte der MHR exprimiert. Ab E9.5 ist der *Fgfr2* auch im ventralen Hinterhirn an die *Fgf8* Expression angrenzend exprimiert. D.h. dass der *Fgfr2* ist zum Zeitpunkt, bei dem *Fgf8* an der MHG seine Musterbildungsfunktion ausübt, ventral sowohl im Mittel- als auch im Hinterhirn räumlich eng an *Fgf8* angrenzend exprimiert und daher die Musterbildungsfunktion von *Fgf8* vermitteln könnte.

Aus diesem Grund sollte analog zum *Fgfr1* der *Fgfr2* in der MHR deletiert werden. In dieser konditionalen Knock-Out Maus sollte die histologische und zelluläre Integrität der MHR untersucht werden, um dadurch Rückschlüsse auf die Weiterleitung des musterbildenden *Fgf8* Signals durch den *Fgfr2* zu erhalten.

4.1.2.1 Die „gefloxte“ Fgf Rezeptor 2 Maus: $Fgfr2^{lox/lox}$

Die „gefloxte“ $Fgfr2$ Maus ($Fgfr2^{lox/lox}$) wurde uns von Prof. Michael Sendtner, Würzburg zur Verfügung gestellt. In dieser Maus ist das fünfte Exon des $Fgfr2$ (NCBI accession number Y16155) von loxP sites flankiert (Abb. 16). Zur Herstellung der Maus wurde ein 6 Kb großes Konstrukt kloniert. In dieses Konstrukt waren zwei loxP sites jeweils in die Restriktionsschnittstellen *BclI* und *BsrGI*, die das Exon 5 flankierten, eingesetzt worden. Durch homologe Rekombination in ES Zellen wurde das 6 Kb große genomische Fragment durch das 6 Kb-Konstrukt ersetzt. Eine durch loxP sites flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette war ebenfalls in dem Konstrukt enthalten, mit deren Hilfe auf stattgefundene homologe Rekombination selektiert wurde. Durch transiente *Cre* Rekombinase Expression in den ES Zellen wurde die Resistenz-Kassette anschließend entfernt. Zugleich wurden die ES-Zellen daraufhin überprüft, ob nach der transienten *Cre* Rekombinase Expression das geflochte fünfte Exon noch vorhanden ist. Nur diese ES-Zellen, die keine Resistenz-Kassette jedoch noch das geflochte fünfte Exon enthielten, wurden für die Herstellung der geflochten $Fgfr2$ Maus verwendet. In Abbildung 16 ist das Konstrukt, das in der „geflochten“ $Fgfr2$ Maus „enthalten“ ist, gezeigt. Es wurden Primer für die Genotypisierung dieser Mäuse (genannt 5' und 3' R2-Genotypisierungsprimer, s. Anhang) entworfen. Diese liegen außerhalb beider loxP sites und machen somit eine Unterscheidung zwischen Wildtyp (wt: 0.8 Kb), Mutante (~ 1.0 Kb; die beiden loxP sites inklusive flankierender Sequenzen sind etwa 100 bp gross) und dem Allel, in dem das fünfte Exon deletiert ist (~ 0.6 Kb) möglich (Abb. 16B, für das „deletierte“ Allel s. Abb. 20). Es wurde außerdem eine Probe für die Genotypisierung per genomischem Southern Blot (s. Material und Methoden 6.4.3) kloniert, die eine Unterscheidung des mutanten und wildtypischen Allels, als auch die Detektion der Deletion von Exon 5 in der genomischen DNA möglich macht (Abb. 16A,B).

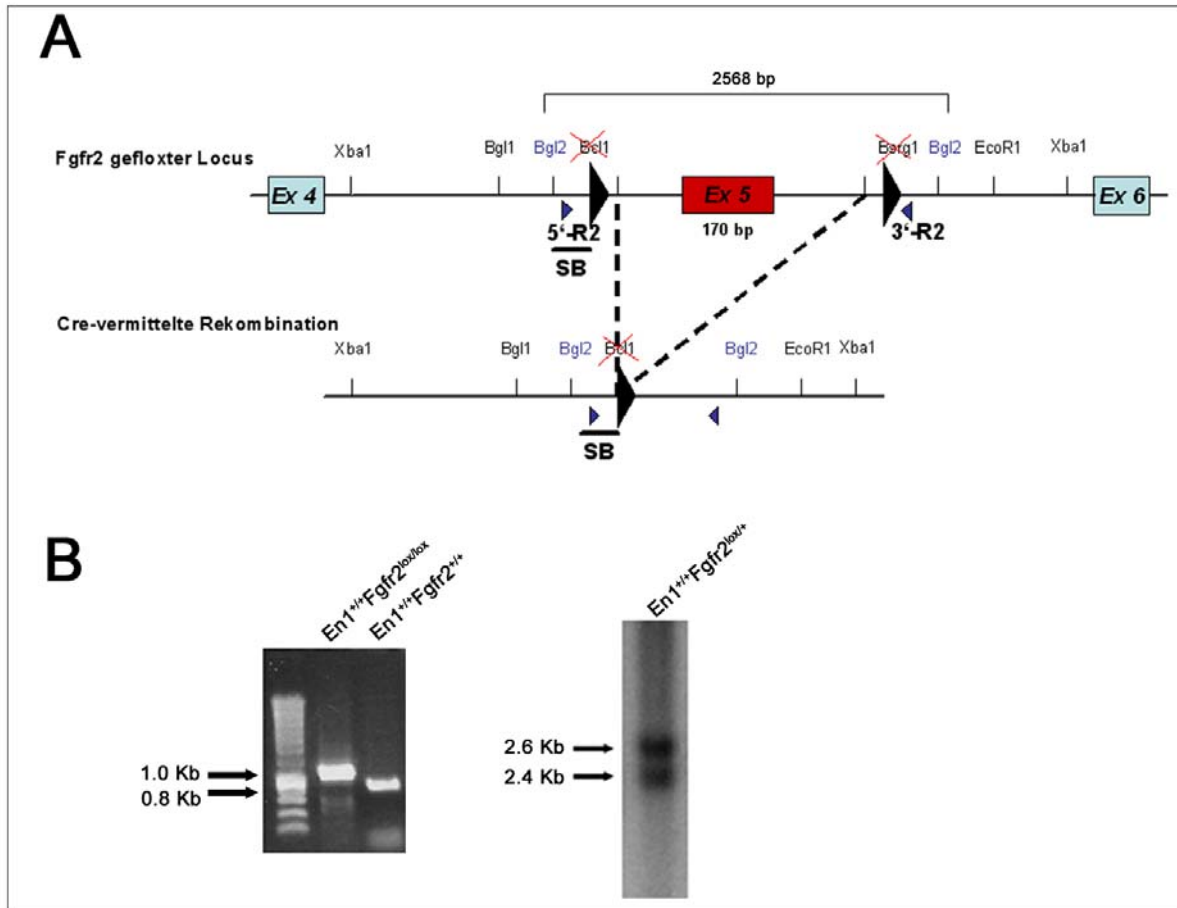


Abb. 16: (A) Das Konstrukt der geflochten *Fgfr2* Maus und (B) Genotypisierung. Im Konstrukt ist das Exon 5 durch zwei loxP sites, die jeweils in die Restriktionsschnittstellen *BclI* und *BsrGI* eingesetzt wurden, flankiert (große schwarze Dreiecke). Dadurch wurden die Schnittstellen zerstört (gekennzeichnet durch ein rotes Kreuz). Kreuzt man eine für das geflochte Allel homozygote Maus mit einer *Cre* Rekombinase exprimierenden Maus, so findet in den Zellen, die die *Cre* Rekombinase exprimieren, eine Rekombination der beiden loxP sites statt, wodurch das Exon 5 des *Fgfr2* aus der genomischen DNA herausgeschnitten wird. Die beiden für die Genotypisierung verwendeten Primer sind als kleine schwarze Dreiecke angegeben (bezeichnet als 5'-R2 und 3'-R2). Das Exon 5 ist 170 bp groß. Die southern blot Probe ist gekennzeichnet (SB). Sie hybridisiert hinter der 5' *BglII* Schnittstelle mit der genomischen DNA und ergibt nach Fragmentierung der genomischen DNA mit dem Enzym *BglII* im wt ein 2368 bp großes Fragment und in der geflochten Maus ein 2568 bp großes Fragment (s. (B)). Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu dargestellt. **(B)** zeigt eine PCR mit den 5'-R2 und 3'-R2 Genotypisierungsprimern (links). Für den wildtypischen Locus ergibt sich eine Fragmentgröße von 0.8 Kb, für den geflochten Locus 1.0 Kb. Im Southern Blot (rechts) ergeben sich 2.6 Kb für das geflochte Allel und 2.4 Kb für das wildtypische Allel.

Die durch die Cre Rekombinase vermittelte Deletion des fünften Exons des *Fgfr2* führt zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) in der entsprechenden *Fgfr2* mRNA, resultierend in einem Stop-Kodon im sechsten Exon und dadurch zu einem trunkierten, nicht funktionellen Protein (Abb. 17).

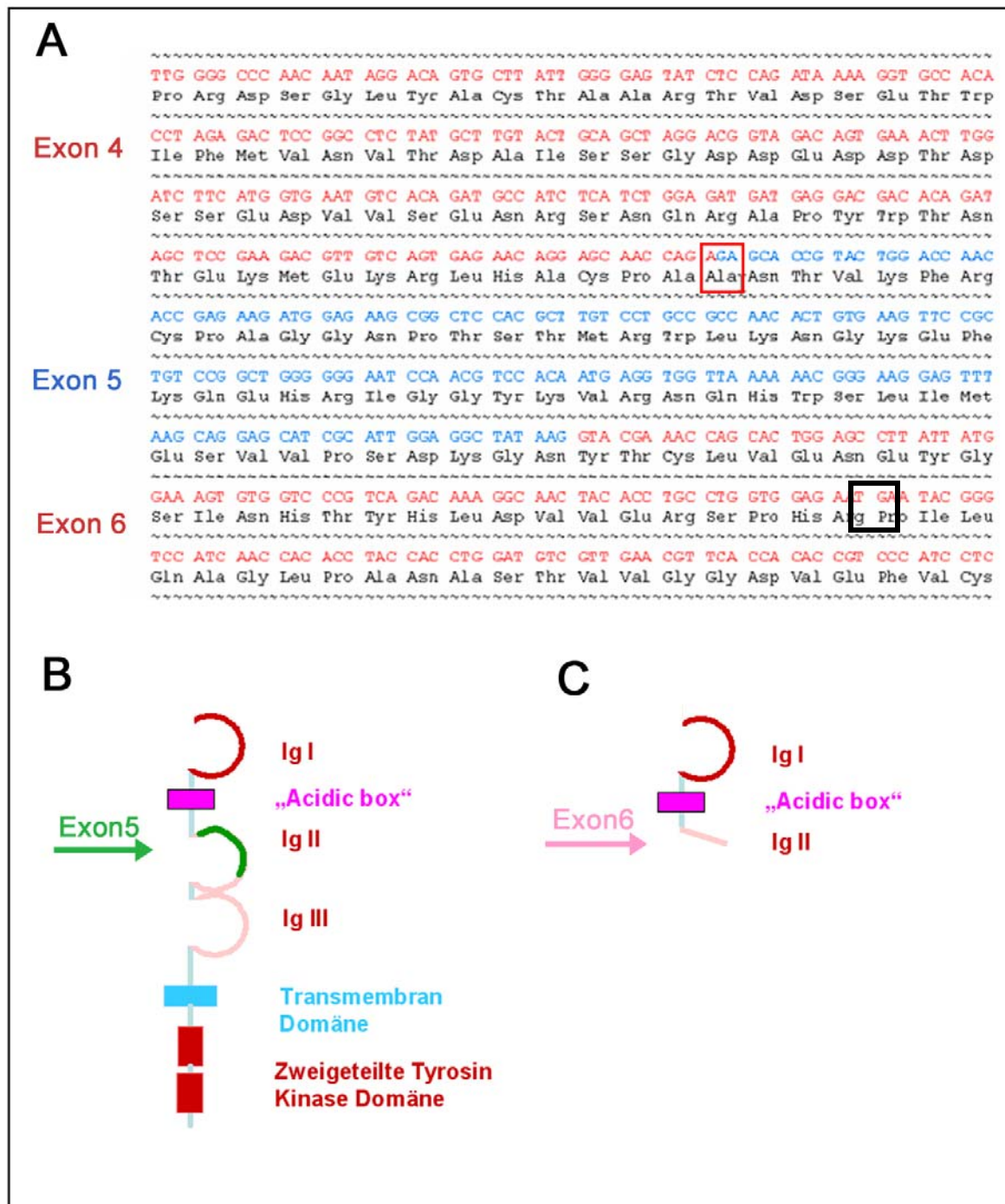


Abb. 17: (A) Durch die Deletion des fünften Exons kommt es zu einer Leserasterverschiebung im Transkript des mutierten *Fgfr2*, resultierend in einem

verkürzten, vorzeitig abgebrochenem Protein (B,C). **(A)** Wird das gefloخته fünfte Exon durch die *Cre* Rekombinase aus der genomischen DNA geschnitten, so kommt es zu einer Leserasterverschiebung in der Sequenz, indem das erste Nukleotid des Kodons zwischen Exon 4 und 5, an das erste Kodon des sechsten Exons gespleißt wird. Das rote Kästchen markiert das Kodon in dem die Leserasterverschiebung stattfindet. Dadurch entsteht ein Stop-Kodon im sechsten Exon (schwarzes Kästchen). **(B)** Das fünfte Exon kodiert für den N-terminalen Teil der zweiten Ig-ähnlichen Domäne (grün). **(C)** Das trunkierte Protein ist funktionslos, da der transmembrane und der cytoplasmatische Teil fehlen und dadurch kein Einbau in die Zellmembran und damit auch keine Signalweiterleitung mehr möglich ist.

4.1.2.2 Die *En1^{Cre/+}* Maus

Die *En1^{Cre/+}* Maus wurde von Prof. Dr. Wolfgang Wurst konstruiert (Kimmel et al., 2000). In dieser Maus wird die *Cre* Rekombinase unter der Kontrolle des *En1*-Promoters exprimiert. *En1* wird ab dem 1-Somiten-Embryonalstadium exprimiert. Die Expression umfasst bei diesem Stadium (E8) das gesamte Mittelhirn und Rhombomer 1 des Hinterhirns. Wird die *En1^{Cre/+}* Maus mit einer Maus gekreuzt, die ein gefloخته Gen oder Genfragment hat, so wird dieses Genfragment in allen Zellen irreversibel deletiert, in denen *En1* jemals exprimiert wurde. Genotypisiert wurde die *En1^{Cre/+}* Maus mittels PCR mit *Cre*-spezifischen Primern (s. Anhang).

4.1.2.3 Expression, Aktivität und Funktionalität der *Cre* Rekombinase im *En1*-Lokus

Die „Rosa26“ (*R26R*) Maus kann als Reportermaus zum Nachweis der *Cre* Aktivität eingesetzt werden (Soriano, 1999). Die *R26R* Maus beinhaltet das lacZ Gen als Reporter mit einem vorgeschalteten transkriptionellen Stop-Signal im „Rosa26“ Locus, der eine ansonsten ubiquitäre Expression vermitteln würde. Das Stop-Signal ist von loxP sites flankiert. Wird das Stop-Signal durch die Rekombination der beiden loxP sites durch die *Cre* Rekombinase herausgeschnitten, wird das Enzym β -Galaktosidase gebildet. Der histochemische Nachweis der β -Galaktosidase (β -Gal-Färbung) führt zu einem blauen Niederschlag. Somit kann mittels dieser Maus die gewebsspezifische Expression der *Cre* Rekombinase nachgewiesen werden.

4.1.2.3.1 Nachweis der Aktivität der Cre Rekombinase in frühen embryonalen Stadien

Um die Cre Rekombinase Aktivität zeitlich und räumlich in frühen Embryonalstadien festzustellen, wurde eine β -Gal Färbung an Embryonen unterschiedlicher Stadien aus einer Kreuzung zwischen der $En1^{Cre/+}$ Maus und der $R26R$ Maus durchgeführt. Bereits bei 10 Somiten war die β -Gal Färbung sehr stark ausgeprägt und spiegelte die $En1$ Expression wider (Abb. 18). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen β -Gal-Nachweis unter der Verwendung der gleichen Cre Maus bei einem Stadium von 8 Somiten (Li et al., 2002, Trokovic et al., 2003). Auch spiegelt der β -Gal-Nachweis im adulten Tier (s. Abb. 29) die Spezifität der $En1^{Cre/+}$ Maus für die MHR wieder. Die $En1^{Cre/+}$ Maus ist somit funktional und erlaubt die frühe Inaktivierung von Genen in der MHR.

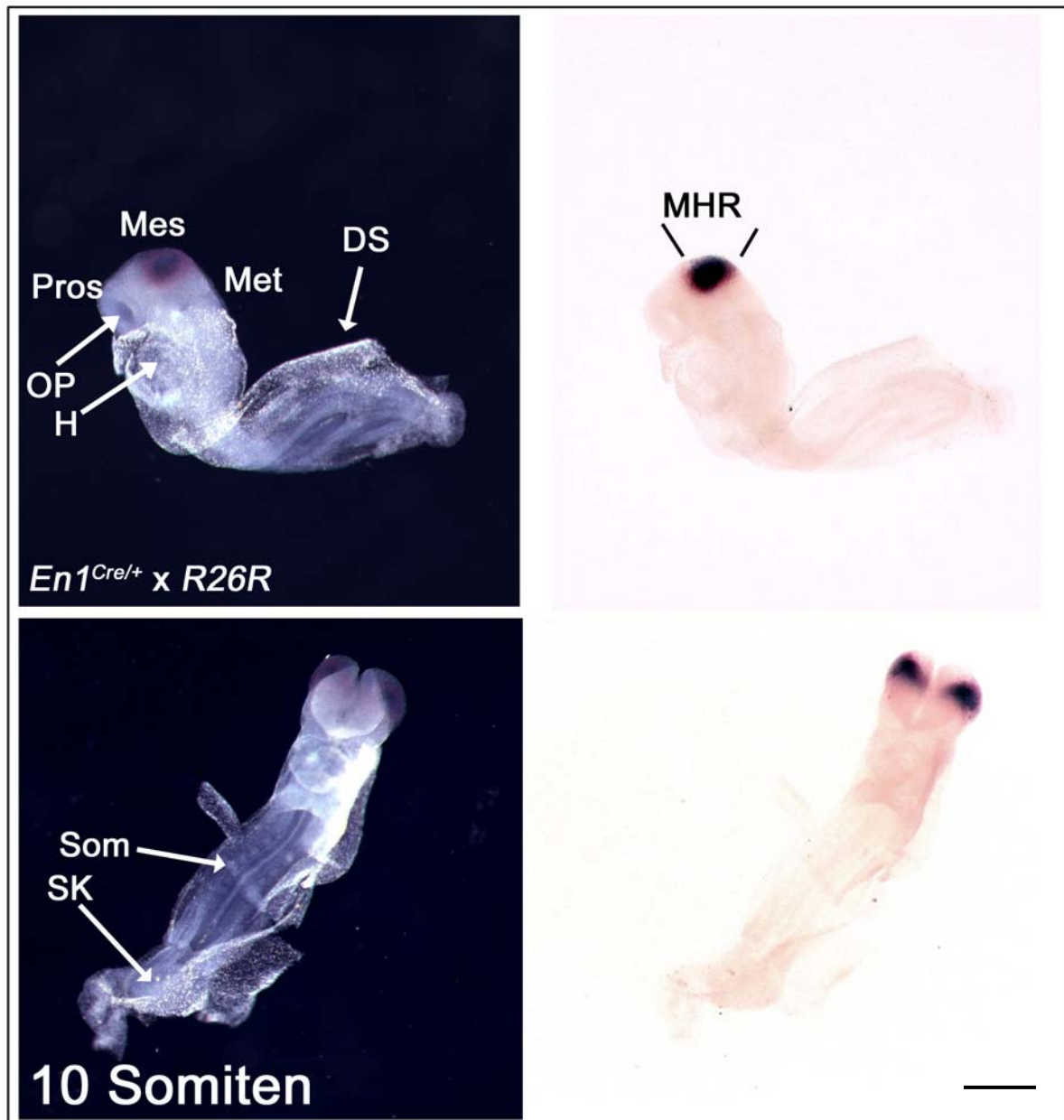


Abb. 18: Die Aktivität der Cre Rekombinase in der *En1* Expressionsdomäne bei E8.5. Die obere Reihe zeigt eine seitliche Aufnahme des Embryos, die untere Reihe eine frontale Aufnahme. Bei diesem E8.5 Embryo (10 Somiten) ist die Cre Rekombinase im Mittelhirn und anterioren Hinterhirn aktiv und führt dadurch zur Aktivierung des „lacZ“ Genes. Das Genprodukt, die β -Galaktosidase wird mit der β -Gal Färbung nachgewiesen. DS: Dottersack, H: Herz, Mes: Mesencephalon, OP: optic placode, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, SK: Schwanzknospe, Som: Somiten. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

4.1.2.4 Zucht der konditionalen $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Maus

Wir erhielten zwei heterozygote Männchen und ein Weibchen mit dem Genotyp $En1^{+/+} Fgfr2^{lox/+}$ von Prof. Michael Sendtner, Würzburg. Bei diesen handelte es sich um Tiere, die auf den Mausstamm SV129 in unbekannter Generation zurückgezüchtet worden waren. Diese wurden mit Weibchen bzw. einem Männchen des C57BL/6 Stammes (wildtypischer Inzuchtstamm) verpaart, um weitere $En1^{+/+} Fgfr2^{lox/+}$ Nachkommen zu erhalten (F1). Die weiblichen heterozygoten Nachkommen wurden mit $En1^{Cre/+}$ Männchen (auf C57BL/6 Hintergrund gekreuzt) verpaart. Von der $En1^{Cre/+}$ Maus ist bekannt, dass die Cre Rekombinase bereits in der weiblichen Keimbahn aktiviert wird, so dass die resultierenden Nachkommen einer weiblichen $En1^{Cre/+}$ Maus und einer männlichen Maus, die das gefloخته Gen trägt, ein Gesamtkörper-Mosaik bezüglich der Deletion des gefloختen DNA-Abschnitts darstellen. Daher wurden in dieser Arbeit ausschließlich die $En1^{Cre/+}$ Männchen für die Zucht gewählt (auch beschrieben in Chi et al., 2003, Puelles et al., 2004).

Aus den Verpaarungen der $En1^{+/+} Fgfr2^{lox/+}$ Weibchen mit den $En1^{Cre/+} Fgfr2^{+/+}$ Männchen wurden in der F2 Generation mehrere Männchen erhalten, die den Genotyp $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/+}$ hatten. In der Zwischenzeit wurden heterozygot gefloخته Individuen ($En1^{+/+} Fgfr2^{lox/+}$) untereinander gekreuzt (F1 Intercross) um homozygot gefloخته Mäuse ($En1^{+/+} Fgfr2^{lox/lox}$) zu erhalten. $En1^{+/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Weibchen wurden mit den $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/+}$ Männchen verpaart. Die Nachkommengeneration bestand gemäß der Mendelschen Gesetze aus 25% $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Tieren, von denen etwa die Hälfte Männchen waren. Um genügend große Zahlen für die Mutanten-Analyse zu garantieren, wurden die $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Männchen mit homozygot geflochten Weibchen ($En1^{+/+} Fgfr2^{lox/lox}$) verpaart, und die sich daraus ergebenden Embryonen und adulten Nachkommen wurden analysiert. Als Kontrolltiere wurden Geschwistertiere jeweils des gleichen Wurfes mit dem Genotyp $En1^{+/+} Fgfr2^{lox/lox}$ verwendet. Nach zweimaligem Einkreuzen des C57BL/6 Stammes fanden die Verpaarungen lediglich „untereinander“ statt, so dass der genetische Hintergrund aller analysierten Embryonen und Mäuse konstant gehalten wurde.

4.1.2.5 Nachweis der Deletion des *Fgfr2* Exon 5 in der MHR in embryonalen Stadien

Es wurde überprüft, ob und ab welchem embryonalen Stadium das fünfte Exon des *Fgfr2* tatsächlich deletiert ist. Dazu wurde die Deletion des Exon 5 innerhalb der *Fgfr2* mRNA durch eine *ISH* mit einer Exon 5 spezifischen Probe nachgewiesen. Obwohl das fünfte Exon deletiert ist, sollten andere Bereiche der *Fgfr2* mRNA vorhanden sein. Daher wurden gleichzeitig konsekutive Schnitte mit einer Sonde, die spezifisch für einen anderen Bereich des *Fgfr2* (Exon 9 und 10) hybridisiert, um detailliert erkennen zu können, in welchen Geweben das fünfte Exon des *Fgfr2* deletiert ist. Gleichzeitig wurde die Expression der *Cre* Rekombinase in der *En1* Expressionsdomäne nachgewiesen. Als *ISH* Sonde zum Nachweis von Exon 5 des *Fgfr2* diente das aufgereinigte *Fgfr2*-„Exon 5-wt“-PCR Fragment aus der Genotypisierung (s. 4.1.2.1). Bei einem Stadium von 8 Somiten war das fünfte Exon mit der *in-situ* Probe in der MHR noch schwach nachweisbar (Abb. 19). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die *Cre* Rekombinase zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig aktiv ist (Nagy et al., 2000).

Wie in 4.1.2.3.1 beschrieben, ist jedoch die β -Gal Färbung bei einem Stadium von 10 Somiten voll ausgeprägt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Exon 5 etwa ab einem Stadium von 10 Somiten vollständig deletiert wird. Eine vollständige Deletion schließlich konnte in adulten *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Tieren nachgewiesen werden (4.1.2.6).

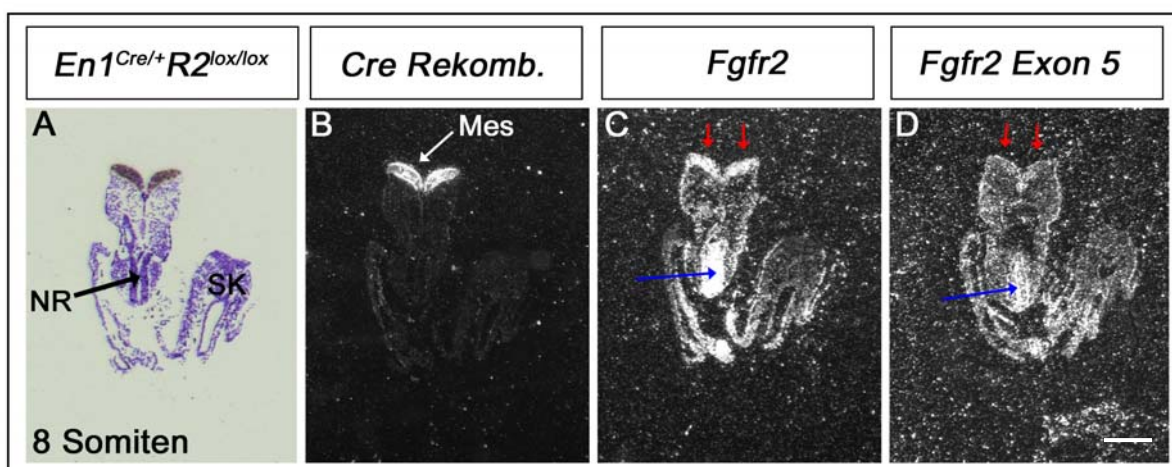


Abb. 19: Das fünfte Exon des *Fgfr2* ist in *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Embryonen unvollständig deletiert. (A-D) Eine radioaktive *ISH* wurde an konsekutiven, coronalen Schnitten eines 8 Somiten (E8.5) Embryos des Genotyps *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* durchgeführt. Die Schnitte wurden mit einer Sonde gegen die *Cre* Rekombinase (B), den C-terminalen Teil des *Fgfr2* (Exon 9 und 10) (C), und gegen das *Fgfr2* Exon 5 (D) hybridisiert. (A) stellt eine Hellfeldaufnahme des Schnittes in (B) dar, die Schnittebene des geschnittenen 8-Somiten Embryos befindet sich auf der Höhe des Mittelhirns. Man erkennt die *Fgfr2* Expression im Mittelhirn (C). Diese Expression überlappt mit der *Cre* Rekombinase in diesem Bereich vollständig (B). Die Stärke des Hybridisierungssignals mit der Exon 5 spezifischen Probe ist im Vergleich zur Hybridisierung mit der *ISH*-Probe des C-terminalen Teils des *Fgfr2* (Exon 9,10) insgesamt schwächer (blaue Pfeile), jedoch ist deutlich zu erkennen, dass im Gegensatz zum Signal im restlichen Neuralrohr, das Hybridisierungssignal in der MHR stark abgeschwächt ist (rote Pfeile) (D). Mes: Mesencephalon, NR: Neuralrohr, SK: Schwanzknospe. Der Maßstab beträgt 500 µm.

4.1.2.6 Nachweis der Deletion des *Fgfr2* Exon 5 im adulten Tier

Um nachzuweisen, dass das fünfte Exon des *Fgfr2* auch in der MHR der adulten Mutante fehlt, wurde Gewebe aus dem Mittel-/Hinterhirnbereich einer adulten *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Maus (Cerebellum, inferiore colliculi (IC) und superiore colliculi (SC)) und eines *En1^{+/+}Fgfr2^{lox/lox}* Geschwister-Kontrolltiers (Cerebellum) isoliert (s. Material und Methoden, 6.4.1). Als Kontrollen dienten Gewebe aus dem Cortex, dem olfaktorischen Bulbus und der Schwanzspitze der mutanten Maus. Die genomische DNA wurde isoliert und mit den 5'-RT und 3'-RT Genotypisierungsprimern (s. Anhang) eine PCR durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass das Exon 5 im Mittel-/Hinterhirngewebe der Mutante (inferiore und superiore Colliculi, Cerebellum) deletiert war (Bandengröße von 0.6 Kb), nicht jedoch in den Vergleichsgeweben Cortex, olfaktorischer Bulbus und Schwanz und im Cerebellum des Kontrolltiers (Abb. 20). Ventrales Gewebe der MHR wurde ebenfalls untersucht und zeigt ebenfalls eine Deletion von Exon 5 (Daten nicht gezeigt).

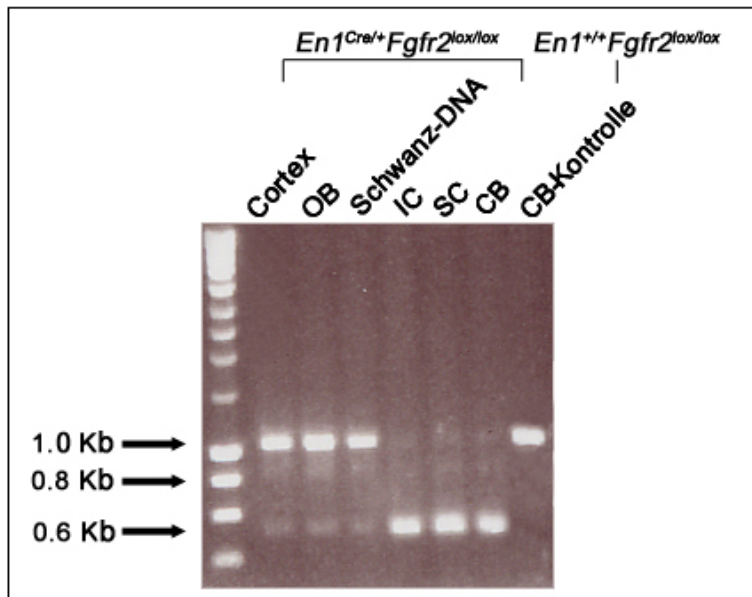


Abb. 20: Das fünfte Exon des *Fgfr2* ist in der Mittel-/Hinterhirnregion der adulten *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus deletiert. In den Kontrollgeweben der *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus: Cortex, olfaktorischer Bulbus (OB) und Schwanz konnte mittels genomischer PCR das „gefloxte“ Allel mit einer Größe von 1.0 Kb nachgewiesen werden. In den Regionen, in denen die *Cre* Rekombinase aktiv war und ist (inferiore und superiore Colliculi und Cerebellum), war das detektierte Fragment 0.6 Kb groß. Dies entspricht der Deletion von Exon 5. In der „CB-Kontrolle“ (Cerebellum des Geschwister-Kontrolltieres *En1^{+/+} Fgfr2^{lox/lox}*) war das geflochte Allel mit einer Bandengröße von 1.0 Kb detektierbar. CB: Cerebellum, OB: olfaktorischer Bulbus, IC: inferiore Colliculi, SC: superiore Colliculi

4.1.3 Phänotypische Charakterisierung der *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus

Die *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus war überlebensfähig, erreichte das Erwachsenenalter ohne Auffälligkeiten im äußeren Erscheinungsbild und Verhalten und war zudem fertil.

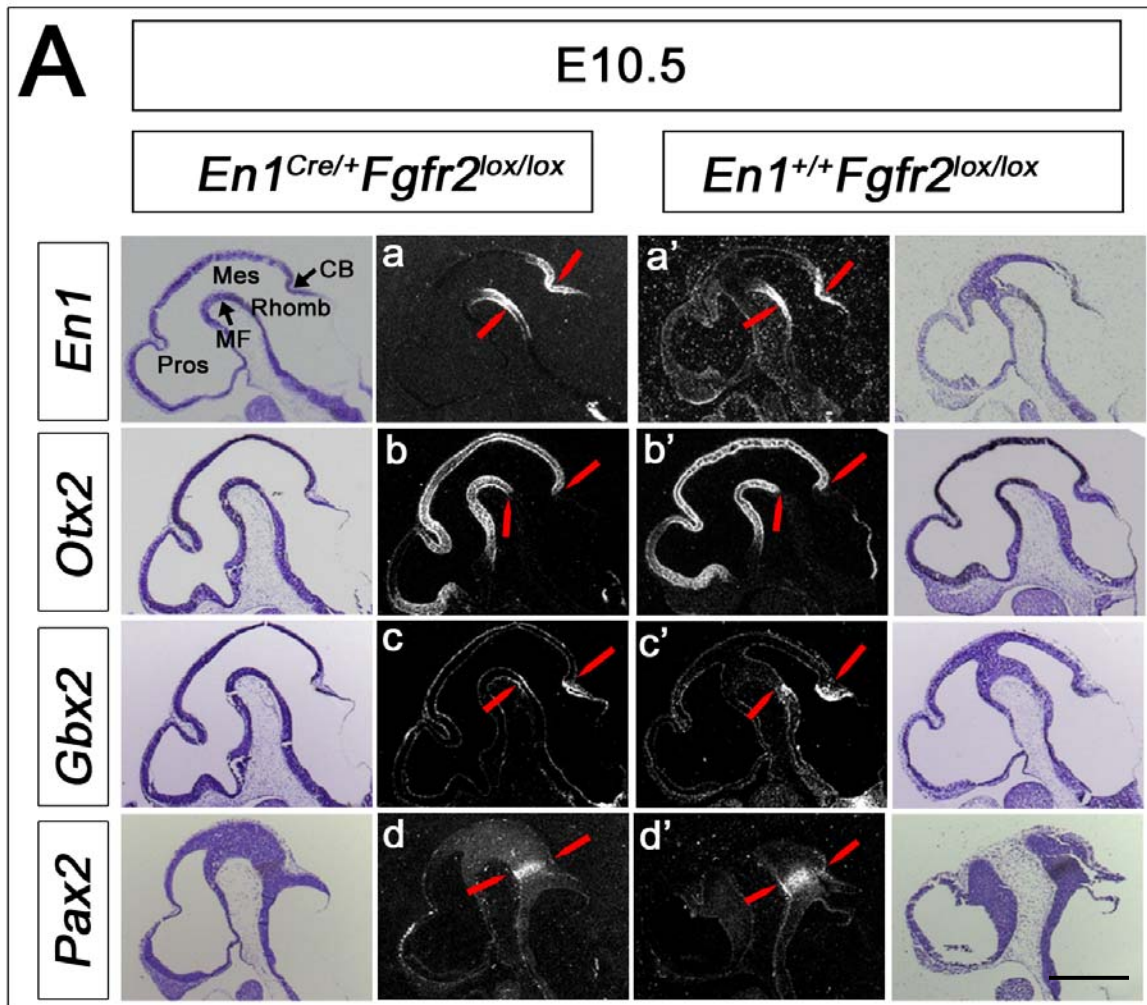
4.1.3.1 Untersuchung der Musterbildung in der *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus während der frühen Mittel- und Hinterhirnentwicklung

Zuerst wurde in den konditionalen *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Mäusen untersucht, ob die Gene, die das regulatorische Netzwerk des musterbildenden MHO konstituieren, und

deren Expression ektoisch direkt von *Fgf8* reguliert wird (Crossley et al., 1996; Martinez et al., 1999; Liu et al., 1999; Liu und Joyner, 2001b), in ihrem Expressionsmuster an der MHG verändert sind. Daher wurden speziell die Expression von *Wnt1*, *En1*, *Otx2*, *Gbx2* und *Pax2* untersucht.

Eine Veränderung der Expressionsdomänen der MHO Gene, bedingt durch den Verlust des *Fgfr2* und dadurch einer möglichen Veränderung der Weiterleitung des *Fgf8* Signals, würde zu Musterbildungsdefekten führen, weshalb die Expressionsmuster im Hinblick auf die A/P Achse an sagittal geschnittenen Embryonen (*En1*, *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*) und in der D/V Achse an coronalen Schnitten (*Wnt1*, *Wnt3a*, *Shh*) untersucht wurden (Abb. 21 und Abb. 22). Die Expressionsmuster aller Gene wurden jeweils bei E10.5 und E12.5 untersucht, da bei E10.5 die Genkaskade am MHO vollständig aktiviert ist und erste Veränderungen sichtbar wären. Bei E12.5 sollten subtile Veränderungen, die bei E10.5 möglicherweise nicht detektierbar wären, ausgeprägt sein.

Durch das Fehlen des *Fgfr2* ist jedoch weder die Musterbildung in der A/P Achse (gezeigt anhand der Expressionsmuster der MHO Gene *En1*, *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*) (Abb. 21) noch in der D/V Achse (Expression von *Wnt1*, *Wnt3a* und *Shh*) (Abb. 22) beeinträchtigt.



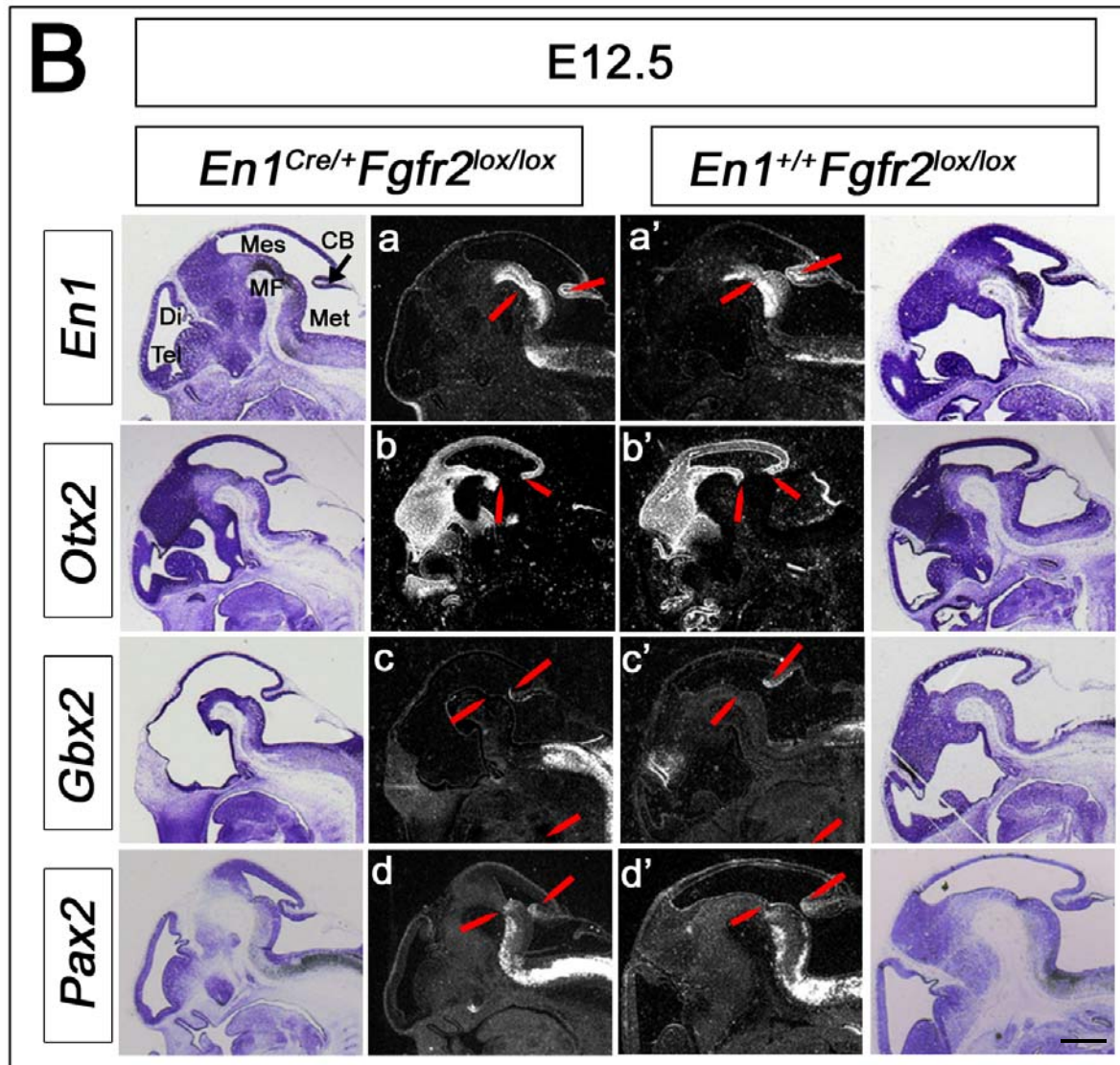
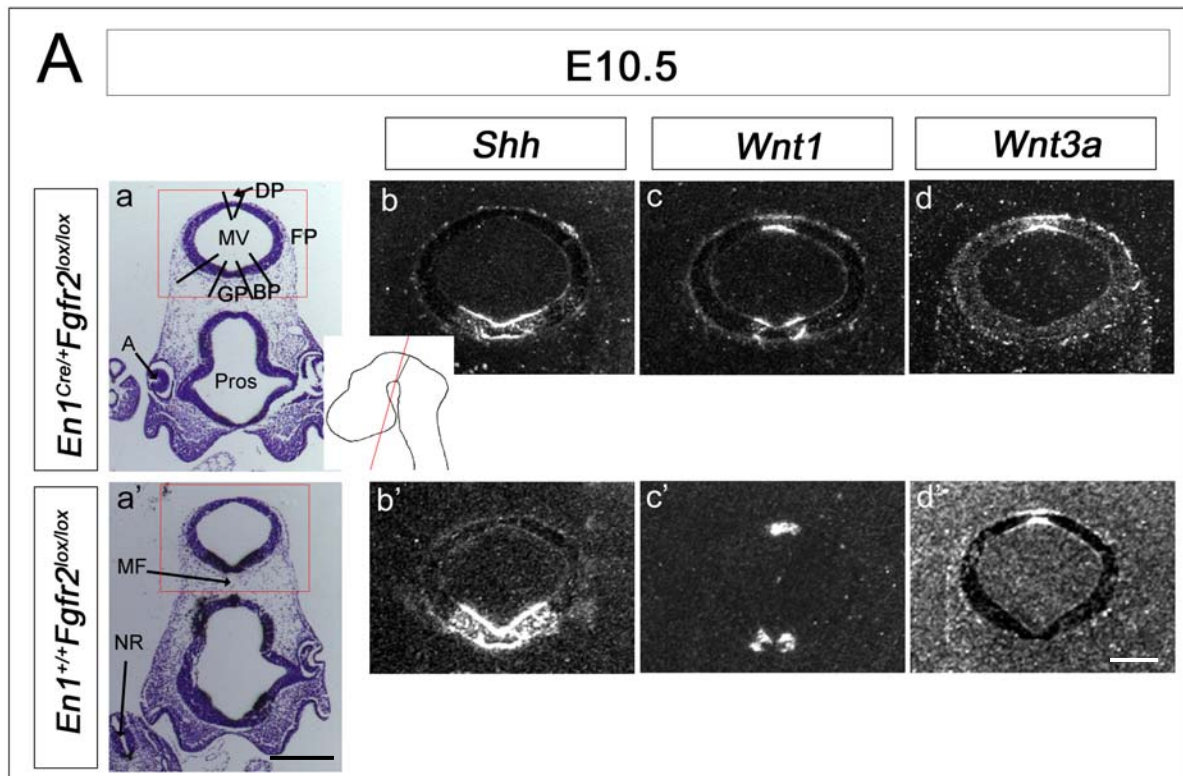


Abb. 21: Die Expression von MHO-Genen an der MHG ist in der $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Maus nicht verändert. (A) Eine radioaktive *ISH* mit Proben gegen *En1* (a,a'), *Otx2* (b,b'), *Gbx2* (c,c') und *Pax2* (d,d') wurde an sagittalen Schnitten von E10.5 Mutanten und Kontrollmausembryonen durchgeführt. **(B)** stellt die Expressionsmuster der Gene *En1* (a,a'), *Otx2* (b,b'), *Gbx2* (c,c') und *Pax2* (d,d') auf sagittalen Schnitten von E12.5 Mutanten und Kontrollmausembryonen dar. (a,b,c,d) zeigen die Mutante, (a',b',c',d') zeigen die Kontrolle. Links von der Dunkelfeldaufnahme der Mutante bzw. rechts von der Dunkelfeldaufnahme des Kontrolltiers befindet sich das Hellfeldbild. Die Expressionsmuster aller untersuchten Gene in der MHR entsprechen den Expressionsmustern in der Kontrolle: *En1* wird bei E10.5 im caudalen Mittelhirn und in r1 exprimiert (a,a'). *Otx2* wird im Telencephalon, Diencephalon und Mesencephalon bis hin zur MHG hin exprimiert (b,b'). *Gbx2* wird im dorsalen r1 exprimiert (c,c'). *Pax2* Expression ist bei E10.5 in r1 detektierbar (d,d'). **(B)** Bei E12.5 umspannt die *En1* Expression weiterhin die MHG (a,a'). *Otx2* Expression ist im Tel-, Di- und

Mesencephalon bis zur MHG zu erkennen (**b,b'**). *Gbx2* ist in r1 exprimiert, ventral jedoch kaum noch erkennbar (**c,c'**). *Pax2* Expression findet sich bei E12.5 wie bei E10.5 in r1 (**d,d'**). Rote Pfeile markieren die MHG dorsal und ventral. In der cerebellaren Anlage befindet sich diese Grenze fast genau in der Mitte der Einwölbung (zwischen zukünftigem IC und Cerebellum). CB: Cerebellum, Di: Diencephalon, Mes: Mesencephalon, MF: mesencephale Flexur, Met: Metencephalon, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, Tel: Telencephalon. Der Maßstab beträgt 500 μm .



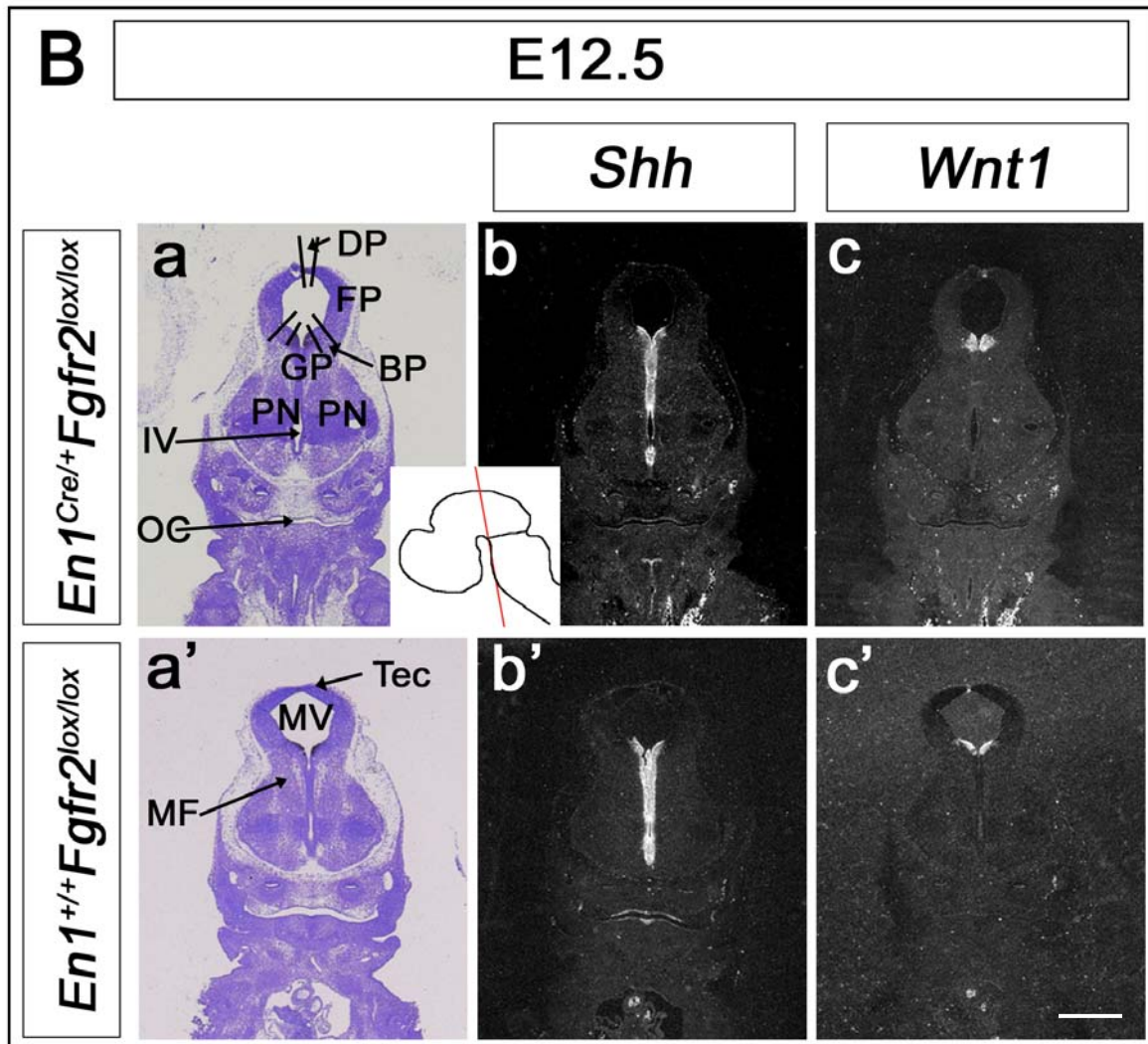


Abb. 22: Die Expression der Gene *Wnt1*, *Shh* und *Wnt3a* an der MHG ist in der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. (A) Eine radioaktive ISH mit Sonden gegen *Shh* (b,b'), *Wnt1* (c,c') und *Wnt3a* (d,d') wurde an coronalen, konsekutiven Schnitten von E10.5 mutanten und Kontroll-Mausembryonen durchgeführt. (B) radioaktive ISH mit Sonden gegen *Shh* (b,b') und *Wnt1* (c,c') an coronalen, konsekutiven Schnitten von E12.5 Mutanten und Kontroll-Mausembryonen.. Die obere Reihe stellt jeweils die Expressionsmuster in der Mutanten dar, die untere Reihe im Kontrolltier. (a,a') stellen bei (A) bzw. (B) Hellfeldaufnahmen zu (b,b') dar. Die kleinen Einsätze zeigen die Schnittebene. Die roten Rechtecke markieren die vergrößerten Bereiche. (A) Bei E10.5 ist *Shh* (b,b') und *Wnt1* in der Grund- und Basalplatte exprimiert, *Wnt1* außerdem in der Deckplatte (c,c'). *Wnt3a* Expression findet sich in dem Stadium ebenfalls in der Deckplatte (c,c'). Die Expressionsmuster der Gene ist nicht verändert. B: Bei E12.5 ist *Shh* in der Grundplatte exprimiert, man erkennt die Expression am MHO entlang der MF bis ins Metencephalon hinein (b,b'). *Wnt1* Expression erkennt man in der GP und in einem schmalen Streifen in der

DP (**c,c'**). Die Expressionsdomänen erscheinen in der Mutante etwas breiter, dies konnte jedoch an anderen Tieren nicht verifiziert werden und ist vermutlich auf einen unterschiedlichen Winkel der Schnittebene bei Mutante und Kontrolle zurückzuführen. IV: vierter Ventrikel, BP: Basalplatte, Di: Diencephalon, DP: Deckplatte, FP: Flügelplatte, GP: Grundplatte, Mes: Mesencephalon, MF: mesencephale Flexur, MV: mesencephaler Vesikel, PN: pontine nuclei, OC: oral cavity, Pros: Prosencephalon, Tec: Tectum, Tel: Telecephalon. Der Maßstab beträgt 500 µm.

4.1.3.2 Untersuchung der histologischen und zellulären Integrität des ventralen Mittelhirns in der $En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}$ Maus während der frühen Embryonalentwicklung

Um die erhaltenen Daten bezüglich der Expression von Musterbildungsgenen zu komplementieren, wurde die histologische und zelluläre Integrität des ventralen Mittelhirns untersucht. Im ventralen Mittelhirn entstehen mehrere neuronale Subpopulationen, die durch die Expression verschiedener Markergene gekennzeichnet sind. Die Überprüfung der räumlichen Expressionsmuster der in dieser Region exprimierten Marker (*TH*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1* und *Pou4f1*) gibt einen Hinweis auf die korrekte Spezifizierung des ventralen Mittelhirns. *TH* markiert die catecholaminergen Neurone und *Pou4f1* markiert die Neurone des Nucleus ruber (red nucleus, RN). *Nkx6.1* markiert eine Subpopulation von Vorläufern des nucleus ruber, während das spätere Schicksal der *Nkx2.2* Expressionsdomäne des ventralen Mittelhirns in dieser Region noch unbekannt ist (Puelles et al., 2004).

Die Expression dieser vier Marker wurde in den $En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}$ Mäusen bei E12.5 an konsekutiven coronalen Schnitten im Vergleich zur Kontrolle $En1^{+/+}Fgfr2^{lox/lox}$ untersucht. Es zeigt sich jedoch keine Veränderung dieser Populationen des ventralen Mittelhirns in der Mutante (Abb. 23).

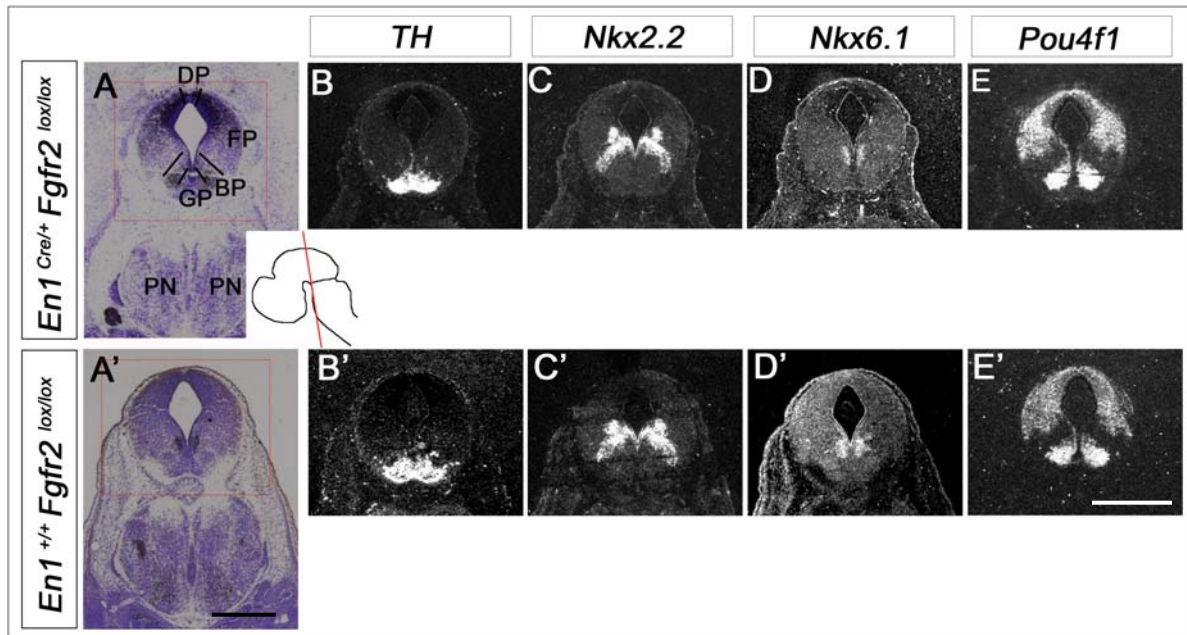


Abb. 23: Die zelluläre Integrität des ventralen Mittelhirns ist in der $En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}$ Maus nicht verändert. Eine radioaktive ISH mit Proben gegen TH (B,B'), $Nkx2.2$ (C,C'), $Nkx6.1$ (D,D') und $Pou4f1$ (E,E') wurde an konsekutiven, coronalen Schnitten eines Mutanten und Kontroll-Embryos bei E12.5 durchgeführt. Die obere Reihe zeigt die Expression in der Mutanten $En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}$, die untere Reihe im Kontrolltier $En1^{+/-}Fgfr2^{lox/lox}$. (A) bzw. (A') stellen die Hellfeldaufnahmen zu (B) bzw. (B') dar. Die roten Rechtecke markieren die vergrößerten Regionen. TH -positive dopaminerge Neurone sind im ventralen Mittelhirn in der Grund- und Basalplatte vorhanden (B,B'). $Nkx2.2$ ist an der Grenze von Basal- und Flügelplatte exprimiert (C,C'), $Nkx6.1$ ist in der Basalplatte exprimiert (D,D'), $Pou4f1$ oberhalb der DA Neurone und ebenfalls in der Basal-, Flügel- und Deckplatte (E,E'). Man erkennt keine Veränderung der Expressionsdomänen im ventralen Mittelhirn. Die Domänen in der Kontrolle sehen ein wenig breiter aus, dies liegt aber an der Schnittebene und konnte nicht reproduziert werden. Der Einsatz zeigt die Schnittebene. BP: Basalplatte, DP: Deckplatte, FP: Flügelplatte, GP: Grundplatte; PN: pontine nuclei. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

4.1.3.3 Untersuchung der GABAergen, noradrenergen und serotonergen Neurone sowie der Hirnnervenkerne der $En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}$ Maus

Es wurden weitere neuronale Subpopulationen auf ihr Vorhandensein und ihre korrekte Position in der MHR untersucht. Mit den Markern $GAD65$ und $Sert$ wurden die GABAergen bzw. serotonergen Neurone in der mutanten Maus (Fgf8 spielt eine

Rolle in der Spezifizierung der 5-HT Neurone in r1 (Ye et al., 1998, Hynes und Rosenthal, 1999)) nachgewiesen. Außerdem wurden die Marker *Islet1* und *DBH* verwendet. *Islet1* ist in den Motoneuronen der Hirnnervenkerne exprimiert und Dopamin-Beta-Hydroxylase (*DBH*) kennzeichnet die noradrenergen Neurone u.a. des Locus Coeruleus (LC), der in r1 entsteht. Die *ISHs* wurden bei E13.5 durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt diese Populationen bereits vollständig ausdifferenziert sind. Auch hier zeigt sich keine Veränderung, womit bestätigt wird, dass keine histologischen Veränderungen der MHR in der Mutante stattgefunden haben (Abb. 24).

Daher besitzt der *Fgfr2* alleine keinen Einfluss auf die Spezifizierung dieser Populationen.

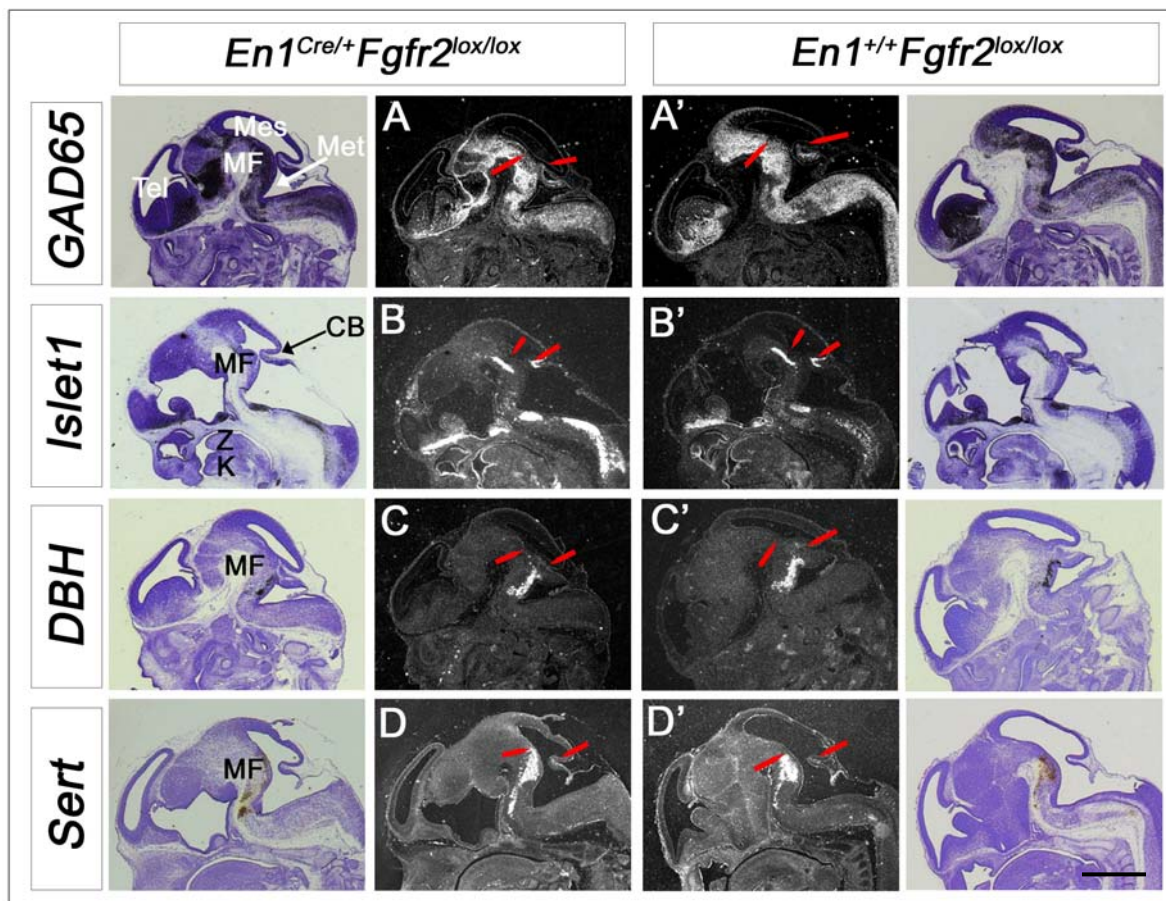


Abb. 24: Neuronale Subpopulationen sind in der *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. Mit radioaktiven *ISH* mit Proben gegen *GAD65* (A,A'), *Islet1* (B,B'), *DBH* (C,C') und *Sert* (D,D') wurden die GABAergen Neurone, die sich entwickelnden Motoneuronen der Hirnnervenkerne, die noradrenergen Neurone des Locus coeruleus und die serotonergen

Neurone an sagittalen Schnitten von E13.5 Mutanten und Kontroll-Maushirnen detektiert. **(A,B,C,D)** zeigen die Mutante, **(A',B',C',D')** zeigen die Kontrolle. Links zu der Dunkelfeldaufnahme der Mutante befindet sich die Hellfeldaufnahme des sagittal geschnittenen Embryos. Rechts zu der Dunkelfeldaufnahme des Kontrollembryos befindet sich die Hellfeldaufnahme. Vergleicht man die Kontrollen **(A,B,C,D)** jeweils mit den Mutanten **(A',B',C',D')**, so erkennt man keine Unterschiede in der Lage oder Größe der jeweiligen Populationen in der MHR. Rote Pfeile markieren die MHG dorsal und ventral. CB: Cerebellare Anlage, K: Kiefer, Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, MF: mesencephale Flexur, Tel: Telencephalon, Z: Zunge;. Der Maßstab beträgt 500 µm.

4.1.3.3 Untersuchung des Expressionsmusters von Genen, die während der Differenzierung von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert werden

Die dopaminergen Neurone (DA Neurone) des Mittelhirns wurden ausführlicher untersucht, da sie im ventralen Mittelhirn entstehen und *Fgf8* für ihre Induktion benötigt wird (Ye et al., 1998). Es wurden unterschiedliche Marker untersucht, da bedingt durch den Verlust des *Fgfr2*, entweder ein bestimmter Signalweg verändert, oder eine Subpopulation von DA Neuronen betroffen sein könnte. Es wurden sowohl der terminale Marker *DAT* (Dopamin-Transporter) als auch Marker, die während der frühen Entwicklung der dopaminergen Neurone exprimiert werden und für deren Differenzierung wichtig sind, untersucht. Dadurch lassen sich auch transiente Veränderungen in der Genexpression und damit im Differenzierungsprozeß der DA Neurone feststellen. *ALDH1A1* stellt den frühesten Marker für Vorläufer von mesencephalen DA Neuronen dar. *ALDH1A1* Expression beginnt bei E9 in der mesencephalen Flexur. Der Marker *Nr4a2*, dessen Expression bei E10 beginnt, ist nicht exklusiv in Vorläufern von DA Neuronen exprimiert, markiert jedoch bei E13.5 alle dopaminergen Vorläuferzellen des Mesencephalons. *Pitx3* und *Lmx1b* markieren Subpopulationen von Vorläuferzellen der mesencephalen DA Neurone (Smidt et al., 2000, Maxwell et al., 2005). *TH*, als erster Marker für differenzierte catecholaminerge Neurone (im ventralen Mittelhirn sind dies ausschließlich die dopaminergen) ist im ventralen Mesencephalon detektierbar. *DAT* markiert terminal ausdifferenzierte DA Neurone. Dieser Marker ist ab E12.5 detektierbar.

ALDH1A1 wurde bei E10.5 untersucht, die anderen Marker wurden bei E13.5 untersucht, da sie in diesem Embryonalstadium alle exprimiert sind und somit verglichen werden können. Keiner der verwendeten Marker zeigte jedoch eine Veränderung seiner Expression (Abb. 25).

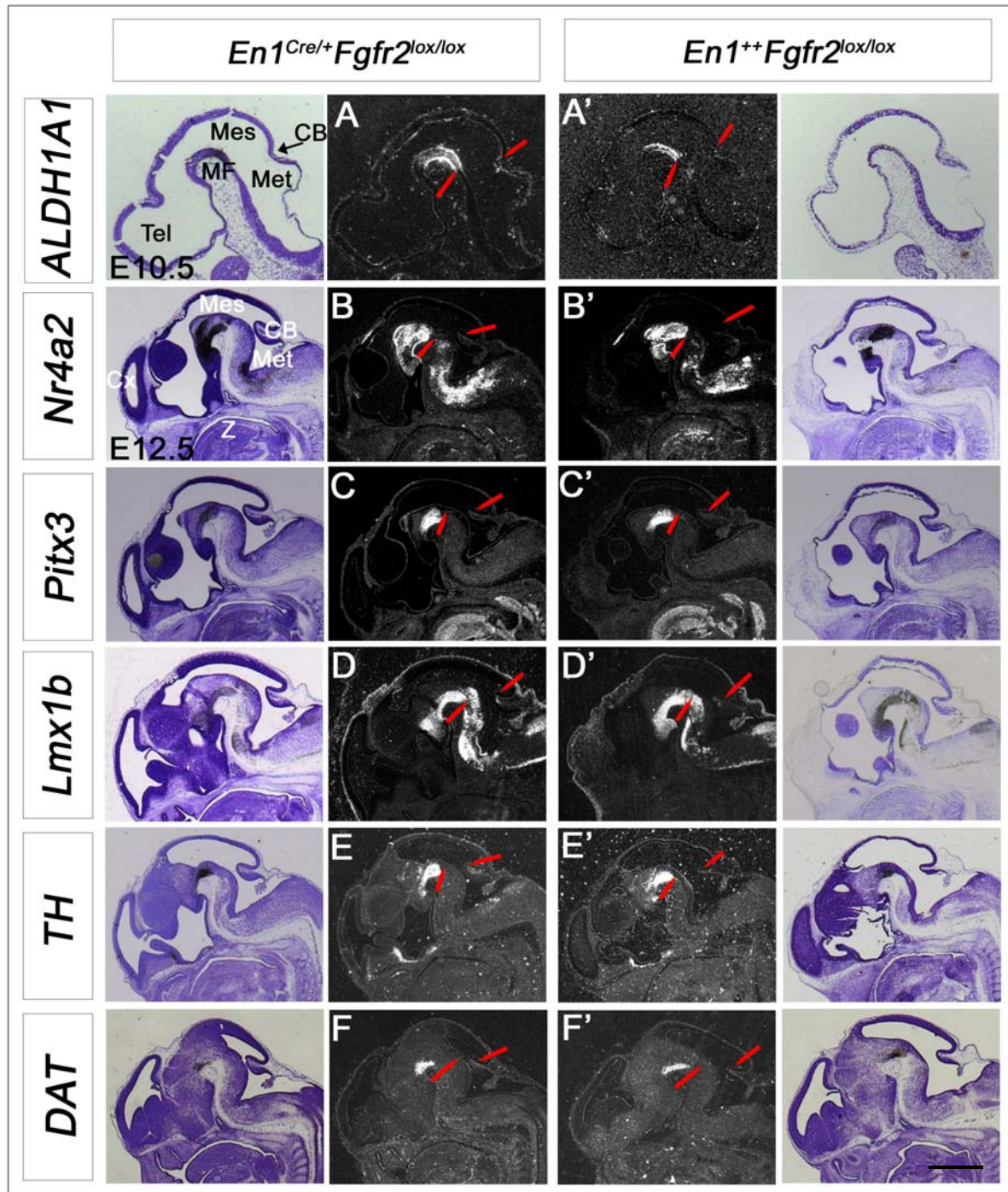


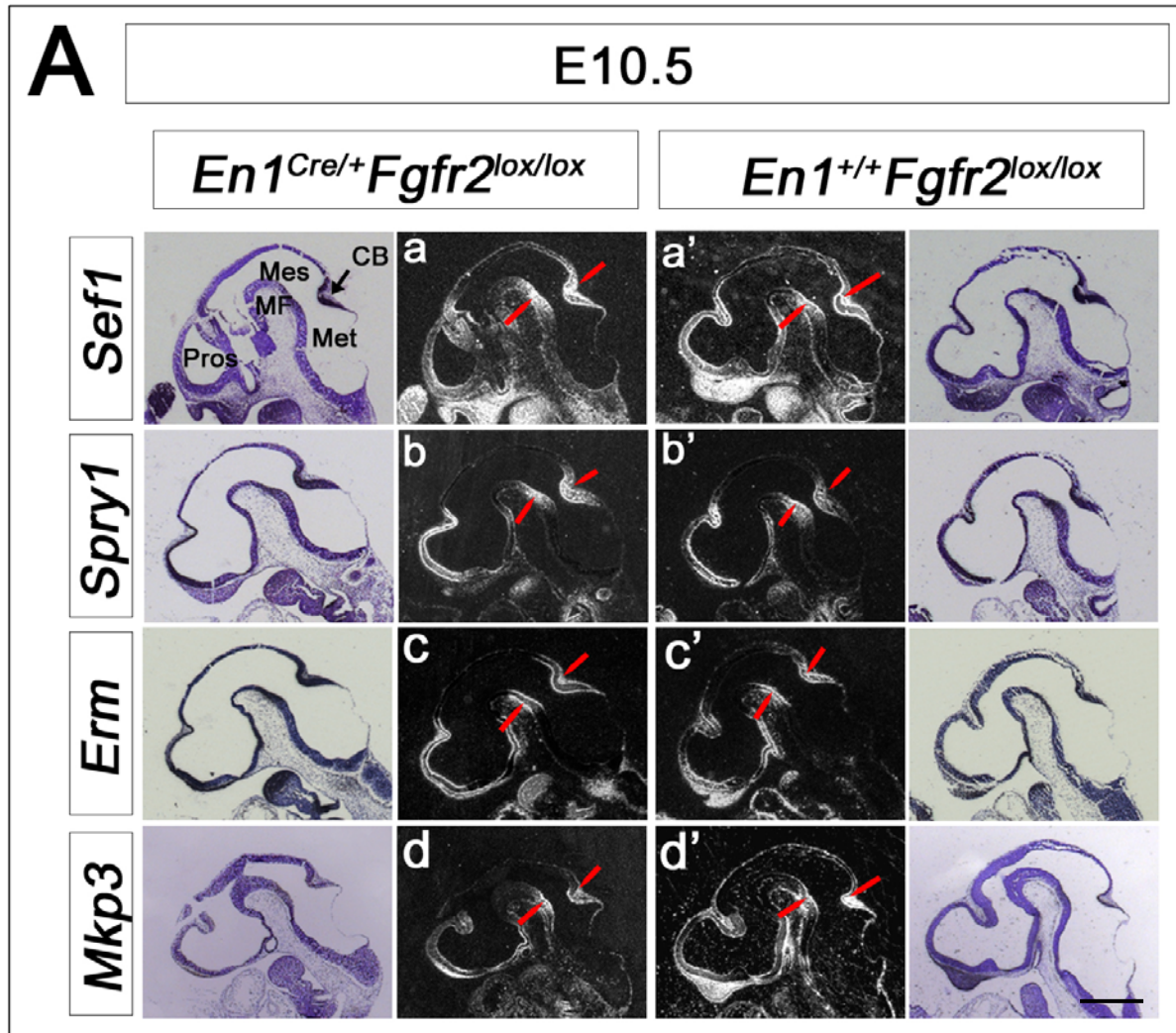
Abb. 25: Die Expression von Markern während der Entwicklung der dopaminergen Neurone ist in der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. Radioaktive *ISHs* wurden mit

der Probe gegen *ALDH1A1* (**A,A'**) an sagittalen Schnitten eines E10.5 Mutanten und Kontroll-Mausembryos und mit den Proben *Nr4a2* (**B,B'**), *Pitx3* (**C,C'**), *Lmx1b* (**D,D'**), *TH* (**E, E'**) und *DAT* (**F,F'**) an sagittalen Schnitten von E13.5 Mutanten und Kontroll-Mausembryonen durchgeführt. (**A,B,C,D,E**) zeigen die Mutante, (**A',B',C',D',E'**) zeigen die Kontrolle. Links von der Dunkelfeldaufnahme der Mutante bzw. rechts zu der Dunkelfeldaufnahme der Kontrolle befindet sich die Hellfeldaufnahme. Es zeigt sich keine Veränderung der Marker-Expression im ventralen Mittelhirn in den mutanten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Rote Pfeile markieren die dorsale und ventrale MHG. CB: cerebellare Anlage, Cx: Cortex, Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, MF: mesencephale Flexur, Rhomb: Rhombencephalon, Tel: Telencephalon, Z: Zunge. Der Maßstab beträgt 500 μm .

4.1.3.4 Untersuchung des intrazellulären Fgf Signaltransduktionsweges in den *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Mäusen

Trotz des Verlustes des *Fgfr2* habe ich keine Veränderung der Genexpression in der MHR feststellen können. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass auf transkriptioneller Ebene andere Bestandteile des Fgf Signalweges in der MHR, beginnend bei den Liganden, über andere Fgfrs bis hin zu intrazellulären Molekülen des Fgf Signaltransduktionsweges aufgrund des Fehlens des *Fgfr2* kompensatorisch verändert sind. Es wurde daher die Expression der in der MHR exprimierten *Fgfr2* Liganden *Fgf8*, *Fgf15*, *Fgf17* und *Fgf18*, der beiden ebenfalls in der MHR exprimierten Fgfrs (*Fgfr1* und *Fgfr3*) sowie die Expression einiger Zielgene des Fgf Signaltransduktionsweges untersucht.

Spry1, *Sef1* und *Mkp3* sind als negative feedback Modulatoren der Fgf Signaltransduktion bekannt, und werden durch *Fgf8* direkt aktiviert. *Erm* ist ebenfalls ein direktes Zielgen des Fgf Signalweges. Die Expression aller dieser Gene wurde bei den für die Fgf Signatransduktion wichtigen Embryonalstadien E10.5 und E12.5 untersucht. Es fanden sich jedoch für diese Faktoren keine Veränderungen in der Expression (Abb. 26, 27, 28).



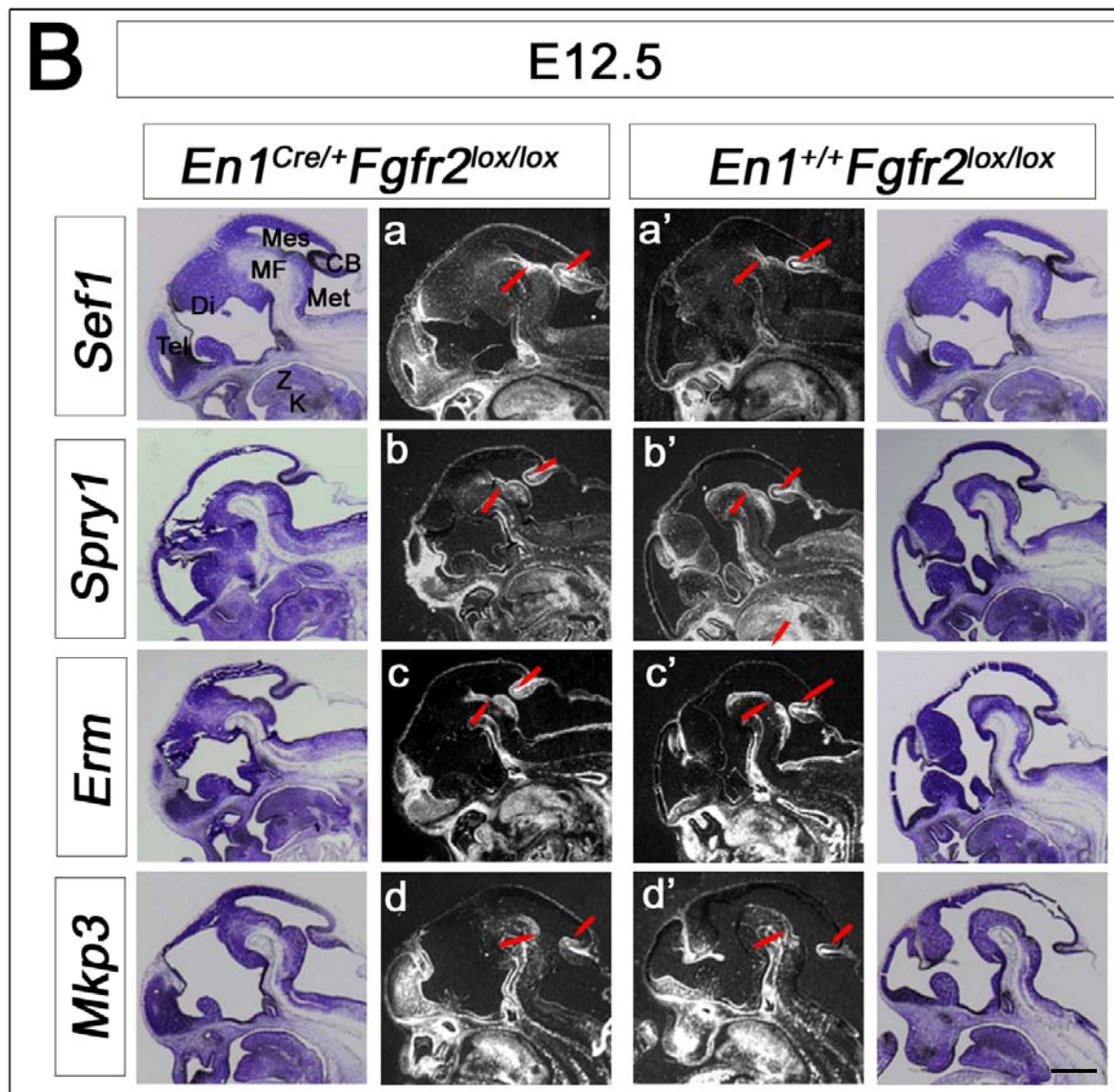


Abb. 26: Die Expression von Fgf8 Zielgenen ist in der *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. (A) Eine radioaktive ISH mit Proben gegen *Sef1* (a,a'), *Spry1* (b,b'), *Erm* (c,c') und *Mkp3* (d,d') wurde an sagittalen Schnitten von E10.5 Mutanten und Kontroll-Mausembryonen durchgeführt. (B) stellt die Expressionsmuster der Gene *Sef1* (A,A'), *Spry1* (B,B'), *Erm* (C,C') und *Mkp3* (D,D') auf sagittalen Schnitten von E12.5 Mutanten und Kontroll- Mausembryos dar. Links von der Dunkelfeldaufnahme der Mutante bzw. rechts von der Dunkelfeldaufnahme der Kontrolle befindet sich die Hellfeldaufnahme. Die Expression aller Gene umfasst den ventralen und auch den dorsalen Bereich der MHG. Es zeigt sich keine Veränderung der Marker-Expression bei E10.5 und E12.5 in den mutanten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Rote Pfeile markieren die MHG ventral und dorsal. CB: Cerebellare Anlage, Cx:Cortex, Di: Diencephalon, K: Kiefer, Mes: Mesencephalon, Met:

Metencephalon, MF: mesencephale Flexur, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, Tel: Telencephalon, Z: Zunge. Der Maßstab beträgt 500 µm.

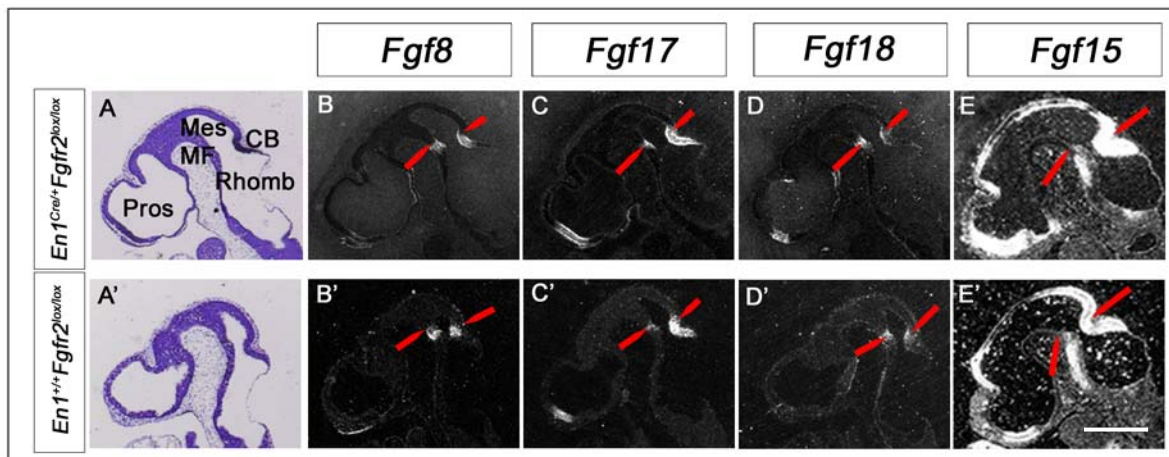


Abb. 27: Die Expression von *Fgf8*, *Fgf17*, *Fgf18* und *Fgf15* ist in der *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. Eine radioaktive ISH mit Proben gegen *Fgf8* (B,B'), *Fgf17* (C,C'), *Fgf18* (D,D'), und *Fgf15* (E,E') wurde an sagittalen, konsekutiven Schnitten von E10.5 Mutanten und Kontroll-Mausembryonen durchgeführt. Die obere Reihe stellt die Expression in der Mutante dar, die untere Reihe im Kontrolltier. (A,A') stellen Hellfeldaufnahmen zu (B,B') dar. (E) bzw. (E') sind vergleichbare Schnitte eines anderen Embryos. Von *Fgf8*, 17 und 18 ist bekannt, dass sie in der Basalplatte, Flügelplatte und Deckplatte an der MHG exprimiert sind (*Fgf17* und 18 sind im Gegensatz zu *Fgf8* auch im posterioren Mittelhirn exprimiert), *Fgf15* kommt in der Flügelplatte an der MHG vor. Die Expressionsmuster der Fgfs sind in den Mutanten im Vergleich zum Kontrolltier nicht verändert. Rote Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. CB: Cerebellare Anlage, Mes: Mesencephalon, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon. Der Maßstab beträgt 500 µm.

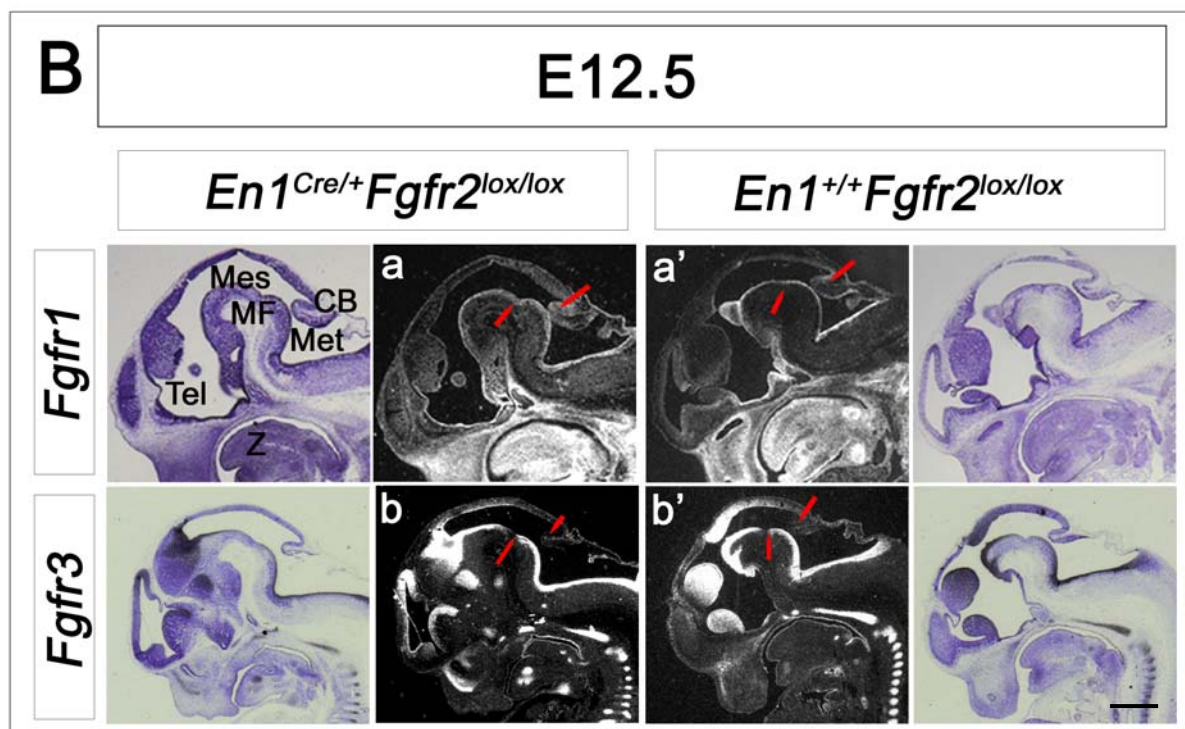
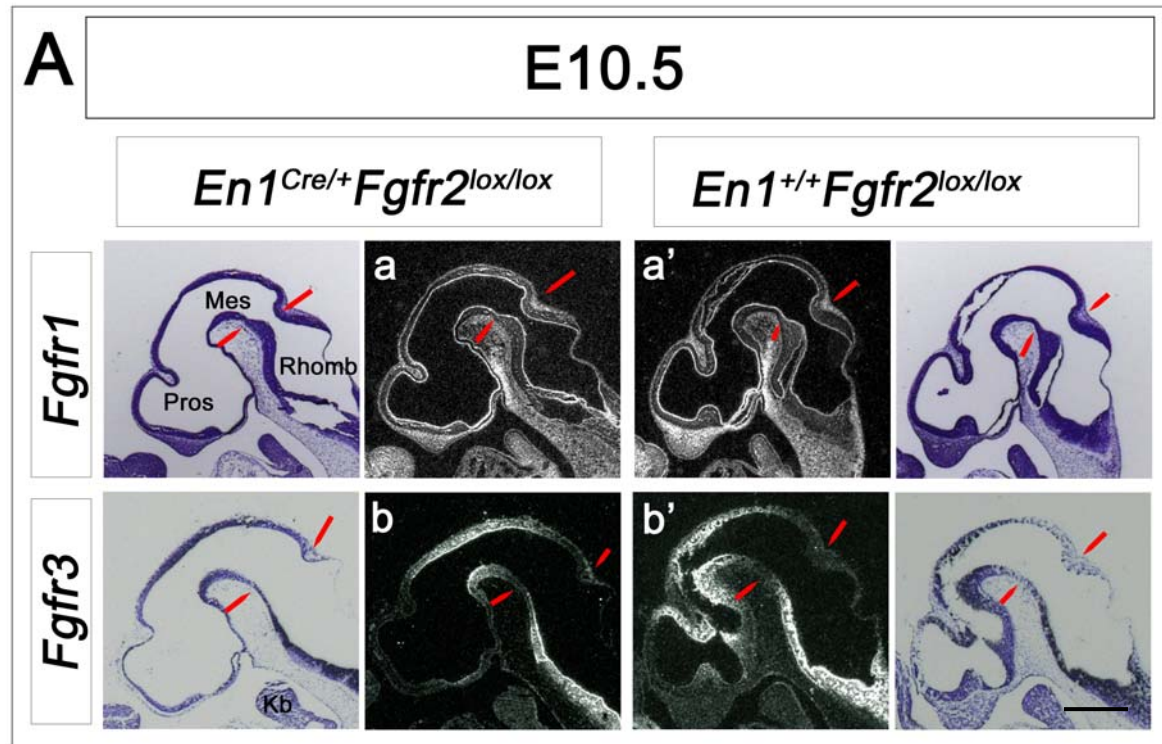


Abb. 28: Die Expression der beiden Fgfrs *Fgfr1* und *Fgfr3* ist in der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Maus bei E10.5 und E12.5 nicht verändert. (A) Eine radioaktive *ISH* mit Proben gegen den *Fgfr1* (a,a') und den *Fgfr3* (b,b') wurde an sagitalen Schnitten von E10.5 Mutanten und

Kontroll- Mausembryos durchgeführt. **(B)** stellt die Expressionsmuster der Gene *Fgfr1* (**a,a'**) und *Fgfr3* (**b,b'**) auf sagittalen Schnitten von E12.5 Mutanten und Kontroll- Mausembryos dar. Die obere Reihe stellt dabei jeweils die Expression in der Mutante dar, die untere Reihe zeigt die Expression im Kontrolltier. Links von der Dunkelfeldaufnahme der Mutante bzw. rechts von der Dunkelfeldaufnahme der Kontrolle befindet sich die Hellfeldaufnahme. Die Expression der beiden *Fgfrs* in der Mutante entspricht der Expression in der MHR der Kontrolle bei E10.5 und bei E12.5. Rote Linien markieren die MHG. CB: Cerebellare Anlage, Di: Diencephalon, Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, Tel: Telencephalon, Z: Zunge. Der Maßstab beträgt 500 µm.

Fasst man die Analyse der Embryonalstadien zusammen, kann man sagen, dass der *Fgfr2* alleine nicht notwendig für die Umsetzung der Musterbildungsfunktion von Fgf8 in der MHG ist, da die Musterbildungsgene entlang der A/P und D/V Achsen des Neuralrohrs nicht verändert sind. Die zelluläre Integrität des ventralen Mittelhirns ist gewahrt und auch neuronale Subpopulationen der MHR sind durch das Fehlen des *Fgfr2* nicht beeinflusst. Damit spielt der *Fgfr2* alleine auch keine spezifische Rolle in der Entwicklung dieser Populationen.

4.1.3.5 Untersuchung der Ko-Expression der Cre Rekombinase und des *Fgfr2* im adulten Maushirn

Obwohl ich keine notwendige Funktion des *Fgfr2* während der frühen Embryonalentwicklung an der MHR habe feststellen können, ist es dennoch möglich, dass der auch im adulten Gehirn exprimierte *Fgfr2* eine „späte“ Funktion in der Aufrechterhaltung bestimmter Zellpopulationen der MHR im adulten Tier oder während der späten Embryogenese hat.

Anhand des Vergleichs der Expression des *Fgfr2* im adulten Hirn und der Aktivität der Cre Rekombinase, die alle Zellen markiert, in denen je *En1* exprimiert wurde, lässt sich bestimmen, in welchen Regionen eine Aufrechterhaltungsfunktion von Gewebe durch den *Fgfr2* während der späten Embryogenese oder/und im adulten Tier zu erwarten wäre. Dazu wurde eine β-Gal Färbung an adulten Hirnschnitten durchgeführt. Diese stammten von Tieren aus einer Verpaarung zwischen einer *R26R*-Reporter Maus und einer *En1^{Cre/+}* Maus (Abb. 29). Der β-Gal Färbung gegenübergestellt wurde die Expression des *Fgfr2* im adulten Maushirn (radioaktive

ISH). Expression des *Fgfr2* konnte ubiquitär im ventralen Mittelhirn und Hinterhirn (Pons) und verstärkt in folgenden Regionen nachgewiesen werden: in der SN, VTA, in den Purkinjezellen des Cerebellums, und den Faserschichten der superioren Colliculi und inferioren Colliculli. Interessanterweise ist dieses Expressionsmuster im adulten Tier mit dem im Embryo insofern vergleichbar, als dass auch hier der *Fgfr2* verstärkt ventral exprimiert wird. Die Expression des *Fgfr2* deckt sich in diesen Regionen mit der β -Gal Expression im adulten Hirn und der Funktionsverlust des *Fgfr2* durch die *Cre* Rekombination könnte daher Folgen für diese Hirnstrukturen und neuronalen Subpopulationen haben.

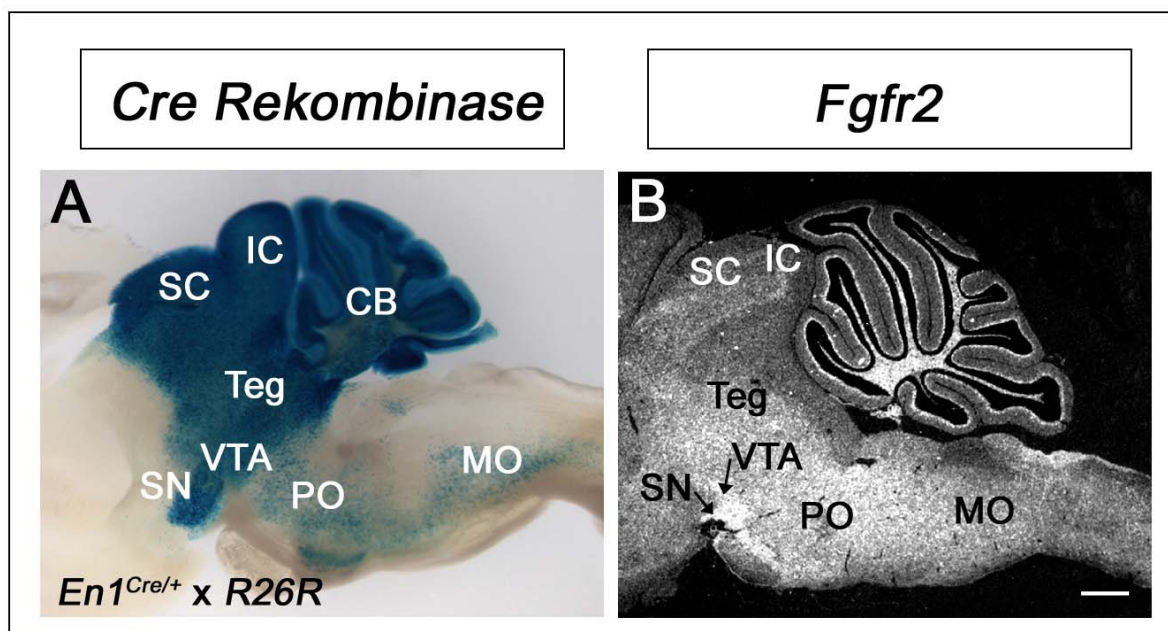


Abb. 29: Die *Fgfr2* Expression überlappt im adulten Maushirn mit Regionen, in denen die *Cre* Rekombinase aktiv ist/war. **(A)** Eine β -Gal Färbung zeigt die Regionen in denen die *Cre* Rekombinase aktiv ist bzw. war: Mittelhirn (superiore Colliculi (SC), inferiore Colliculi (IC), Tegmentum (Teg inklusive SN und VTA), Cerebellum (CB) und in ventralen Bereichen des Hinterhirns (Pons, PO) und der medulla oblongata (MO). **(B)** *ISH* mit einer Sonde gegen den *Fgfr2*: Expression ist in vereinzelt Zellen der SN, der VTA, in Kernen des Mittelhirns und ventralen Hinterhirns (Pons), in den Purkinjezellen des Cerebellums und außerdem in den Faserschichten der superioren und inferioren colliculi zu finden. In diesen Regionen überlappt die *Fgfr2* Expression mit der β -Gal Färbung. CB: Cerebellum, IC: inferiore colliculi, PO: Pons, SN: substantia nigra, SC: superiore colliculi, MO: Medulla oblongata, PO: Pons, Teg: Tegmentum, VTA: ventral tegmental area. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

4.1.3.6 Morphologische Untersuchung der adulten $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Maus

Die adulten $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Mäuse wurden zunächst einer allgemeinen morphologischen Analyse unterzogen. Es wurden die Standard-Färbungen Nissl, Parvalbumin und Cytochrom Oxidase durchgeführt. Diese erlauben eine Aussage über die histologische Integrität der Mittel-/Hinterhirn Region.

4.1.3.6.1 Nissl-Färbung

Die generelle Morphologie des mutanten Hirns ist im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die Größe des Kleinhirns, die Faltungen der Vermis als auch der Hemisphären des Kleinhirns und die Faserschichten in der Mutante zeigen keine Veränderung. Die Größe und Form der superioren und inferioren colliculi in der Mutante entspricht ebenfalls der der Kontrolltiere (Abb. 30).

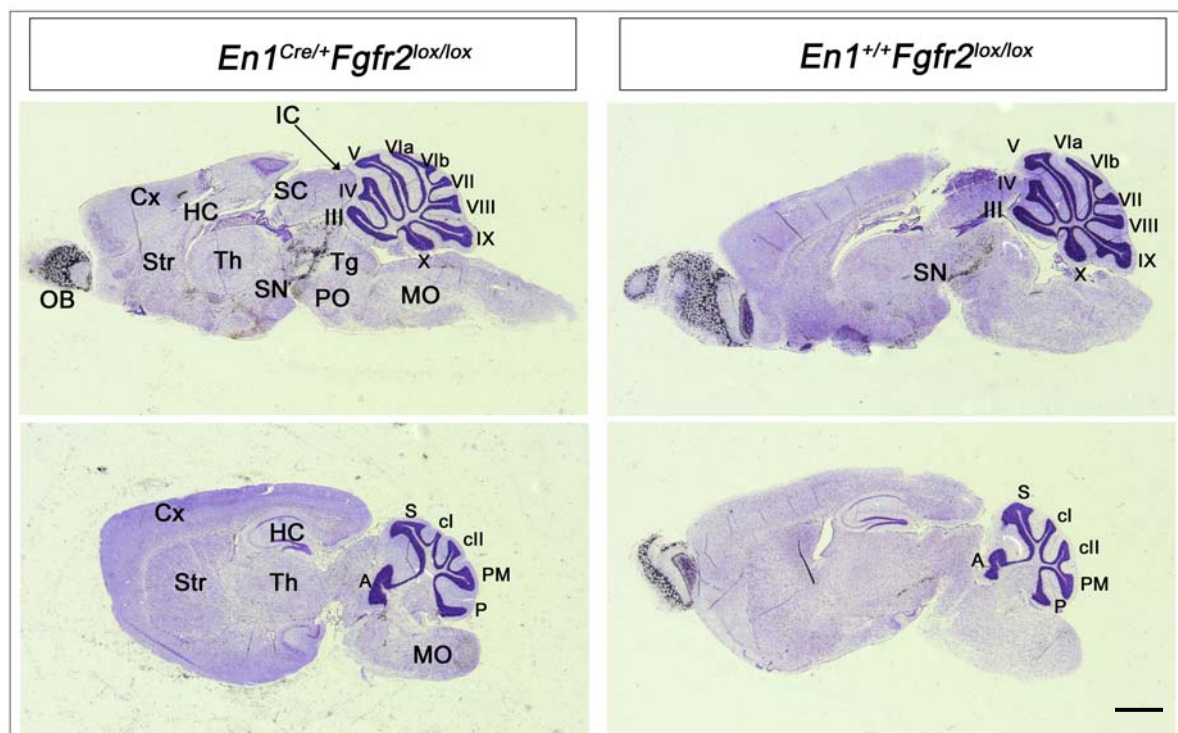


Abb. 30: Die Morphologie des adulten Hirns der $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Maus ist nicht verändert. Die linke Spalte zeigt sagittale Schnitte eines adulten Mutantenhirns dar, die rechte Seite das Kontrolltier. Die obere Reihe stellt mediale Schnitte dar, die untere laterale Schnitte durch die Hemisphären des Cerebellums. Es findet sich keine Veränderung in der

Hirnmorphologie. III-X markiert die Foliolen des Cerebellums. CB: Cerebellum, Cx: Cortex, HC: Hippokampus, IC: inferiore colliculi, MO: Medulla oblongata, OB: olfaktorischer Bulbus, Po: Pons, SC: superiore colliculi, SN: Substantia nigra, Str: Striatum, Th: Thalamus, Tg: Tegmentum, CB-Hemisphären: A: anterior lobe, S: simplex, cl, cll: crus 1 bzw. 2, PM: paramedian lobule, P: pyramidis. Der Maßstab beträgt 500 μm .

4.1.3.7 Färbung des kalzium-bindenden Proteins Parvalbumin

Durch die Immunfärbung des kalziumbindenden Proteins Parvalbumin kann die histologische Integrität der adulten MHR überprüft werden. Hiermit können z.B. der regionale Aufbau der IC's, die Schichtung des Cerebellums (spezifische Anfärbung der Purkinje-Zellen) und das Vorhandensein des dritten und vierten Hirnnervenkerns dargestellt werden. Abb. 31 zeigt keine Veränderungen der histologischen Integrität der MHR. Insbesondere sind auch die Purkinjezellen des Cerebellums, die den *Fgfr2* besonders stark exprimieren, nicht verändert. Diese Färbung bestätigt somit die Ergebnisse der Nissl-Färbung.

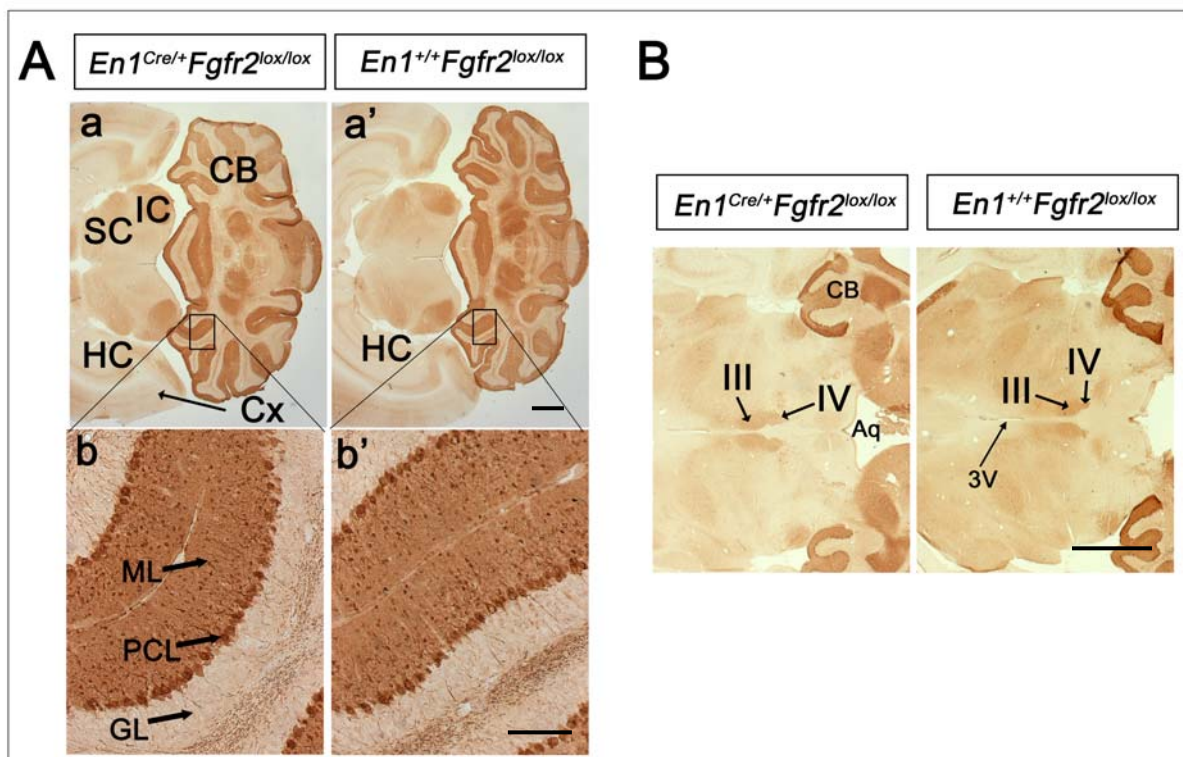


Abb. 31: A: Die Schichtung des Cerebellums der *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus ist nicht verändert. (B) Der dritte und vierte Hirnnerv sind vorhanden und unverändert in ihrer

Lage und Größe. (A) Links ist die Mutante dargestellt, rechts die Kontrolle. **(b)** und **(b')** stellen Vergrößerungen der markierten Region in **(a)** bzw. **(a')** dar. Man erkennt dass die grobe Morphologie des Cerebellums in der Mutanten unverändert ist **(a,a')**, die Schichtung des Cerebellums ist ebenfalls nicht verändert **(b,b')**. **(B)** Links ist die Mutante, rechts die Kontrolle zu sehen. Schwarze Pfeile markieren den 3ten und 4ten Hirnnerv. 3V: dritter Ventrikel, Aq: Aqueduct, CB: Cerebellum, Cx: Cortex, GL: Granular cell layer, HC: Hippokampus, IC: inferiore colliculi, ML: molecular layer, PCL: Purkinje cell layer, SC: superiore colliculi. Der Maßstab in **(A)** beträgt 500 µm, in **(B)** 50 µm.

4.1.3.8 Cytochrom Oxidase Färbung

Es konnte gezeigt werden, dass Fgfs eine neurotrophe Funktion im adulten Gehirn haben (Engele und Bohn, 1991, Grothe et al., 2000, Ohmachi et al., 2003). Diese könnte in den Bereichen in denen der *Fgfr2* deletiert wurde, gestört sein. Dadurch könnte es zu einer Veränderung neuronaler Aktivität in der MHR kommen. Die Cytochrom Oxidase (CytOx) ist das letzte Enzym in der zellulären Atmungskette und oxidiert Cytochrom C. Durch die Verwendung von Cytochrom C als Substrat einer histochemischen Färbung kann die Aktivität der zelleigenen CytOx festgestellt werden. Man korreliert die gefärbten Bereiche des ZNS mit allgemeiner neuronaler Aktivität. Es wurde jedoch keine Veränderung in der CytOx Färbung im adulten Gehirn festgestellt (Abb. 32).

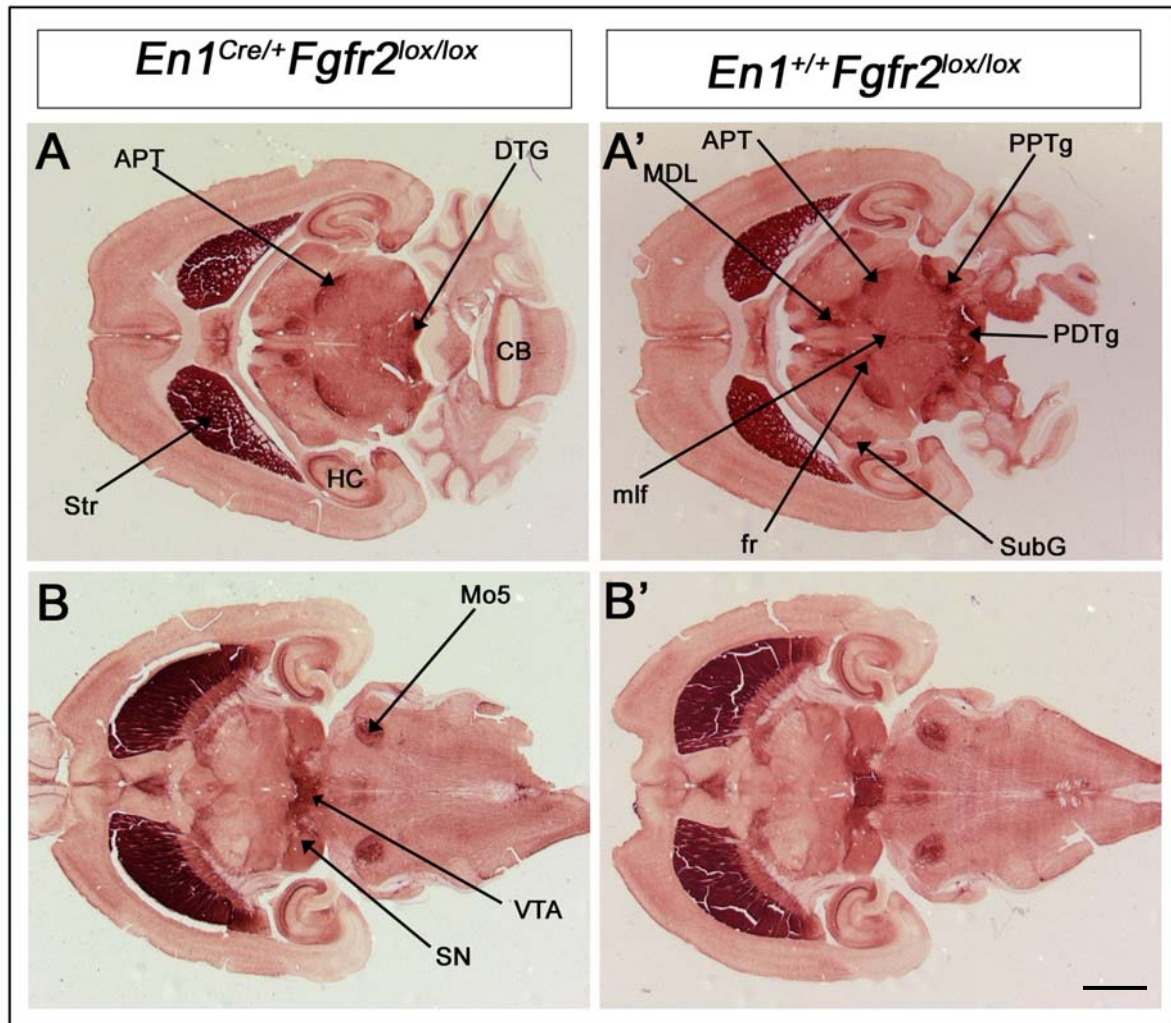


Abb. 32: Die generelle Aktivität von Neuronen im adulten Gehirn der $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Maus ist nicht verändert. Die linke Spalte zeigt Schnitte des adulten Gehirns einer mutanten Maus, die rechte Spalte einer Kontroll-Maus, auf denen die CytOx angefärbt wurde. **(A,A')** sind dorsale Schnitte auf der Ebene des Cerebellums. Die Schnitte befinden sich nicht exakt auf derselben Höhe. **(B,B')** sind ventrale Schnitte auf Höhe der SN. Man erkennt in den dunklen Bereichen, die Regionen hoher neuronaler Aktivität kennzeichnen, keine Veränderung zwischen Mutante und Kontrolle. APT: anterior pretecal nucleus, DTg: dorsal tegmental nucleus, fr: fasciculus retroflexus, Mo5: trigeminal motor nucleus, MDL: mediodorsal thalamic nucleus, mlf: medial longitudinal fasciculus, lateral part; PDTg: posterodorsal tegmental nucleus; PPTg: pedunclopontine tegmental nucleus; SubG: subgeniculate nucleus; VTA: ventral tegmental area. Der Maßstab beträgt 500 μm .

4.1.3.9 Untersuchung der Neurotransmittersysteme der adulten $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Maus

Nachdem ich untersucht hatte, ob der *Fgfr2* eine Funktion in der Aufrechterhaltung der gesamten MHR hat, wendete ich mich der Untersuchung spezieller Neuronenpopulationen zu. Eine Funktion des *Fgfr2* in der Entstehung von Motoneuronen, GABAergen, noradrenergen, serotonergen und dopaminergen Neuronen konnte durch die Analyse der unterschiedlichen Marker während ihrer Entwicklung (s. Abb. 24, 25) bereits ausgeschlossen werden. Um eine Funktion des *Fgfr2* in der Aufrechterhaltung einiger dieser Neuronenpopulationen sowie des cholinergen Systems im ventralen Mittelhirn der adulten $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Mutante zu bestimmen, untersuchte ich die Expression terminaler Differenzierungsmarker dieser Neuronenpopulationen in der adulten Mutante. Die Hirnnervenkerne der MHR (Motoneurone) wurden bereits unter 4.1.3.7 untersucht.

4.1.3.9.1 Untersuchung des GABAergen Systems

Einen wichtigen Neurotransmitter im Gehirn stellt die γ -Amino-Buttersäure (GABA) dar. GABA wirkt vorwiegend inhibitorisch in sog. Interneuronen. Da der terminale Marker *GAD65* recht ubiquitär in der MHR exprimiert wird, würde keine Veränderung in der Expression auf die histologische Integrität der MHR hinweisen. Tatsächlich was das GABAerge System in der mutanten Maus unverändert (Abb. 33).

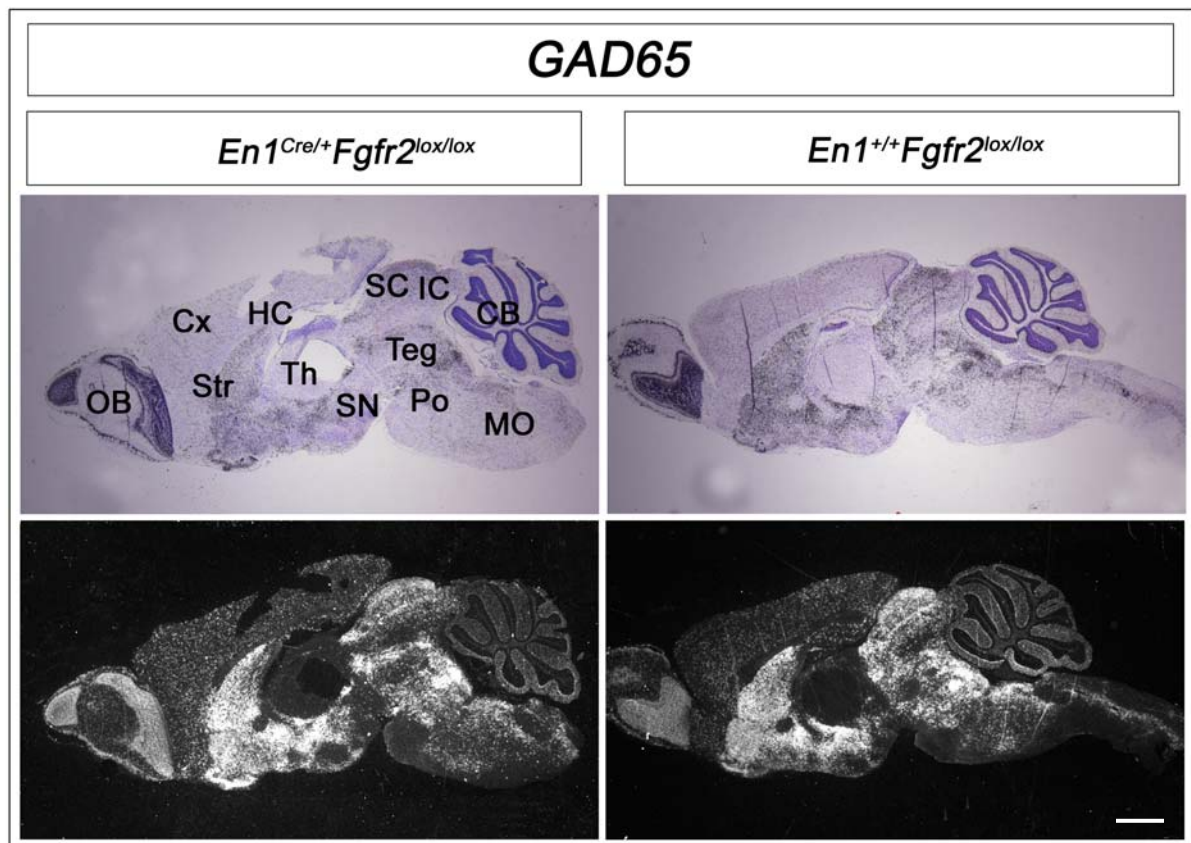


Abb. 33: Das GABAerge System ist in der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. Eine ISH wurde mit der antisense Probe gegen das GABA synthetisierende Enzym *GAD65* durchgeführt. Die linke Spalte zeigt die mutante Maus, die rechte Spalte die Kontroll-Maus. Oben ist jeweils das Hellfeldbild zu der darunter liegenden Dunkelfeldaufnahme gezeigt. Es lässt sich keine Veränderung in der Verteilung von *GAD65* erkennen. CB: Cerebellum, Cx: Cortex, HC: Hippokampus, IC: inferiore colliculi, MO: Medulla oblongata, OB: olfaktorischer Bulbus, Po: Pons, SC: superiore colliculi, SN: Substantia nigra, Str: Striatum, Teg: Tegmentum, Th: Thalamus. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

4.1.3.9.2 Untersuchung des serotonergen Systems

Durch *ISH* mit einer antisense RNA-Probe für den Serotonin-Transporter *Sert* wurde seine Expression und damit das Vorhandensein und die Lage der serotonergen Neurone in der adulten Maus bestimmt. Diese waren in der mutanten Maus jedoch unverändert (Abb. 34).

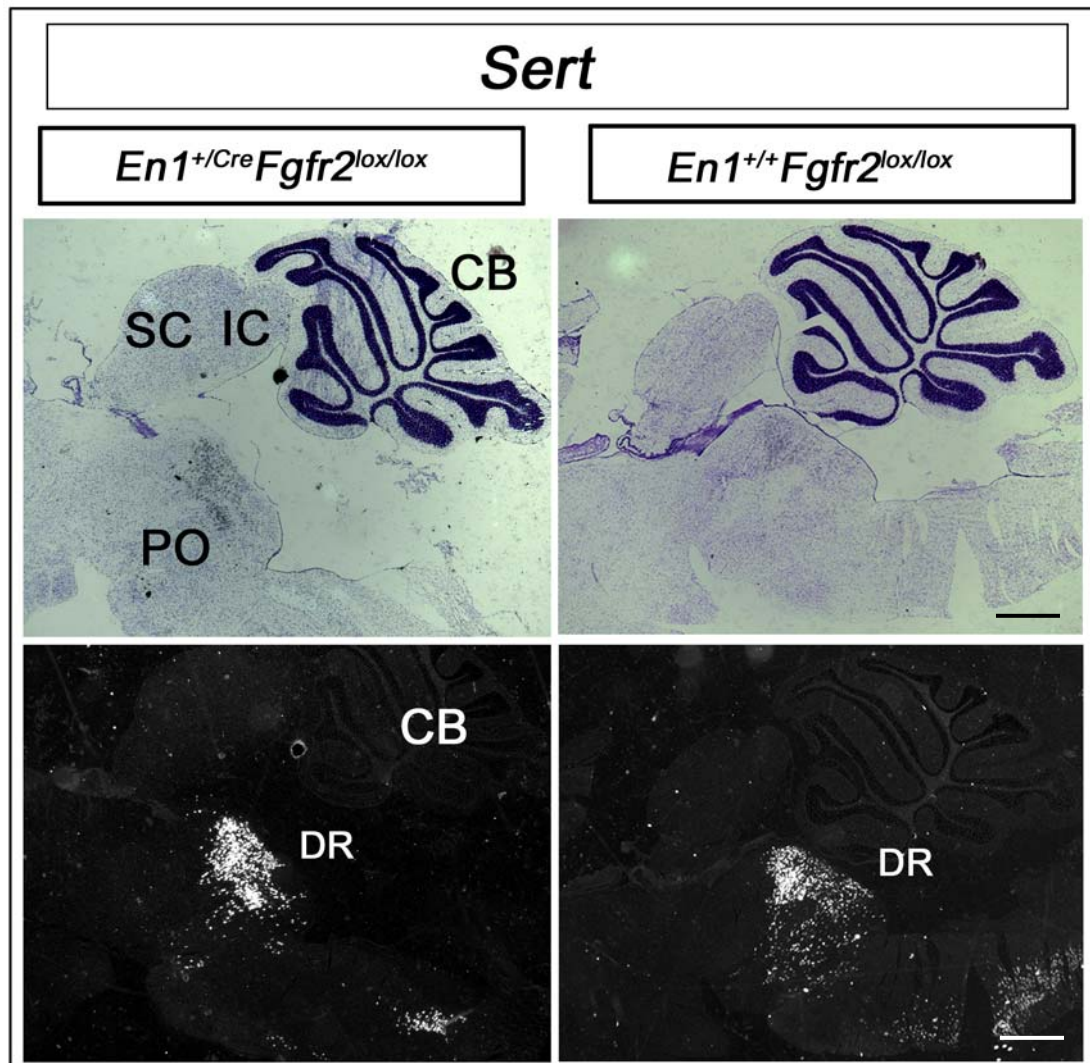


Abb. 34: Das serotonerge System ist in der $En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}$ Maus nicht verändert. Die serotonergen Neurone der dorsalen Raphe Nuclei (DR) der Maus entstehen im ventralen Hinterhirn, wandern jedoch während der späten Embryogenese auch ins Mittelhirn hinein. Die dorsalen Raphe Nuclei, die beidseitig im Gehirn gelegen sind, sind in der Mutante (links) im Vergleich zur Kontrolle (rechts) nicht verändert. CB: Cerebellum, DR: dorsale Raphe Nuclei. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

4.1.3.9.3 Untersuchung des dopaminergen Systems

Um eine Funktion des *Fgfr2* in der Aufrechterhaltung der dopaminergen Neurone im ventralen Mittelhirn zu untersuchen, wurde diese Population in der adulten Mutante untersucht. Es wurde sowohl eine immuno-histochemische Färbung des Dopamin Transporters *DAT* an Kryo-Schnitten, als auch eine *ISH* mit der RNA-Probe für die

Tyrosin Hydroxylase (*TH*) an Paraffinschnitten durchgeführt. Es ergab sich keine Veränderung der Lage der Neurone (Abb. 35), und es gab auch keinen Hinweis auf eine Veränderung der Anzahl der Neurone.

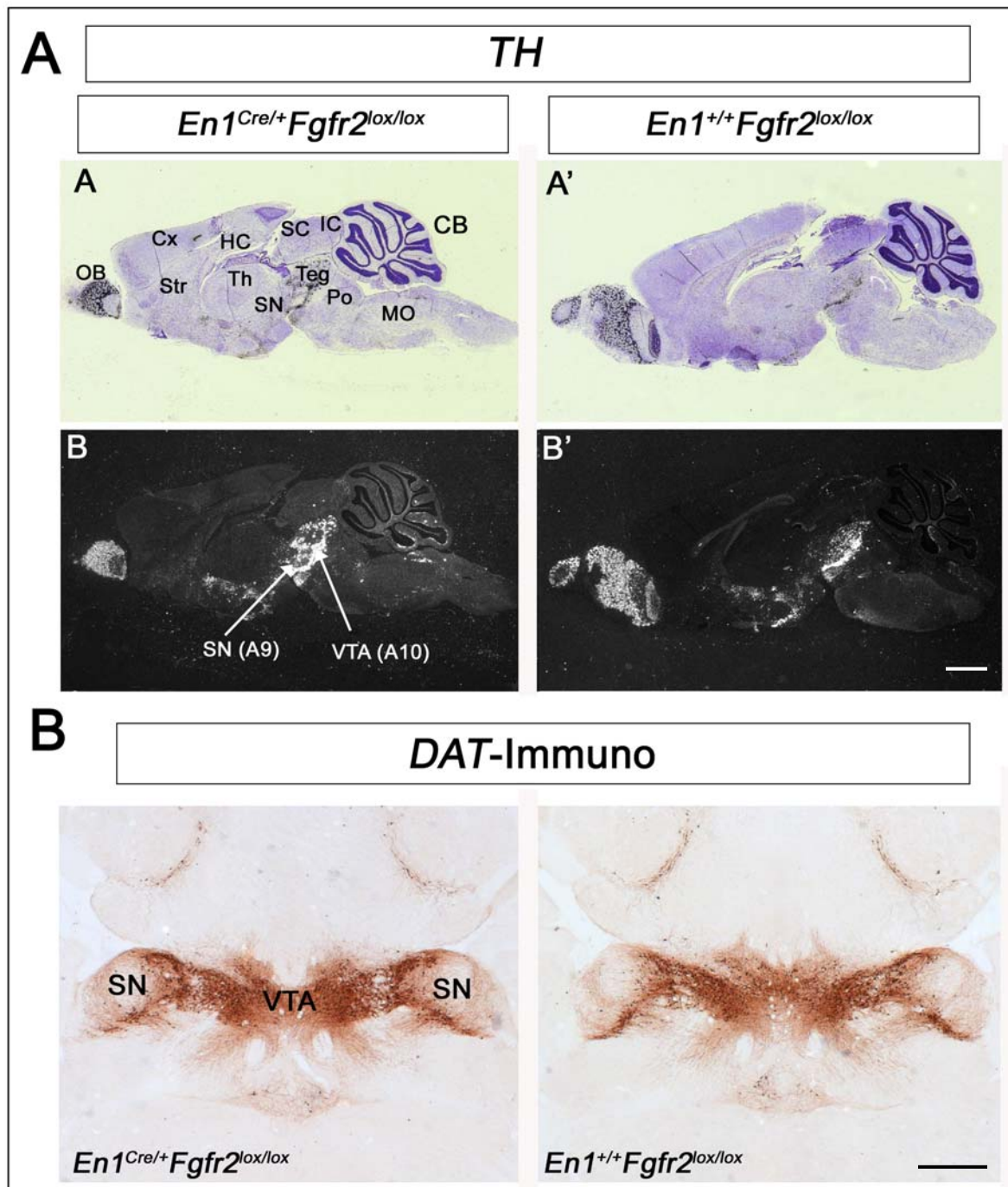


Abb. 35: Das dopaminerge System ist in der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. Links ist jeweils die Mutante, rechts die Kontrolle dargestellt. **A:** Es handelt sich um medio-Sagittalschnitte, auf denen eine *ISH* mit der Sonde gegen *TH* durchgeführt wurde. Man

erkennt die dopaminergen Neuronengruppen des ventralen Mittelhirns (A9 (SN) und A10 (VTA)). Diese sind im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert (**B,B'**). **B**: Die Immunohistochemische (Immuno) Färbung des Dopamin-Transporters (DAT) auf Schnitten eines Mutantenhirns (links) und einer Kontrolle (rechts) zeigt ebenfalls keine Veränderung in der Lage und Anzahl der DA Neurone. CB: Cerebellum, Cx: Cortex, HC: Hippokampus, IC: inferiore colliculi, MO: Medulla oblongata, OB: olfaktorischer Bulbus, Po: Pons, SC: superiore colliculi, SN: Substantia nigra, Str: Striatum, Teg: Tegmentum, Th: Thalamus, VTA: ventral tegmental area. Der Maßstab beträgt 500 µm.

4.1.3.9.4 Untersuchung des cholinergen Systems

Acetylcholin ist ebenfalls ein wichtiger Neurotransmitter im ZNS. Durch die histochemische Färbung des Enzymes Acetylcholinesterase lassen sich Regionen im Maushirn anfärben, in denen Acetylcholin als Botenstoff ausgeschüttet wird. Ergänzt wurde die Färbung durch die *ISH* mit der Probe gegen den vesikulären Acetylcholin Transporter (VACHT) (Roghani et al., 1994). Dieser markiert die Zellen, die Acetylcholin als Botenstoff verwenden. Von besonderem Interesse waren die cholinergen Zellen in den tegmental Nuclei, im posterodorsalen tegmental Nucleus (PPTg) sowie im dritten und vierten Hirnnerv. Es ließ sich jedoch in allen Fällen keine Veränderung des cholinergen Systems in der MHR erkennen (Abb. 36).

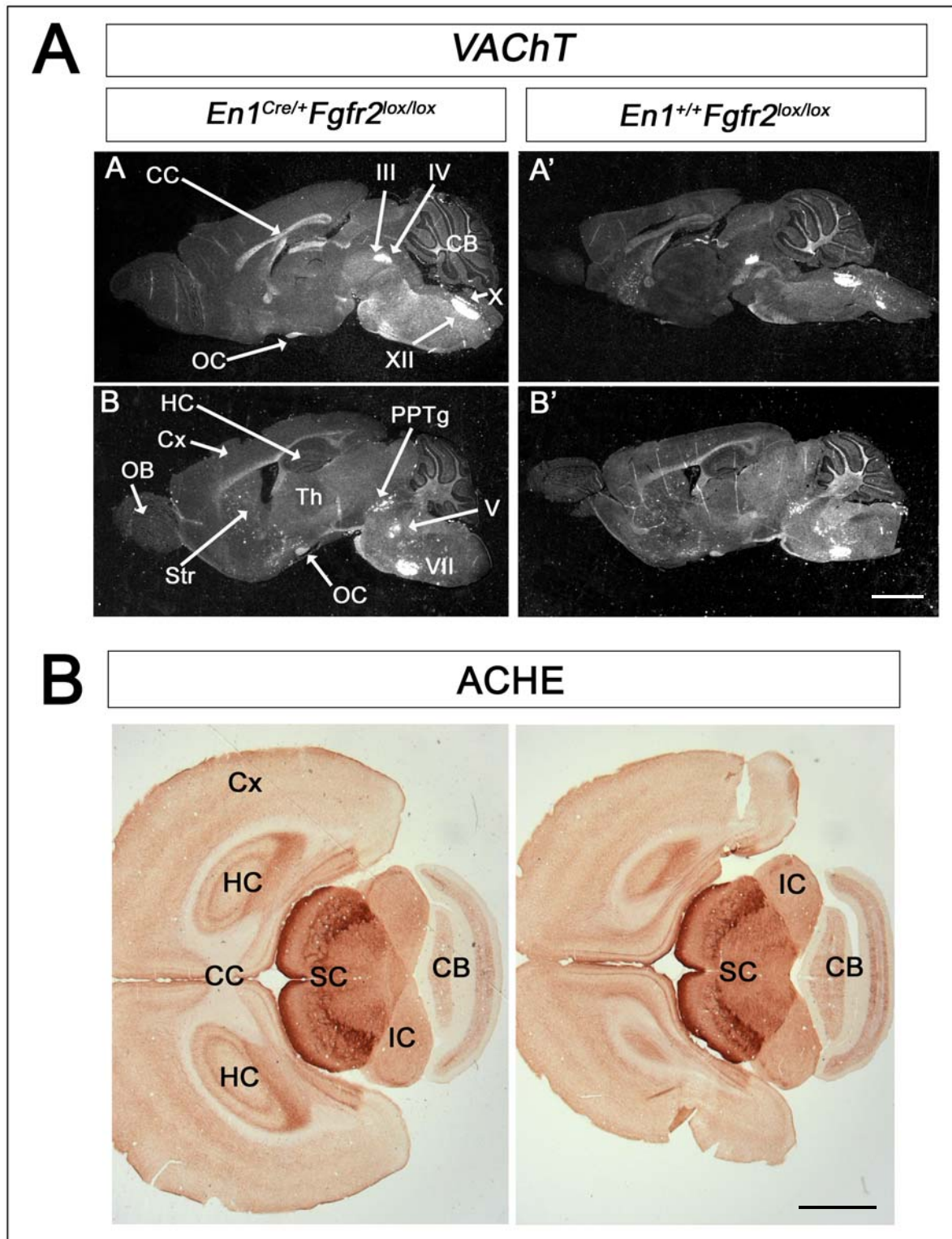


Abb. 36: Das cholinerge System ist in der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Maus nicht verändert. **A:** ISH mit einer antisense Probe gegen *VACHT*. (**A,B**) stellen die Mutante dar, (**A',B'**) die Kontrolle. Die obere Reihe stellt medio-sagittale Schnitte dar, die untere Reihe stellt laterale Schnitte dar. *VACHT* Expression ist in einigen der Hirnnerven zu erkennen (III,IV,V,VII,X,XII),

außerdem im Thalamus, in vereinzelten Zellen des Striatums und in bestimmten tegmentalenen Kernen (PPTg). In der MHR sind der dritte und vierte Hirnnerv und der PPTg nicht verändert.

B: Immunohistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen die ACHE an horizontalen Schnitten. Links ist die Mutante dargestellt, rechts die Kontrolle. Die Schichten des superioren Colliculus sind unverändert. Die Schichtung im Kontrolltier ist besser zu erkennen, da der Schnitt weiter dorsal liegt, ebenso erscheint daher der Cortex des Kontrolltieres kleiner. CC: corpus callosum, CB: Cerebellum, Cx: Cortex, HC: Hippokampus, IC: inferiore colliculi, OB: olfaktorischer Bulbus, OC: optic chiasm, PPTg: pedunculo-pontine tegmental nucleus, SC: superiore colliculi, Str: Striatum, Th: Thalamus. Der Maßstab beträgt 500 µm.

Die Untersuchung der vier Neurotransmitter Systeme (GABA, Serotonin, Dopamin, Acetylcholin) in der MHR ergab keine Veränderung in der Mutante. Man kann zusammenfassend sagen, dass die Region histologisch intakt ist, und dass das Fehlen des *Fgfr2* keinen Effekt auf die Aufrechterhaltung dieser adulten Neuronenpopulationen hat.

Fasst man alle bisher präsentierten Ergebnisse zusammen, so kann man sagen, dass der *Fgfr2* als alleiniger Fgfr keine Funktion in der Musterbildung der MHR hat, wie anhand der unveränderten Expression zahlreicher früher Markergene gezeigt werden konnte. Neuronale Subpopulationen sind bei E13.5 und im adulten Tier vorhanden und zeigen keine Abnormalitäten, was darauf schließen lässt, dass der *Fgfr2* nicht für die Entstehung und Aufrechterhaltung neuronaler Subpopulationen in der MHR verantwortlich ist. Die generelle neuronale Aktivität im adulten mutanten Maushirn scheint ebenfalls nicht beeinträchtigt zu sein. Somit hat der *Fgfr2* auch keinen aktivitätsbeeinflussenden neurotrophen Effekt in dieser Region. Da im Fgf Signaltransduktionsweg nach der Deletion des *Fgfr2* keine Veränderung beobachtet werden konnte, ist es möglich, dass ein anderer Fgfr für den Verlust des *Fgfr2* auf Proteinebene kompensieren kann. Außer dem *Fgfr2* ist auch der *Fgfr1* in der frühen ventralen MHR exprimiert. Aus diesem Grund sollte die konditionale Doppelmutante für den *Fgfr2* und den *Fgfr1* auf Defekte in der MHR hin analysiert werden.

4.1.4 Herstellung der konditionalen *Fgfr1* und *Fgfr2* Doppelmutante: *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}*

Hierfür wurden *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Männchen mit *En1^{+/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* Weibchen verpaart. Diese Weibchen waren durch Kreuzung von homozygot geflochtenen *En1^{+/+} Fgfr1^{lox/lox}* und *En1^{+/+} Fgfr2^{lox/lox}* Mäusen erhalten worden (die geflochte *En1^{+/+} Fgfr1^{lox/lox}* Maus war von Trokovic et al. 2003 generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden). Die Genotypisierung dieser Maus erfolgte mit Primern für die bereits beschriebenen konditionale *En1^{+/+} Fgfr1^{lox/lox}* Maus (Trokovic et al., 2003) und den R2 3' und R2 5' Primern (s. Anhang). Die *En1^{Cre/+} Fgfr2^{lox/lox}* Maus hatte, wie bereits beschrieben, einen gemischten genetischen Hintergrund. Die *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox}* Maus war auf einem „CD1“ Hintergrund gehalten worden. 50% der Nachkommen der oben beschriebenen Kreuzung hatten den Genotyp *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/+} Fgfr2^{lox/lox}*. Männchen dieses Genotyps wurden erneut mit *En1^{+/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* Weibchen verpaart, so dass nun 25% der Nachkommen Doppelmutanten darstellten. Der genetische Hintergrund dieser Tiere war also eine Mischung aus drei Mausstämmen (*C57BL/6*, *SV129*, *CD1*) und wurde für die Analyse konstant gehalten.

Im Gegensatz zu den konditionalen Einzelmutanten des *Fgfr1* und *Fgfr2*, überleben die doppelmutanten Mäuse *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* jedoch nicht, was bereits auf einen größeren Defekt in der MHR hindeutete.

4.1.5 Analyse der *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* Maus

Da die Doppelmutanten nicht lebensfähig waren, wurden Embryonen kurz vor der Geburt, bei E16.5, E17.5 und E18.5 analysiert. Es sollte zunächst die grobe Hirnmorphologie mittels Nissl-Färbung untersucht werden, um das Ausmaß der erwarteten MHR-Deletion abschätzen zu können.

4.1.5.1 Analyse der Hirnmorphologie

Nissl-Färbungen bei E16.5, E17.5 (Daten nicht gezeigt) und E18.5 zeigen, dass große Teile der MHR sowohl ventral als auch dorsal in der Doppelmutante fehlen (Abb. 37). Dorsal grenzt der choroid plexus (CP) des Hinterhirns, der kein *En1*

exprimiert, an den anterioren Teil des Tectums (PPT) an. Der Bereich dazwischen (superiore colliculi, inferiore colliculi and das Cerebellum) fehlt. Ventral lässt sich anhand der Nissl-Färbung nicht genau abschätzen, welche Bereiche fehlen, man erkennt jedoch bereits anhand der nicht so deutlich ausgeprägten mesencephalen Flexur in den mutanten Tieren, dass auch ventrale Bereiche fehlen müssen. Der Verlust der Region lässt sich durch eine dreiecks-förmige Deletion beschreiben (Abb. 37). Eine detailliertere Analyse von neuronalen Subpopulationen war jedoch nötig, um das Ausmaß der ventralen Verluste deutlich zu machen.

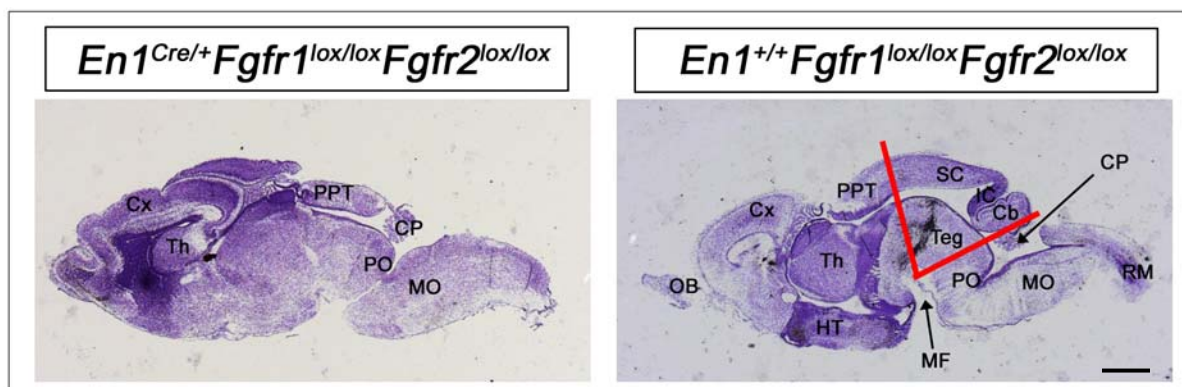


Abb. 37: In den *En1^{Cre/+}Fgfr1^{lox/lox}Fgfr2^{lox/lox}* Doppelmutanten sind große Teile der MHR deletiert. Die Nissl-Färbung zeigt die Verluste der dorsalen und ventralen MHR (links), im Vergleich zur Kontrolle (rechts). Dorsal sind dies: caudaler Teil des SC, der IC und das Cerebellum. Stellt man sich die Deletion als keilförmigen Verlust, der nach oben hin breiter wird, vor, so kann man auch die ventrale Morphologie des mutanten Hirns erklären (Verlust der Tiefe der mesencephalen Flexur). CB: Cerebellum, CP: chorioid plexus, Cx: Cortex, HT: Hypothalamus, IC: inferiore colliculi, MF: mesencephale Flexur, MO: Medulla oblongata, OB: olfaktorischer Bulbus, PO: Pons, PPT: posterior pretektal nucleus, RM: Rückenmark, SC: superiore colliculi, Str: Striatum, Th: Thalamus, Teg: Tegmentum. Der Maßstab beträgt 500 μm .

4.1.5.2 Untersuchung von neuronalen Subpopulationen sowie des dritten und vierten Hirnnervenkerns in den Doppelmutanten

Um das Ausmaß der Deletion genauer beschreiben zu können, wurden neuronale Subpopulationen analysiert. Zunächst wurden die noradrenergen Neurone des aus r1 entstehenden Locus coeruleus (LC) und die Hirnnerven (entstehen im caudalen

ventralen Mittelhirn (III.) und in der Isthmusregion (IV.)) bei E16.5 untersucht. Es stellte sich heraus, dass sowohl die noradrenergen Neurone des LC als auch der dritte und vierte Hirnnerv deletiert sind (Abb. 38). Dies bestätigt die mit der Nissl-Färbung erhaltenen Ergebnisse: Neben den dorsalen Strukturen sind auch ventrale Strukturen, die sich aus dem Mittelhirn und r1 entwickeln, deletiert.

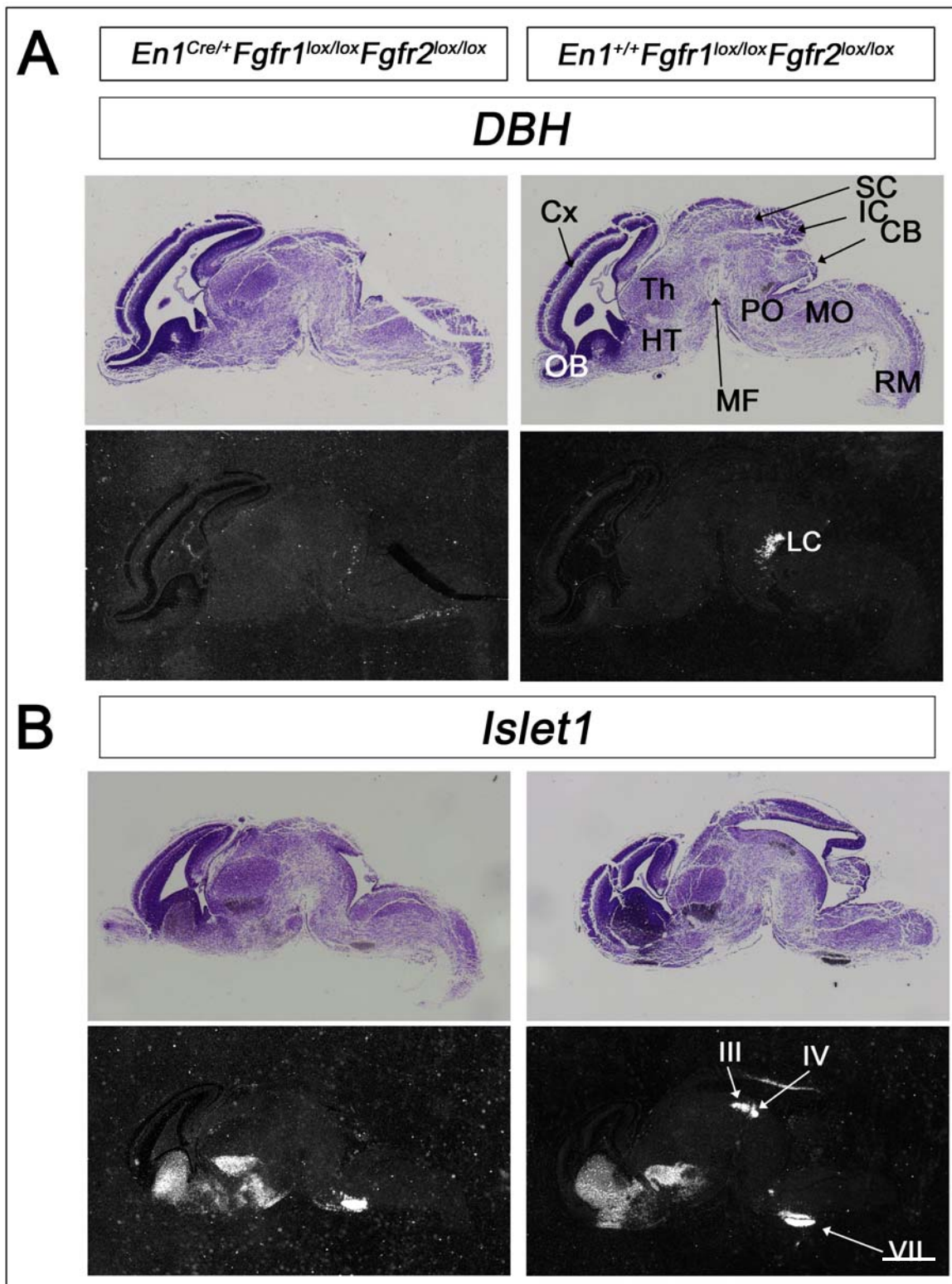


Abb. 38: Die noradrenergen Neurone des Locus coeruleus sind in den $En1^{Cre/+}Fgfr1^{lox/lox}Fgfr2^{lox/lox}$ Mäusen bei E16.5 deletiert und der dritte und vierte Hirnnerv fehlt. ISH mit den Proben gegen DBH (A) und Islet (B) an vergleichbaren sagittalen Hirnschnitten der Doppelmutante und der Kontrolle bei E16.5. In der linken Spalte

ist jeweils die Mutante, in der rechten Spalte das Kontrolltier gezeigt. Über den Dunkelfeldaufnahmen befindet sich jeweils die Hellfeldaufnahme. **(A)** Man erkennt, dass der Locus coeruleus in der Mutante fehlt, **(B)** ebenso der dritte und vierte Hirnnerv. III: dritter Hirnnerv, IV: vierter Hirnnerv, CB: Cerebellum, Cx: Cortex, HT: Hypothalamus, IC: inferiore colliculi, LC: Locus coeruleus, MF: mesencephale Flexur, MO: Medulla oblongata, OB: olfaktorischer Bulbus, Po: Pons, RM: Rückenmark, SC: superiore colliculi, Str: Striatum, Th: Thalamus. Der Maßstab beträgt 500 μm .

Um den Verlust ventraler Strukturen weiter abschätzen zu können, wurde auch das Vorhandensein von dopaminergen (Mittelhirn) und serotonergen (Hinterhirn) Neuronen bei E18.5 überprüft. Während bei E18.5 noch einige 5-HT Neurone der dorsalen Raphe Nuclei in den Doppelmutanten zu erkennen sind (Abb. 39), sind die DA Neurone gänzlich deletiert (Abb. 40).

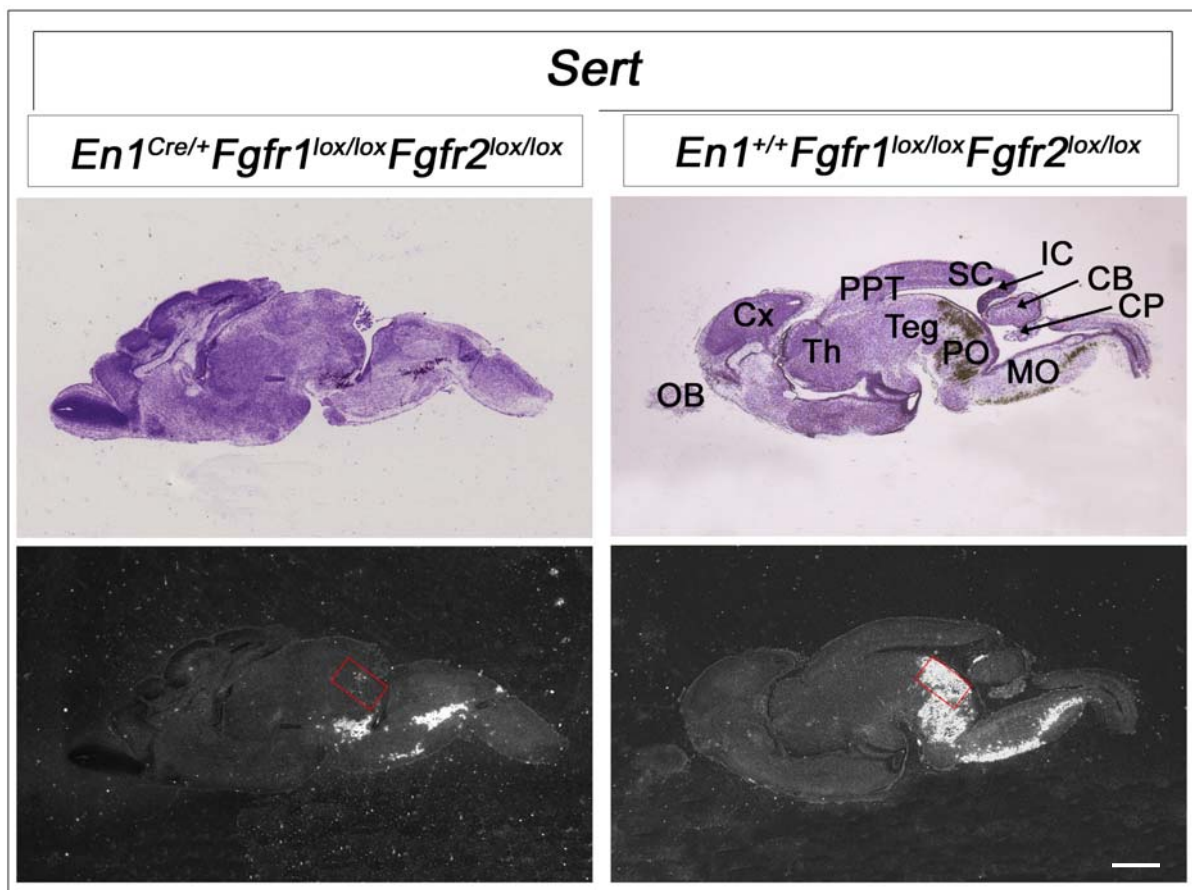


Abb. 39: Die aus r1 stammenden serotonergen Neurone sind bei E18.5 in den *En1*^{Cre/+} *Fgfr1*^{lox/lox} *Fgfr2*^{lox/lox} Mäusen bis auf einige Zellen der DR deletiert. Links ist die Kontrolle, rechts ist die Mutante dargestellt. Über den Dunkelfeldaufnahmen befindet sich jeweils die

Hellfeldaufnahme. Man erkennt dass serotonerge Neurone der dorsalen Raphe (rote Kästchen) bis auf einige wenige Zellen deletiert sind. Die caudalen 5-HT Neurone, die aus r2-7 stammen, sind hingegen vollständig vorhanden (aufgrund der unterschiedlichen Schnittebene hier nicht zu erkennen). CB: Cerebellum, CP: chorioid plexus, Cx: Cortex, IC: inferiore colliculi, MO: Medulla oblongata, OB: olfaktorischer Bulbus, PO: Pons, PPT: posterior pretectal nucleus, SC: superiore colliculi, Th: Thalamus, Teg: Tegmentum. Der Maßstab beträgt 500 μm .

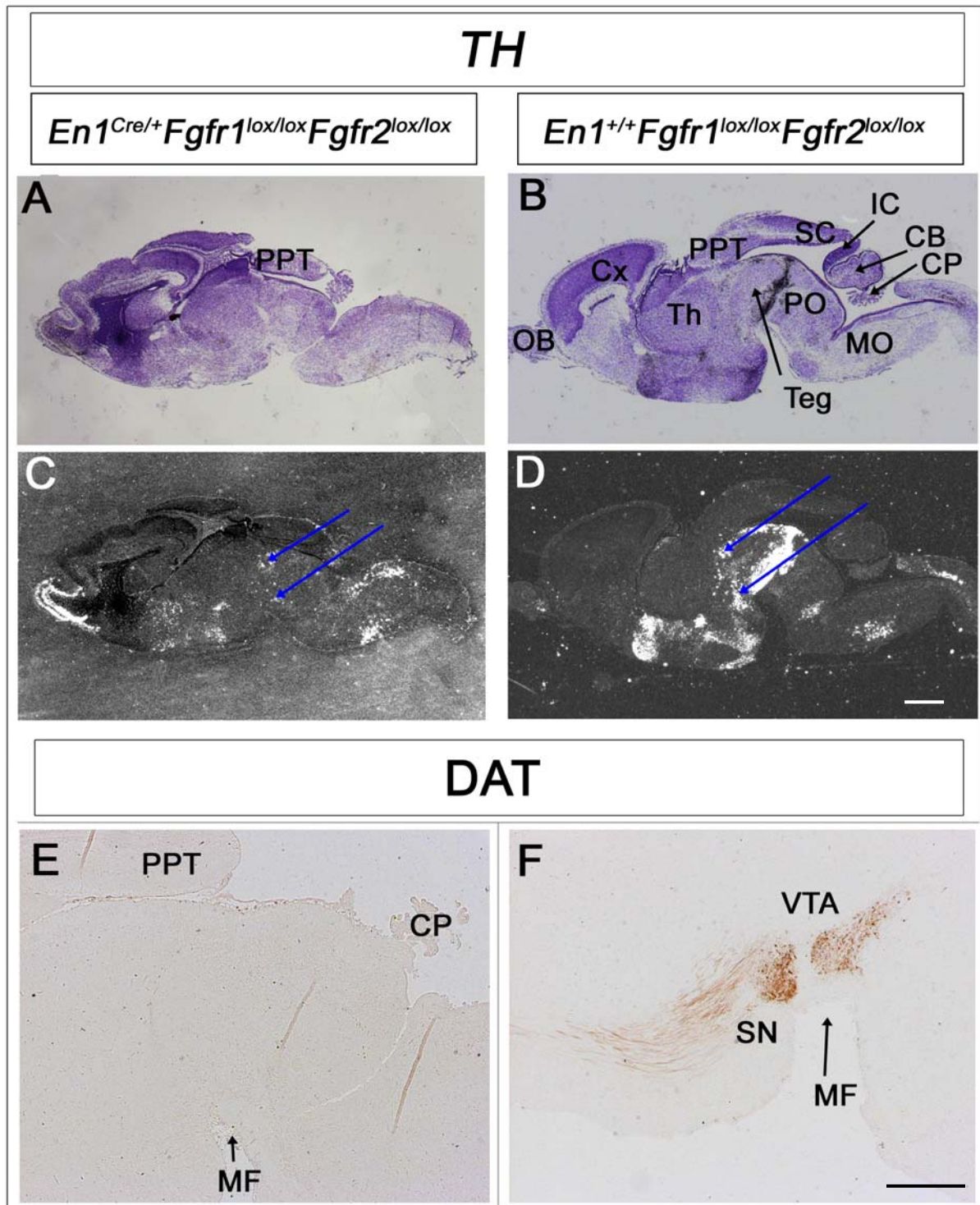


Abb. 40: Die dopaminergen Neurone des Mittelhirns sind in den *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* Mäusen deletiert. (A-D) Eine ISH mit der antisense Probe gegen *TH* wurde an sagittal geschnittenen E18.5 Embryonen durchgeführt. (A,B) stellen Hellfeldaufnahmen zu (C) bzw. (D) dar. In der linken Spalte ist jeweils die Mutante, in der rechten Spalte das Kontrolltier gezeigt. (E,F) zeigen Immunfärbungen für den Dopamintransporter *DAT*. Man erkennt, dass die DA Neurone des Mittelhirns komplett fehlen. Die blauen Pfeile zeigen auf

diencephale *TH* Expression, die in den Mutanten noch vorhanden ist. CB: Cerebellum, CP: chorioid plexus, Cx: Cortex, IC: inferiore colliculi, MF: mesencephale Flexur, MO: Medulla oblongata. OB: olfaktorischer Bulbus, Po: Pons, PPT: posterior pretecal nucleus, SC: superiore colliculi, SN: Substantia nigra, Str: Striatum, Th: Thalamus, Teg: Tegmentum, VTA: ventral tegmental area. Der Maßstab beträgt 500 μm .

Es lässt sich abschließend sagen, dass beide Rezeptoren, der *Fgfr1* und *Fgfr2*, wichtig für die Entstehung der MHR sind. Im konditionalen *Fgfr1* KO (Trokovic et al., 2003) sind dorsale Strukturen betroffen, nicht jedoch ventrale. Im konditionalen *Fgfr2* KO ist die MHR nicht betroffen. Fehlen jedoch beide Rezeptoren, ist die gesamte MHR deletiert, was eine funktionelle Redundanz der Fgfrs 1 und 2 nahe legt. Eine weiterführende Analyse diese konditionale Doppelmutante betreffend (z.B. wann und wie die MHR verloren geht), war im Zeitrahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchzuführen.

4.2 Identifikation von Interaktionspartnern des proneuralen bHLH Genes *Megane* mittels des Gal4 Hefe Zwei-Hybrid Systems

Megane (*Mgn*) ist ein neuer Transkriptionsfaktor aus der Klasse der bHLH Gene. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel mit Hilfe des GAL4 Hefe Zwei-Hybrid Systems Proteininteraktoren des murinen *Megane* (*Mgn*) Proteins zu finden. Dies deshalb, da von bHLH Proteinen bekannt ist, dass sie Homo- und Heterodimere bilden können und diese Interaktionen wichtig für die Spezifizierung von neuronalen Subpopulationen sind (Übersicht in Bertrand et al., 2002, Ross et al., 2003). Hierzu wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollten unvoreingenommen („unbiased“) Proteininteraktoren von *Mgn* in einer cDNA Bibliothek gefunden werden, die aus Mittelhirngewebe von E9 bis E10.5 Mausembryonen konstruiert worden war. Zu diesem Zeitpunkt wird *Mgn* stark im ventralen Mittelhirn exprimiert. Zum anderen sollte gezielt überprüft werden ob *Mgn* mit den proneuralen bHLH Proteinen Mash1, Ngn1, Ngn2 und Ngn3 interagiert und zudem in der Lage ist, Homodimere zu bilden.

4.2.1 Etablierung des Hefe Zwei-Hybrid Systems

Für den unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen wurde der Hefestamm AH109 und für die hypothesengetriebene Überprüfung der Interaktion von *Mgn* mit den bHLH Proteinen wurden die beiden Hefestämme AH109 und Y187 (BD Clontech) verwendet. Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurde überprüft, ob alle Voraussetzungen gegeben sind um einen erfolgreichen Hefe Zwei-Hybrid Screen durchführen zu können (Details s. Material und Methoden, 6.8.1):

1. Der vom Hersteller angegebene Phänotyp der Hefestämme wurde verifiziert, um sicherzustellen, dass die Stämme im Hefe Zwei-Hybrid System auf den jeweiligen Selektionsmedien uneingeschränkt einsetzbar sind (s. Material und Methoden, 6.8.1)
2. Die Expression des Köderproteins (GAL4-BD-*Mgn*) in der Hefe wurde sichergestellt (s. u.).
3. Die Selbstaktivierung der Reportergene durch das Köderprotein wurde ausgeschlossen (s. Material und Methoden, 6.8.2.3)

4. Die Toxizität des Köderproteins für die Hefezellen wurde ausgeschlossen (s. Material und Methoden, 6.8.2.4)

Zum Nachweis der Expression des Fusionsproteins zwischen der Bindedomäne (BD) des hefeeigenen GAL4 Transkriptionsfaktors (GAL4-BD) und Mgn (GAL4-BD-Mgn) wurde Gesamt-Protein aus dem Hefestamm AH109, der mit dem Köder-Vektor pGBKT7-*Mgn* (Klonierung s. Material und Methoden, 6.8.2.1) transformiert worden war (s. Material und Methoden, 6.8.2.2), isoliert. Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen die GAL4-BD nachgewiesen (Abb.41).

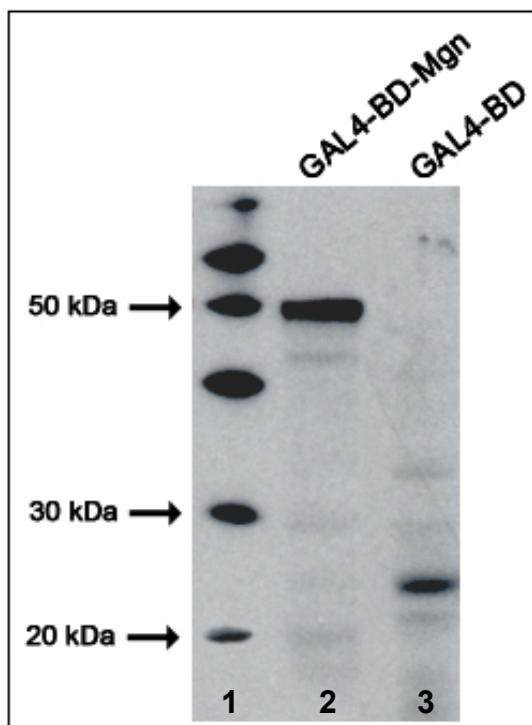


Abb. 41: Der mit dem Köderkonstrukt pGBKT7-*Mgn* transformierte Hefestamm AH109 exprimiert das Fusionsprotein GAL4-BD-Mgn. Das Fusionsprotein (kDa ~ 49) wurde im Western blot mit einem gegen die GAL4-Bindedomäne (GAL4-BD) gerichteten Antikörper detektiert (Spur 2). Als Positiv-Kontrolle wurde die GAL4-Bindedomäne (kDa ~ 24) detektiert (Spur 3). Spur 1: Proteinlängenstandard

Der Nachweis der Expression des GAL4-BD-Mgn Proteins als auch die Tatsachen, dass dieses Fusionsprotein die Reportergene nicht unspezifisch aktiviert und außerdem nicht toxisch für die Hefezellen ist, zeigten, dass Mgn als Köderprotein im Hefe Zwei-Hybrid Screen einsetzbar ist, ohne dass eine hohe Anzahl an Falsch-Positiven „Interaktoren“ zu erwarten wäre oder das Wachstum der Hefezellen negativ beeinflusst wird.

4.2.2 Der Hefe Zwei-Hybrid Screen mit einer selbst hergestellten cDNA-Bibliothek aus E9 – E10.5 Mittelhirngewebe

4.2.2.1 Konstruktion und Screening der cDNA Bibliothek aus E9-E10.5 Mittelhirngewebe

Ab E9 bis ca. E10.5 ist *Mgn* sehr spezifisch im ventralen Mittelhirn, bilateral an der Grenze zwischen Flügelplatte und Basalplatte, exprimiert (Abb. 12). Aufgrund dieser spezifischen Expression von *Mgn*, nahmen wir an, dass *Mgn* eine Rolle in der Spezifizierung früher neuronaler Subpopulationen in dieser Region spielen könnte. Daher sollte nach Interaktionspartnern von *Mgn* im Mittelhirn gesucht werden. Dazu wurde eine cDNA Bibliothek aus gepooltem E9/E9.5/E10/E10.5 Mittelhirngewebe konstruiert (Abb. 42).

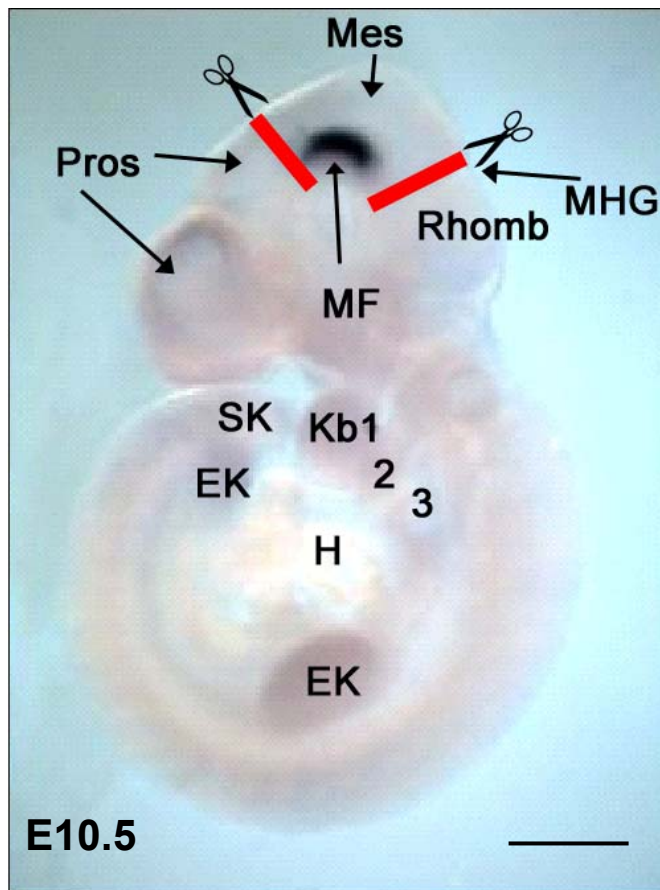


Abb. 42: *Mgn* ist während der frühen Embryogenese sehr spezifisch im ventralen Mittelhirn exprimiert. Eine sog. whole-mount („Ganzkörper“) *in-situ* Hybridisierung (WISH) wurde mit einer gegen *Mgn* gerichteten RNA-Probe durchgeführt und zeigt bei E10.5 die sehr spezifische Expression von *Mgn* im ventralen Mittelhirn. Gesamt-RNA wurde für die Konstruktion der cDNA Bibliothek aus dem Bereich, der mit roten Balken und Scherensymbolen markiert ist, isoliert. EK: Extremitätenknospen, H: Herz, Kb: Kiemenbögen 1-3, Mes: Mesencephalon, MHG: Mittel-/Hinterhirngrenze, MF: mesencephale Flexur, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, SK: Schwanzknospe. Die Abb. wurde von J. Guimera zur Verfügung gestellt. Der Maßstab beträgt 500 μm .

Die Konstruktion der cDNA Bibliothek und der anschließende Hefe Zwei-Hybrid Screen wurden anhand des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls „Matchmaker library construction and screening kit“ von Clontech durchgeführt (s. Material und Methoden, 6.8.5).

4.2.2.2 Selektion der putativen Interaktoren des unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screens

Nach der Selektion von Hefekolonien, in denen eine Interaktion zwischen dem Köderprotein *Mgn* und den Beute-cDNAs der im Hefe Zwei-Hybrid Screen verwendeten cDNA Bibliothek stattgefunden hat (s. Material und Methoden, 6.8.5), wurden die Beute-Vektoren, die die cDNAs für diese 36 putativen Protein-

Interaktoren enthalten, aus den Hefekolonien isoliert (s. Material und Methoden 6.7.5) und die cDNAs wurden sequenziert (s. Material und Methoden 6.3.7). Die Nukleotid Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „blastn“ in der Nukleotid-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“, Bethesda, Maryland, USA auf Homologien zu bekannten oder unbekanntem Genen hin untersucht. Von 36 sequenzierten Klonen haben 8 Klone eine Nukleotidsequenz von weniger als 120 Bp Länge und sind in der Tabelle nicht aufgeführt. Ein weiteres Kriterium der Auswahl war eine mindestens 80%ige Homologie zwischen cDNA-Sequenz und Datenbank-Sequenz. Die 28 Klone, die diese Kriterien erfüllen, sind in Tab. 2 aufgeführt, darunter befinden sich 5 Riken-Klone, deren Funktion noch unbekannt ist und die nicht weiter analysiert wurden.

| Klon Nummer | Locus-ID | Gen |
|-------------|------------------|--|
| 1/12 | NM_011051 | Programmed cell death 6 (Pcd6) |
| 1/23 | NM_010433 | Homeodomain-interacting protein kinase 2 (Hipk2) |
| 1/31 | AF170301 | Nuclear body associated kinase 1a (Nbak1) |
| 1/67 | AK049346 | Lrp2 (megalin/ Glycoprotein 330) |
| 1/78; 1/99 | BC008241 | Similar to proteasome subunit beta type 4 |
| 2/21 | AK006977 | Adult male testis cDNA Homolog to mitofilin |
| 2/233 | AAH04019 | Similar to mesoderm specific transcript (Mest) |
| 2/44 | MMCI23K | CI-23 kD gene |
| 2/46 | BAB31368 | Homolog to ribonuclease 6 precursor |
| 2/47 | NM_009367 | TGFβ2 |
| 2/88 | AK017150 | RIKEN Klon: 5033403L01 |
| 3/11 | AK002874 | RIKEN-Klon: 0610040P02 |
| 3/45 | NM_009697 | nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (Nr2f2) |
| 3/56 | NM_019299 | Clathrin, heavy polypeptide |
| 3/98 | AC007665 | Chromosome 18 clone, fibroblast cell line |
| 4/40 | BC011060 | Mus musc., clone MGC:19403 |
| 5/36 | AK012191 | RIKEN-Klon: 2610529I12 |

| | | |
|------------|-----------|--|
| 5/54 | AK019234 | RIKEN-Klon: 2700096C20 |
| 5/96 | AK013024 | RIKEN-Klon: 2810407C17 |
| 6/21 | AF268196 | Mus musc. BALB/c VH1 (dual-specificity phosphatase) |
| 6/39, 8/21 | BC013777 | Mouse small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A |
| 6/53 | NM_153599 | Cyclin-dependent kinase 8 (Cdk8) |
| 7/1 | NM_026147 | Ribosomales Protein S20 |
| 7/33 | NM_005157 | Abelson murine leukaemia oncogene |
| 8/23 | NM_019567 | Apoptotic chromatin condensation inducer in nucleus (Acin 1) |
| 8/29 | NM_011170 | Prion protein |

Tab. 2: Liste der putativen Interaktionspartner von Mgn. Die cDNA Sequenzen, die in den Plasmiden der selektierten Hefekolonien enthalten sind, wurden mit Hilfe des Programms „blastn“ in der Nukleotid-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“, Bethesda, Maryland, USA auf Homologien zu bekannten oder unbekanntem Genen hin untersucht. Die Kriterien der Auswahl waren eine Mindestlänge der im Beute-Vektor enthaltenen cDNA von 120 bp und eine mindestens 80%ige Homologie zu der Datenbank-Sequenz. Es sind jeweils die Klonnummer, die Identifikationsnummer aus der NCBI Datenbank (Locus-ID) und der Name des Gens angegeben.

Von besonderem Interesse waren der Hefeklon 3/45, der die cDNA für den nukleären Rezeptor *Nr2f2* („nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2“), auch *Coup TF2* („Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2“) genannt, enthielt und der Klon 2/47, der die cDNA für den Transforming growth factor $\beta 2$ (*Tgf β 2*) enthielt. Dies deshalb, da von beiden aus der Literatur bekannt war, dass sie im Mittelhirn exprimiert sind (Lutz et al., 1994; Qiu et al., 1994, Farkas et al., 2003). Von *Tgf β 2* waren die Basenpaare 144-653 (von insgesamt 1244 bp) im Beute-Vektor enthalten. Im Falle von *Nr2f2* war interessanterweise die cDNA, die der Liganden-Binde-Domäne des Proteins entspricht, in den Beute-Vektor integriert (bp 651-1197 von insgesamt 1244 bp).

4.2.2.3 Experimente zur Verifizierung der Interaktion zwischen Mgn/Nr2f2 und Mgn/Tgf β 2 in Hefe

Um die gefundenen Interaktionen zu verifizieren wurden mehrere Tests durchgeführt. Die Beute-Vektoren pGADT7-*Nr2f2* und pGADT7-*Tgf β 2* wurde aus den „*Nr2f2*“- und „*Tgf β 2*“-enthaltenden Hefekolonien isoliert und für eine Transformation des Hefestammes Y187 verwendet (s. Material und Methoden 6.8.6.2). Anschließend wurde der Hefestamm AH109, der das Köderprotein GAL4-BD-Mgn enthielt, mit dem Hefestamm Y187, der entweder das Beute-Protein GAL4-AD-*Nr2f2* oder GAL4-AD-*Tgf β 2* enthielt, verpaart. Dieser Test schließt aus, dass ein weiterer nicht identifizierter Beute-Vektor, welcher zusätzlich in der Hefe vorhanden sein könnte, die Interaktion vermittelt. *Nr2f2* war erneut in der Lage mit Mgn zu interagieren, während *Tgf β 2* bei der Transformation und Verpaaren mit dem Hefestamm AH109, der das Köderprotein enthielt, keine Interaktion mit Mgn zeigte, weshalb auf weitere Experimente mit diesem Protein verzichtet wurde. Anschließend wurden Kontroll-Verpaarungen durchgeführt, die eine unspezifische Interaktion von *Nr2f2* mit der BD Domäne per se ausschlossen (s. Material und Methoden 6.8.6.2).

Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse wurde das „full-length“ (gesamte) *Nr2f2* Protein (Klonierung s. Material und Methoden 6.8.3.1) auf eine Interaktion mit Mgn in Hefezellen getestet. Die Interaktion war positiv (Daten nicht gezeigt) und gibt einen deutlichen Hinweis auf die Spezifität der Interaktion.

4.2.2.4 Verifizierung der Interaktion von Mgn/Nr2f2 in kultivierten Säugetierzellen

Mittels transienter Transfektion wurden die von mir zuvor klonierten Vektoren pcDNA3.1 [n-term MYC-*Nr2f2*] und pcDNA3.1 [n-term FLAG-*Mgn*] in die HEK 293 Zelllinie (humane embryonale Nierenzelllinie) eingebracht. Das Gesamt-Protein der Zellen wurde anschließend unter nativen Bedingungen isoliert und für die Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IPs) verwendet (s. Material und Methoden, 6.10.3). Es wurden Protein G Sepharose „beads“ zum Binden der Proteinkomplexe verwendet, von denen sie eluiert und mittels Western Blot detektiert wurden. Die in der Hefe gefundene Interaktion zwischen Mgn und *Nr2f2* konnte durch Ko-IP in den HEK-Zellen verifiziert werden (s. Material und Methoden 6.10.3) (Abb. 43).

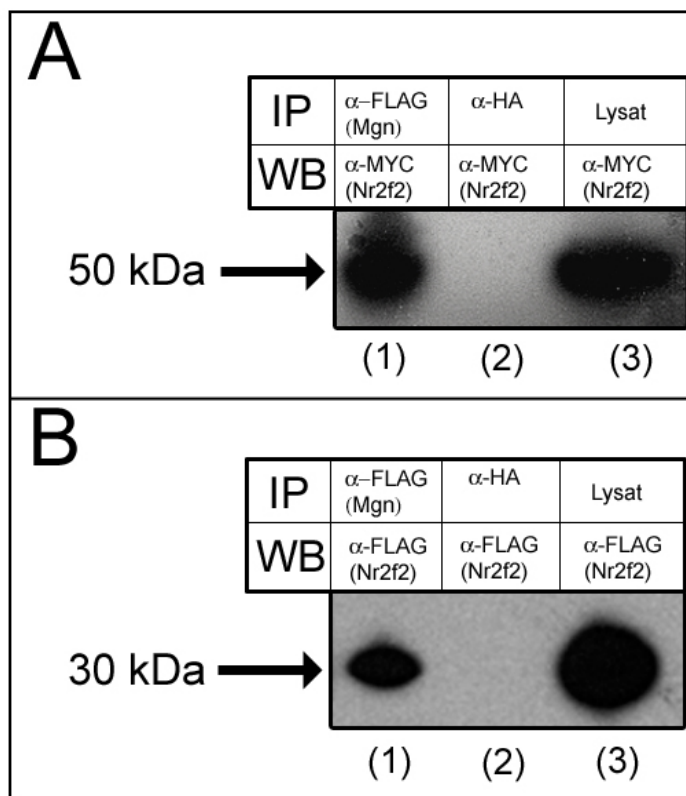


Abb. 43: Mgn interagiert mit Nr2f2 in kultivierten Säugetierzellen. (A) In der Zeile „IP“ ist jeweils der in der Immunpräzipitation verwendete Antikörper angegeben. In der Zeile „WB“ ist der Antikörper angegeben, mit dem die Proteine auf dem Western Blot detektiert wurden. Zum besseren Verständnis ist in Klammern das Protein angegeben, das präzipitiert bzw. im Western Blot detektiert werden sollte. **(1)** zeigt das MYC-getagte Nr2f2-Protein auf dem WB, welches durch den Einsatz des FLAG-Mgn Proteins präzipitiert werden konnte. **(2)** Negativ-Kontrolle: der unspezifische Antikörper α -HA, ist nicht in der Lage das MYC-Nr2f2 Protein zu präzipitieren. **(3)** zeigt das MYC-Nr2f2 Protein im Ausgangs-Zelllysate. **(B)** Weitere Kontrollen: **(1)** zeigt, dass neben MYC-Nr2f2 auch FLAG-Mgn im präzipitierten Komplex vorhanden war. **(2)** zeigt, dass FLAG-Mgn nicht unspezifisch an den α -HA Antikörper bindet. **(3)** zeigt, dass das FLAG-Mgn Protein im Ausgangs-Zelllysate vorhanden ist.

4.2.2.5 Untersuchung der Expression von *Mgn* und *Nr2f2* *in vivo*

Um festzustellen, ob die *in vitro* gezeigte Interaktion zwischen Mgn und Nr2f2 auch *in vivo* eine Relevanz haben könnte, wurde untersucht, ob die entsprechenden Gene *Mgn* und *Nr2f2* bei E10.5 und E12.5 im Zentralen Nervensystem (ZNS) ko-exprimiert sind.

Tatsächlich überlappt die Expression beider Gene bei E10.5 im ventralen Mittelhirn (Abb. 44).

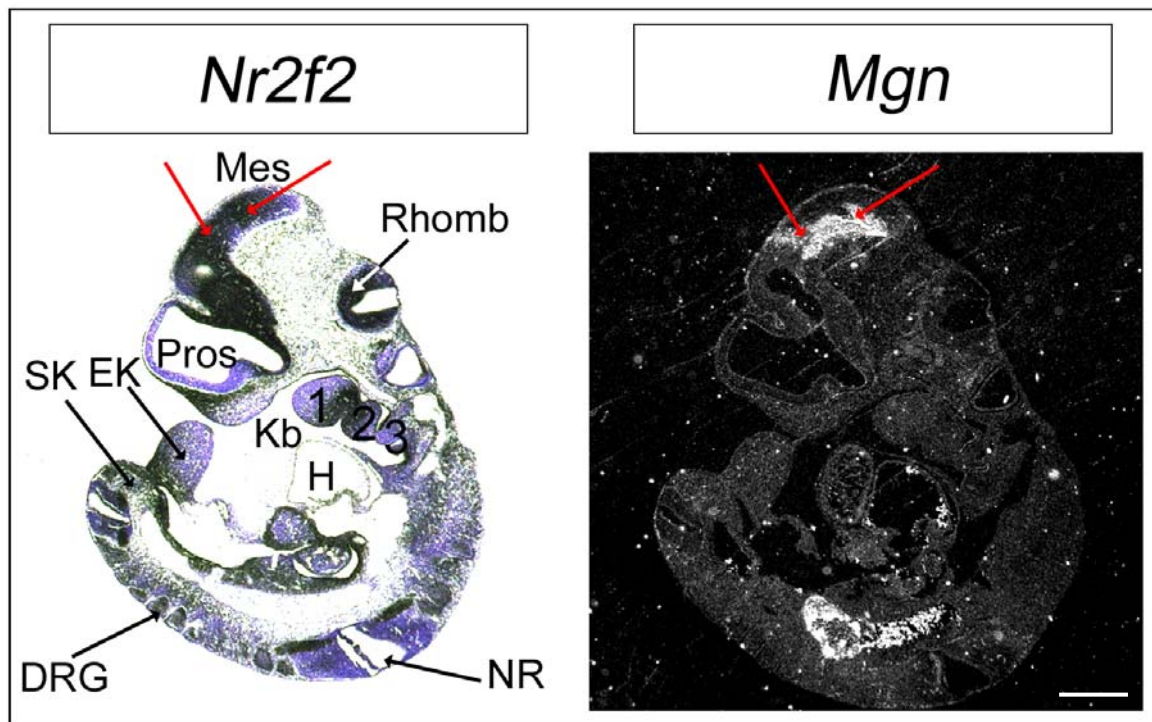


Abb. 44: *Mgn* und *Nr2f2* Expression überlappt im ventralen Mittelhirn bei E10.5. Eine radioaktive *ISH* wurde mit Proben gegen *Nr2f2* (Hellfeldaufnahme, das Expressionssignal ist schwarz) und *Mgn* (Dunkelfeldaufnahme, das Expressionssignal ist weiss) an sagittalen, konsekutiven Schnitten eines wildtypischen E10.5 Mausembryos durchgeführt. Regionen in denen beide Gene überlappend exprimiert werden, sind durch rote Pfeile markiert. DRG: dorsal root ganglia (Spinalganglien), EK: Extremitätenknospe, H: Herz; Mes: Mesencephalon, NR: Neuralrohr, Pros: Prosencephalon; Rhomb: Rhombencephalon, Kb: Kiembögen 1,2 und 3; SK: Schwanzknospe. Der Maßstab beträgt 500 μm

Bei E12.5 ist *Nr2f2* im Vergleich zum ZNS besonders stark im Mesenchym exprimiert. Im Neuralrohr ist eine Ko-Expression von *Mgn* und *Nr2f2* in den lateralen ganglionischen Eminenzen (lateral ganglionic eminence) (LGE) des Telencephalons zu beobachten. Im caudalen Mesencephalon findet sich *Nr2f2* Expression sowohl in der VZ als auch in der Mantelzone (MZ) und überlappt dadurch mit der ventrikulären *Mgn* Expression.

Im Diencephalon und anterioren Mesencephalon hingegen scheinen sich die Expressionsmuster beider Gene gegenseitig auszuschließen. Im Diencephalon ist *Mgn* lokal in der VZ des Epithalamus, des Prethalamus und des Hypothalamus exprimiert und markiert außerdem die Zona limitans intrathalamica (ZLI). *Nr2f2* ist hingegen in diesen Bereichen in der MZ zu finden. Im rostralen Mesencephalon ist *Mgn* in der VZ der Flügelplatte zu finden, während *Nr2f2* ebenfalls in der MZ exprimiert ist (Abb. 45).

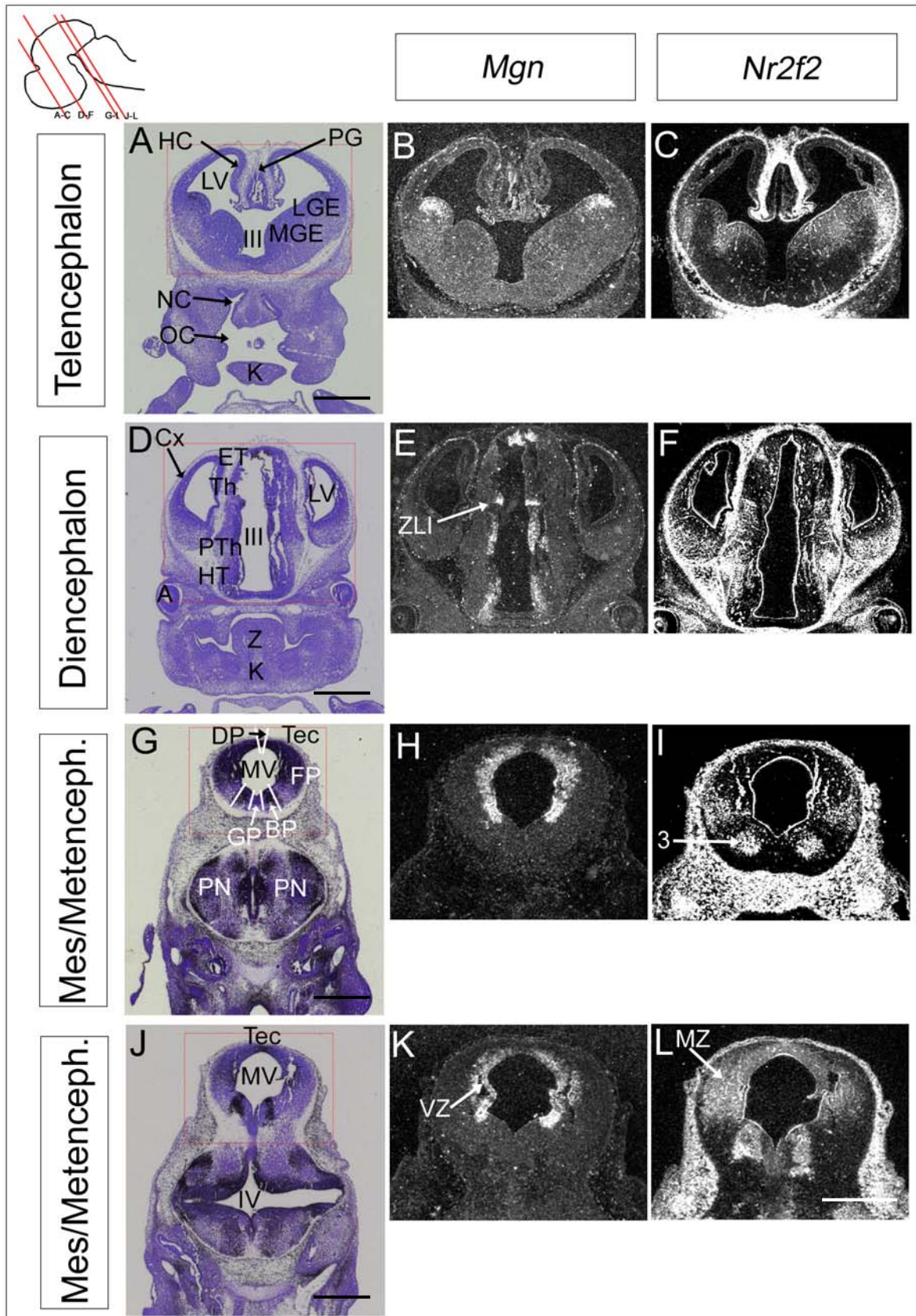


Abb. 45: *Mgn* und *Nr2f2* sind bei E12.5 im Telencephalon und im Mesencephalon in bestimmten Bereichen des Mausembryos ko-exprimiert. Eine radioaktive *ISH* wurde mit

der *Mgn* Sonde (**B,E,H,K**) und mit der *Nr2f2* Sonde (**C,F,I,L**) an coronalen, konsekutiven Schnitten eines wildtypischen E12.5 Mausembryos durchgeführt. (**A,D,G,J**) sind Hellfeldaufnahmen zu den in (**B,E,H,K**) dargestellten Schnitte. Das rote Rechteck markiert jeweils den vergrößerten Bereich. Der Einsatz zeigt die Schnittebenen. *Mgn* Expression überlappt im Telencephalon in den LGE mit der Expression von *Nr2f2* (**B,C**). Im Diencephalon findet sich keine Überlappung der Expression (**E,F**). Im anterioren Mesencephalon ist *Mgn* in der VZ exprimiert (**H**), *Nr2f2* hingegen in der MZ (**I**). Im caudalen Mesencephalon überlappen *Mgn* und *Nr2f2* in der VZ (**K,L**). 3: oculomotor nerve (3. Hirnnervenkern), III: dritter Ventrikel, IV: vierter Ventrikel, A: Auge, BP: Basalplatte, DP: Deckplatte, ET: Epithalamus, FP: Flügelplatte, GP: Grundplatte, HC: Hippokampus, HT: Hypothalamus, K: Kiefer, LGE: Lateral ganglionic eminence, LV: lateraler Ventrikel, MGE: medial ganglionic eminence, MZ: Mantelzone, NC: nasal cavity (Nasenhöhle), OC: oral cavity (Mundhöhle), PG: pineal gland (Zirbeldrüse), PN: pontine nuclei, PTh: Prethalamus, Tec: Tectum, Th: Thalamus, VZ: Ventrikulärzone, ZLI: zonal limitans intrathalamica, Z: Zunge. Der Maßstab beträgt 500 µm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch den unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen ein Interaktionspartner von *Mgn* identifiziert wurde, der nukleäre Rezeptor *Nr2f2*. Die Interaktion zwischen beiden Proteinen wurde zusätzlich in kultivierten Säugetierzellen bestätigt. Die entsprechenden Gene sind in spezifischen Regionen des embryonalen Maushirns ko-exprimiert, was auf eine biologische Relevanz dieser *in vitro* gezeigten Interaktion hindeutet.

4.2.3 Der Hefe Zwei-Hybrid Screen mit ausgewählten bHLH Proteinen

4.2.3.1 Interaktion von bHLH Proteinen mit *Mgn* im Hefe Zwei-Hybrid System

bHLH Proteine üben ihre Funktion als Homo- und Heterodimere aus. Die bHLH Gene *Mash1*, *Ngn1*, *Ngn2* und *Ngn3* sind in spezifischen Regionen des sich entwickelnden Maushirns exprimiert, darunter auch im Mittelhirn (Gradwohl et al., 1996; Ma et al., 1996, Ma et al., 1997). Da *Mgn* von E9 an ebenfalls im Mittelhirn exprimiert ist, sollte eine mögliche Interaktion zwischen *Mgn* und diesen bHLH Proteinen gezielt überprüft werden.

Das Mgn-Protein diente wie im vorher beschriebenen Screen als Köder (GAL4-BD-Mgn) und die jeweiligen bHLH Proteine wurden als Beute verwendet. Die Beuteproteine stellen Fusionsproteine zwischen der GAL4 Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und dem jeweiligen bHLH Protein (GAL4-AD-Mash1, GAL4-AD-Ngn1, GAL4-AD-Ngn2, GAL4-AD-Ngn3) dar. Nach der Klonierung und Transformation der Beutekonstrukte pGADT7-*Mash1*, pGADT7-*Ngn1*, pGADT7-*Ngn2* und pGADT7-*Ngn3* in den Hefestamm Y187 (s. Material und Methoden, 6.8.3) wurden die Beuteproteine durch Verpaaren des haploiden Hefestammes Y187 mit dem haploiden Hefestamm AH109, der das Mgn-Köderprotein enthielt, auf eine Interaktion hin getestet (zum Selektionsverfahren s. Material und Methoden 6.8.4). Es konnte gezeigt werden, dass Mgn mit Mash1, nicht jedoch mit Ngn1, 2 und 3 interagiert. Außerdem war Mgn in der Lage, in Hefezellen Homodimere zu bilden, d.h. mit sich selbst zu interagieren. Als positive Kontrolle wurde die Interaktion zwischen Mash1 (Beute) und Ngn2 (Köder) (Gradwohl et al., 1996) reproduziert (Abb. 46). Weitere Kontrollverpaarungen sicherten die erhaltenen Ergebnisse ab (s. Material und Methoden s. 6.8.6.3).

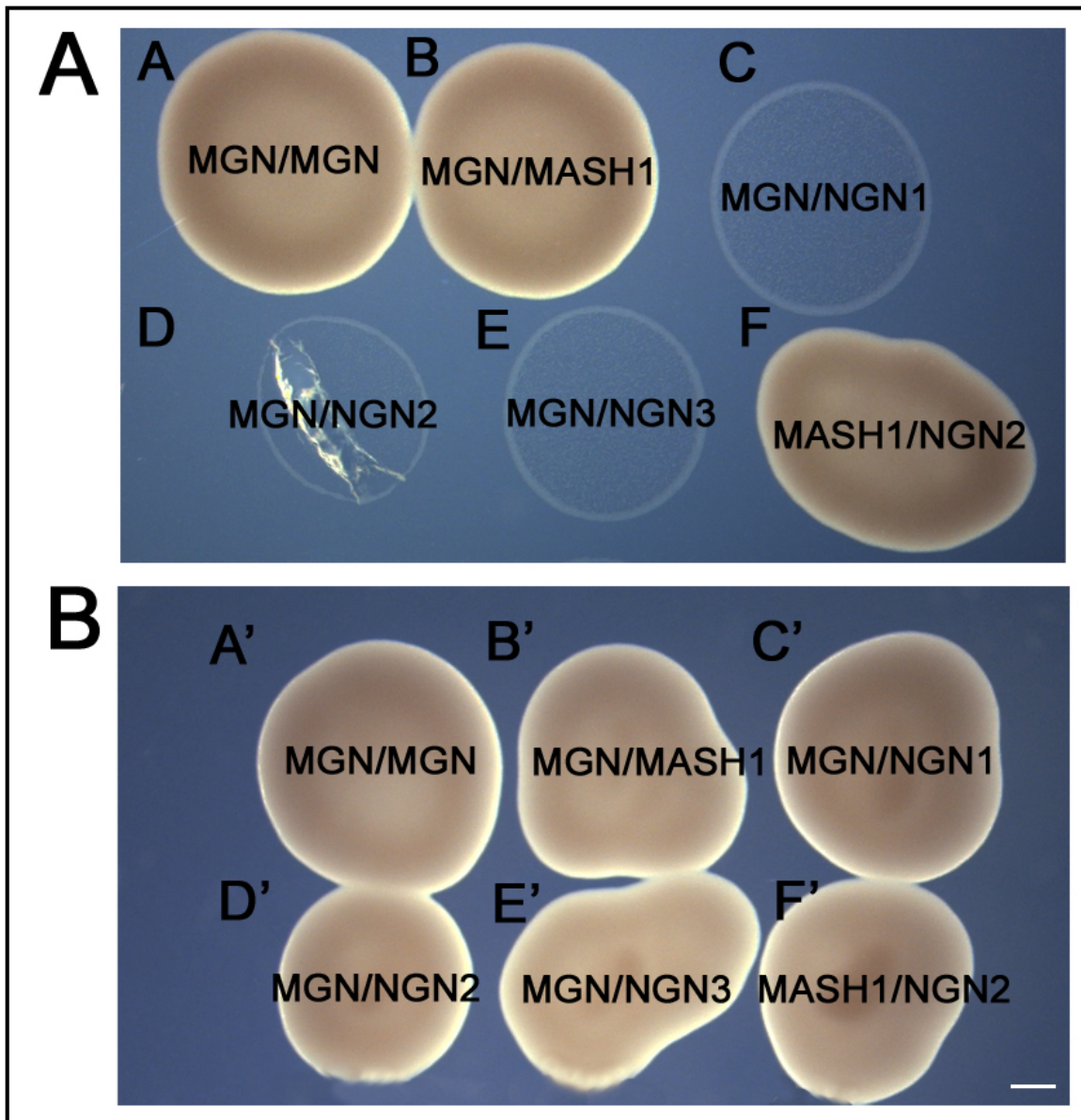


Abb. 46: Zusammenstellung der in den Hefe-Verpaarungen erhaltenen Ergebnisse. A: Lediglich die diploiden Hefestämme, die die miteinander interagierenden Proteine exprimieren, sind in der Lage die Reportergene zu aktivieren und auf Minimalmedium (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His) zu wachsen (s. Material und Methoden 6.8.4): Mgn/Mgn (**A**); Mgn/Mash1 (**B**) und Mash1/Ngn2 (**F**). **B:** Kontrolle: Alle Hefestämme können auf SD-Leu-Trp Medium wachsen. Dieses Medium selektiert auf das Vorhandensein der Köder- und Beutevektoren in den Hefezellen. (**A'**-**F'**). Der Maßstab beträgt 500 μm .

4.2.3.2 β -Galaktosidase Test zur Verifizierung der in der Hefe erhaltenen Ergebnisse

Die Selektion auf SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His Minimalmedium basierte auf der Aktivierung der Reportergene für die Synthesefähigkeit der Hefe von Adenin und Histidin. Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde auf die Aktivierung eines weiteren Reportergens, des lacZ Gens, getestet (s. Material und Methoden, 6.8.5.2). Dieses Gen kodiert für das Enzym β -Galaktosidase und erlaubt es der Hefe, das Substrat X-Gal zu spalten, was zu einer blauen Färbung der Hefekolonie führt. Ein positives Ergebnis wurde für die Interaktionen zwischen „Mgn/Mgn“; „Mgn/Mash1“ und „Mash1/Ngn2“ erhalten. Als Negativ-Kontrolle wurden die Proteine „Mgn/Ngn2“ erhalten. Als Positiv-Kontrolle galt die vom Hersteller (Clontech) vorgegebene, bekannte Interaktion zwischen „P53/Sv40“ (Abb. 47).

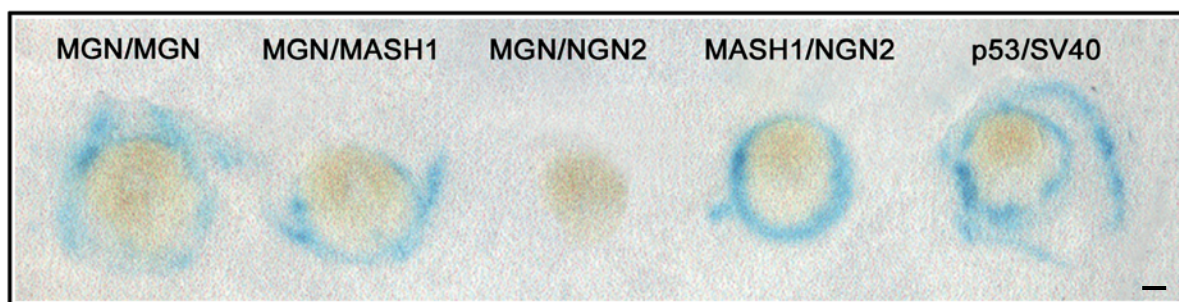


Abb. 47: Der β -Galaktosidase Test bestätigt die Interaktion zwischen Mgn und Mash1 und von Mgn mit sich selbst. Nach dem Abzug der Hefekolonien auf eine Nylonmembran werden die Kolonien aufgeschlossen und mit X-Gal als Substrat inkubiert. Das lacZ Gen wird als Reportergen in den Kolonien aktiviert, in denen eine Interaktion von Köder- und Beuteprotein stattfindet (Mgn/Mgn; Mgn/Mash1 und Mash1/Ngn2). Als Positivkontrolle wurde die bekannte Interaktion zwischen P53 und Sv40 verwendet und als Negativ-Kontrolle die Interaktion zwischen Mgn und Ngn2. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

4.2.3.3 Verifizierung der Interaktion von Mgn/Mgn und Mgn/Mash1 in kultivierten Säugetierzellen

Mittels transienter Transfektion wurde der *Mgn* enthaltende Vektor pcDNA3.1 [n-term MYC-*Mgn*] mit dem *Mash1* enthaltenden pcDNA3.1 [n-term FLAG-*Mash1*] oder dem *Mgn* enthaltenden pcDNA3.1 [n-term FLAG-*Mgn*] in HEK293 Zellen ko-transfiziert. Als Kontrolle wurde der *Mash1* enthaltende Vektor pcDNA3.1 [n-term FLAG-*Mash1*] mit dem Ngn2 enthaltenden pcDNA3.1 [n-term MYC-*Ngn2*] in die Zellen eingebracht. Das Gesamt-Protein wurde anschließend aus den Zellen isoliert und für die Ko-IPs verwendet (s. Material und Methoden, 6.10.3). Die in der Hefe erhaltenen Ergebnisse ließen sich in Säugetierzellen reproduzieren. Das Mgn Protein wurde sowohl mit dem FLAG-getagten Mash1 als auch mit dem FLAG-getagten Mgn kopräzipitiert. Die Interaktion zwischen Mash1 und Ngn2 wurde als Positiv-Kontrolle verifiziert (Abb. 48). Als Negativ-Kontrolle galt die auch in der Hefe nicht interagierenden Proteine Mgn und Ngn2 (nicht gezeigt).

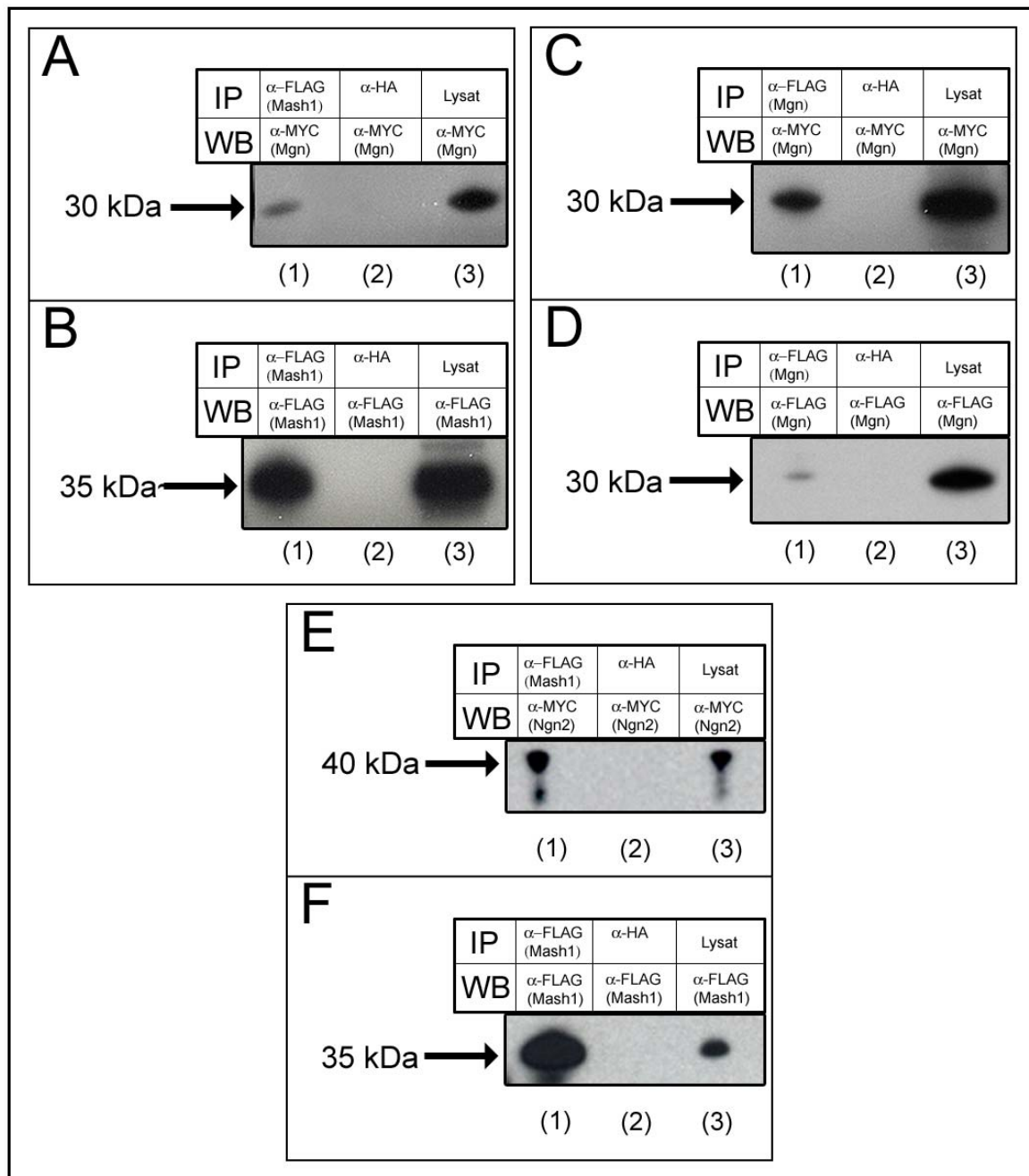


Abb. 48: Die Proteine Mgn/Mash1 (A,B), Mgn/Mgn (C,D) und Mash1/Ngn2 (E,F) interagieren in kultivierten Säugetierzellen. In der Zeile „IP“ ist jeweils der in der Immunpräzipitation verwendete Antikörper angegeben. In der Zeile „WB“ ist der Antikörper angegeben mit dem die Proteine auf dem Western Blot detektiert wurden. Zum besseren Verständnis ist in Klammern das Protein angegeben, das detektiert werden sollte. **A:** (1) zeigt das MYC-getagte Mgn-Protein auf dem WB, welches durch den Einsatz des FLAG-Mash1 Proteins präzipitiert werden konnte. (2) Negativ-Kontrolle: der unspezifische Antikörper α -HA, der verwendet wurde, ist nicht in der Lage MYC-Mgn zu präzipitieren. (3)

zeigt MYC-Mgn im Ausgangs-Zelllysate. **B:** Weitere Kontrollen: **(1)** zeigt, dass neben MYC-Mgn auch FLAG-Mash1 im präzipitierten Komplex vorhanden ist. **(2)** zeigt, dass FLAG-Mash1 nicht unspezifisch an den α -HA Antikörper bindet. **(3)** zeigt, dass FLAG-Mash1 Protein im Ausgangs-Zelllysate vorhanden ist. **C:** **(1)** zeigt das MYC-getagte Mgn-Protein auf dem WB, welches durch den Einsatz des FLAG-Mgn Proteins präzipitiert werden konnte. **(2)** Negativ-Kontrolle: der unspezifische Antikörper α -HA, der verwendet wurde, ist nicht in der Lage MYC-Mgn zu präzipitieren. **(3)** zeigt, dass MYC-Mgn im Ausgangs-Zelllysate vorhanden ist. **D:** Weitere Kontrollen: **(1)** zeigt, dass FLAG-Mgn, nach der IP im präzipitierten Komplex vorhanden ist. **(2)** zeigt, dass FLAG-Mgn nicht unspezifisch an den α -HA Antikörper bindet. **(3)** zeigt, dass FLAG-Mgn Protein im Ausgangs-Zelllysate vorhanden ist. **E:** Positiv-Kontrolle **(1)** zeigt das MYC-getagte Ngn2-Protein auf dem WB, welches durch den Einsatz des FLAG-Mash1 Proteins präzipitiert werden konnte. **(2)** Negativ-Kontrolle: der unspezifische Antikörper α -HA, der verwendet wurde, ist nicht in der Lage MYC-Ngn2 zu präzipitieren. **(3)** zeigt, dass MYC-Ngn2 im Ausgangs-Zelllysate vorhanden ist. **F:** **(1)** zeigt, dass FLAG-Mash1, nach der IP im präzipitierten Komplex vorhanden ist. **(2)** zeigt, dass FLAG-Mash1 nicht unspezifisch an den α -HA Antikörper bindet. **(3)** zeigt, dass FLAG-Mash1 Protein im Ausgangs-Zelllysate vorhanden ist.

Somit konnten die in der Hefe gefundenen Interaktionen zwischen Mgn und sich selbst und zwischen Mgn und Mash1 auch in kultivierten Säugetierzellen verifiziert werden. Mit Hilfe der folgenden Experimente sollte die mögliche biologische Funktion der Interaktion zwischen Mgn und Mash1 bestimmt werden.

4.2.4 Untersuchungen zur Funktion der Interaktion von Mgn mit Mash1

4.2.4.1 Feststellung des Expressionsmusters von *Mgn* und *Mash1* im embryonalen Maushirn

Nachdem ich eindeutig zeigen konnte, dass Mgn mit Mash1 interagiert, führte ich eine Expressionsstudie der beiden entsprechenden Gene im Mittelhirn durch, um Rückschlüsse auf eine funktionelle Relevanz dieser Interaktion *in vivo* ziehen zu können. Gleichzeitig wurde auch die Ko-Expression mit *Ngn1*, 2 und 3 überprüft. Es zeigte sich, dass die Expression von *Mgn* und *Mash1* bei E10.5 in der VZ des ventralen Mittelhirns überlappt, während *Ngn1*, 2 und 3 im ventralen Mittelhirn in der

MZ exprimiert sind und daher mit der *Mgn* Expression nicht überlappen (Abb. 49). Dieser Befund stimmt mit den *in vitro* erhaltenen Daten insofern überein, als dass aufgrund der Ko-Expressionsdaten nur *Mgn* mit *Mash1* interagieren kann, nicht aber mit den anderen bHLH Proteinen.

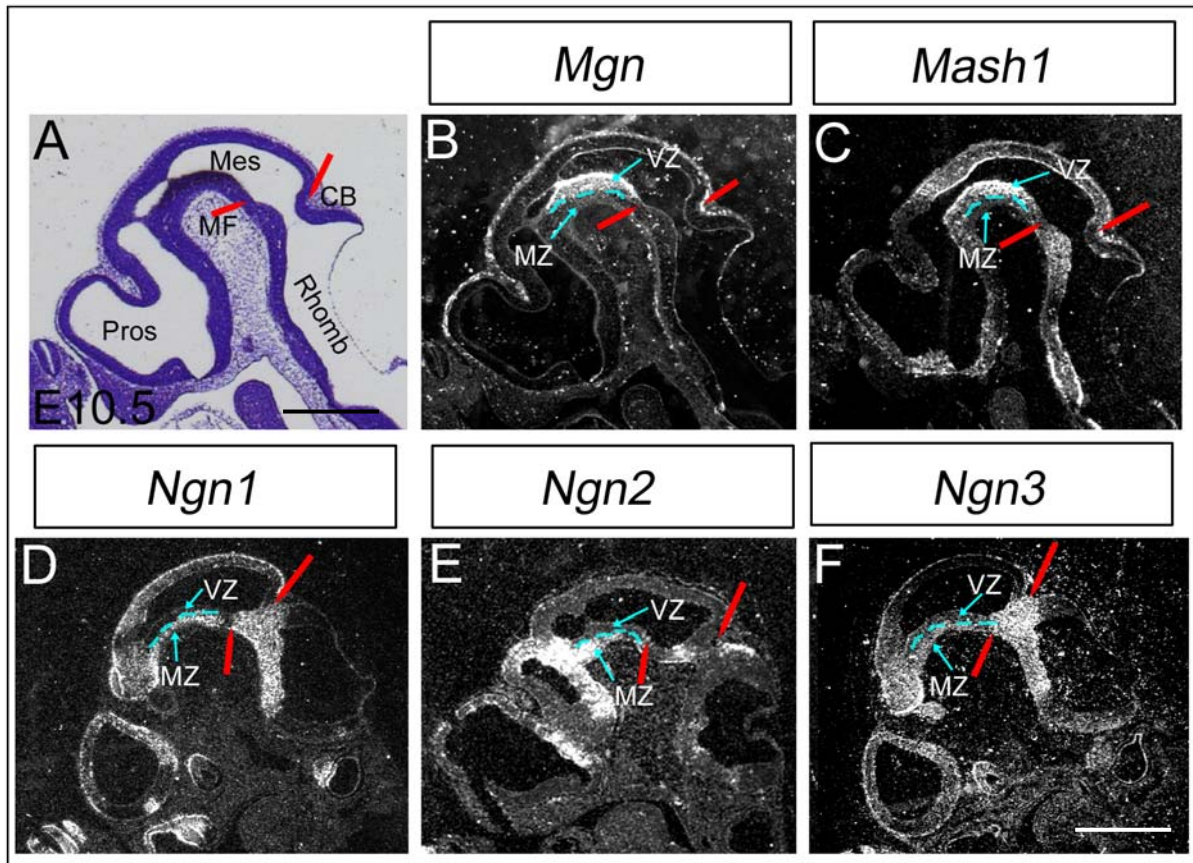


Abb. 49: *Mgn* und *Mash1* sind bei E10.5 im Mausembryo ko-exprimiert. Eine radioaktive ISH wurde mit Sonden gegen *Mgn* (B), *Mash1* (C), *Ngn1* (D), *Ngn2* (E), *Ngn3* (F) an sagittalen, konsekutiven Schnitten eines wildtypischen E10.5 Mausembryos durchgeführt. (A) stellt die Hellfeldaufnahme zu (B) dar. VZ und MZ sind durch türkise Linien getrennt und zusätzlich mit Pfeilen markiert. Vergleicht man (B) jeweils mit (C), (D), (E) und (F), erkennt man, dass *Mgn* und alle dargestellten bHLH Genen im ventralen Mittelhirn exprimiert werden. Nur die *Mgn* und *Mash1* Expression überlappt jedoch in der VZ. *Ngn1,2* und 3 sind im Gegensatz zu *Mgn*, das in der VZ exprimiert wird, in der MZ exprimiert. Rote Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. CB: cerebellare Anlage, Mes: Mesencephalon, MF: mesencephale Flexur, MZ: Mantelzone, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon, VZ: Ventrikulärzone. Der Maßstab beträgt 500 μm.

Basierend auf diesen initialen Daten wurde eine detaillierte Zeitreihe der Expression von *Mgn* und *Mash1* durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass beide Gene bereits bei E9.5 im ventralen Mittelhirn ko-exprimiert sind. Bei E12.5 ist *Mgn* in unterschiedlichen Regionen des Maushirns exprimiert und es lässt sich eine Ko-Expression der mit *Mash1* in spezifischen Regionen (ganglionische Eminenzen (ganglionic eminence), Epithalamus, Zona limitans intrathalamica (ZLI), Prethalamus (PTh) Pretectum, Tectum, ventrales Mesencephalon) feststellen (Abb. 50).

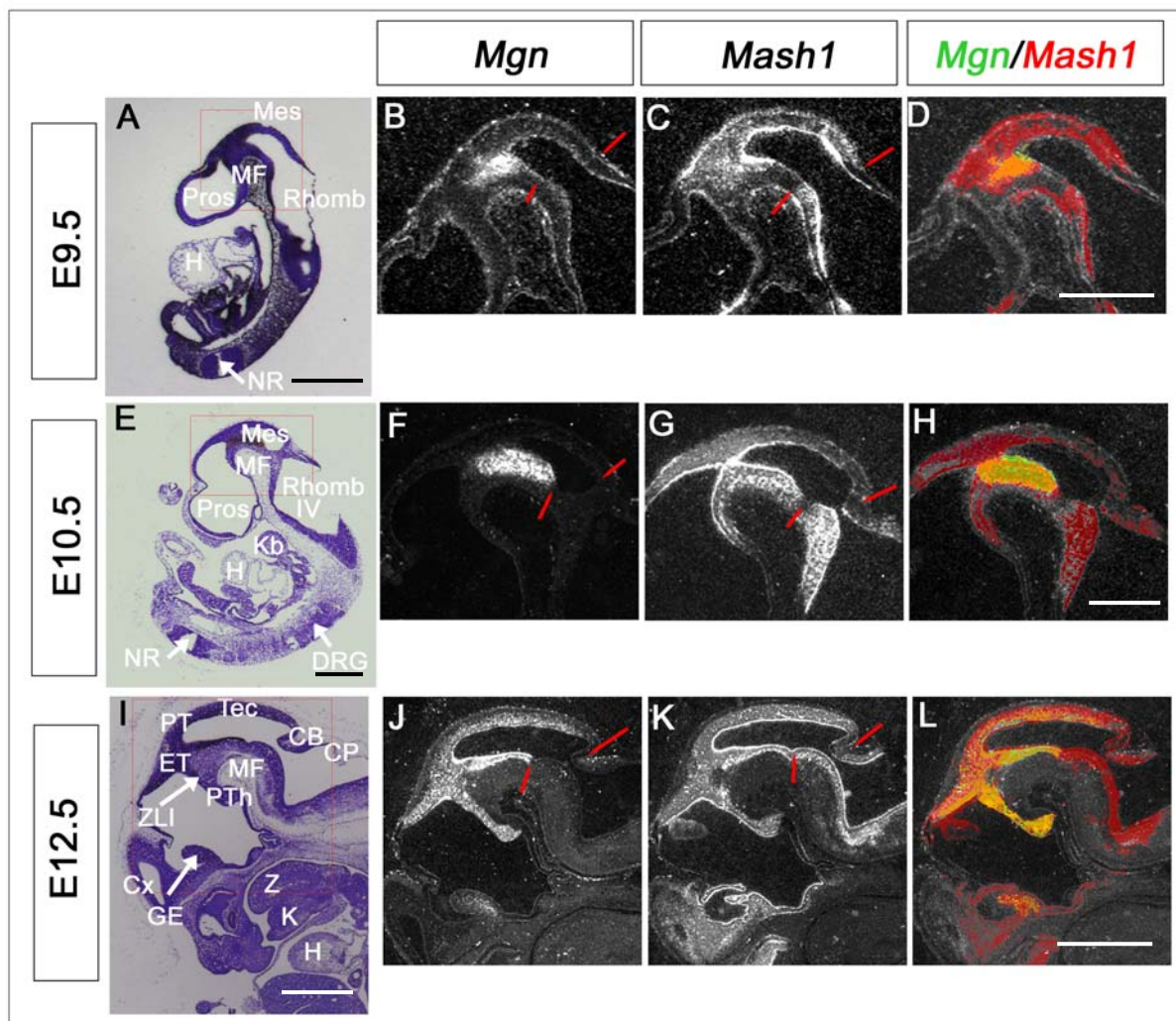


Abb. 50: *Mgn* und *Mash1* werden in verschiedenen Regionen des sich entwickelnden Mausembryos bei E9.5, E10.5 und E12.5 ko-exprimiert. Eine radioaktive *ISH* wurde an sagittalen, konsekutiven Schnitten von E9.5 (A-D), E10.5 (E-H) und E12.5 (I-L) wildtypischen Mausembryonen durchgeführt. Es wurden Proben gegen *Mgn* (B,F,J) und *Mash1* (C,G,K) verwendet, um die Expression beider Gene in den jeweiligen Stadien zu zeigen. (A,E,I) sind Hellfeldaufnahmen der Schnitte in (B,F,J). Das rote Rechteck markiert jeweils den

vergrößerten Bereich. Um die Überlappung der Expression besser zu erkennen, wurden Falschfarben-Überlagerungen der Expressionsdomänen angefertigt (**D,H,L**, *Mgn* Expression ist in grün, *Mash1* Expression in rot dargestellt, eine Überlappung der Expressionsdomänen ist in gelb dargestellt). Man erkennt, dass *Mgn* bei E9.5 im ventralen Mittelhirn exprimiert ist (**B**) und diese Expression mit *Mash1* vollständig überlappt (**D**). Bei E10.5 zeigt sich ein ähnliches Bild (**H**). Bei E12.5 ist *Mgn* in der ganglionic eminence (GE), im Epithalamus (ET), in der zona limitans intrathalamica (ZLI), im Prethalamus (PTh), im Pretectum (PT), im Tectum (Tec) (dorsales Mesencephalon) und im ventralen Mesencephalon exprimiert (**J**) und überlappt auch in diesen Hirnbereichen mit *Mash1* (**L**). IV: vierter Ventrikel, CB: cerebellare Anlage, CP: choroid plexus, Cx: Cortex, DRG: dorsal root ganglia (Spinalganglien), ET: Epithalamus, GE: ganglionic eminence, H: Herz, K: Kiefer, Kb: Kiemenbögen, Mes: Mesencephalon, MF: mesencephale Flexur, NR: Neuralrohr, PTh: Prethalamus, Pros: Prosencephalon PT: Pretectum, Rhomb: Rhombencephalon, Tec: Tectum, Z: Zunge. Der Maßstab beträgt 500 µm.

4.2.4.2 Expressionsmuster von *Mgn*, *Mash1* und dem GABAergen Marker *GAD67* im wildtypischen Mausembryo

Da gezeigt wurde, dass *Mash1* im Vorderhirn eine Rolle bei der Entstehung von GABAergen Neuronen spielt (Casarosa et al., 1999) und außerdem während der Entstehung dieser Arbeit eine Rolle von *Mgn* in der Entstehung von GABAergen Neuronen vorgeschlagen wurde (Guimera et al., in Vorbereitung, Miyoshi et al., 2004), wäre es möglich, dass die Interaktion zwischen *Mgn* und *Mash1* eine Rolle in der Spezifizierung dieses Neuronensubtyps spielen könnte. Daher untersuchte ich die räumliche Korrelation der Expression von *Mgn* und *Mash1* mit der Entstehung von GABAergen Neuronen im Mittelhirn bei E10.5 und E12.5. Die ersten GABAergen Neurone sind bei E10.5 im Diencephalon und im ventralen Mittelhirn mit Hilfe zweier terminaler Marker für diese Neuronen, *GAD65* oder *GAD67*, detektierbar. Diese Gene kodieren für zwei Isoformen des Enzyms GAD („glutamic acid decarboxylase“), das zuständig ist für die Synthese des Neurotransmitters GABA. Zunächst wurde die Expression beider Isoformen in wildtypischen Mausembryonen verglichen. Beide Marker zeigten das gleiche Expressionsmuster im embryonalen Maushirn bei E10.5 und E12.5 (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund beschränkte ich mich auf die Benutzung eines der beiden Marker für die weitere Analyse (*GAD67*).

Bei E10.5 sind *Mgn* und *Mash1* in der VZ des ventralen Mittelhirns ko-exprimiert. Zur gleichen Zeit beginnt in diesem Bereich die Differenzierung der ventralen GABAergen Neurone in der MZ. Bei E12.5 ist *Mgn* Expression in der Ventrikulärzone des ventralen und dorsalen Mesencephalons zu finden. Zusätzlich wird *Mgn* im Diencephalon (Epithalamus, zona limitans intrathalamica, Prethalamus, Pretectum) und im Telecephalon (ganglionische Eminenzen) exprimiert. Interessanterweise ist in allen Bereichen, in denen *Mgn* in der VZ exprimiert wird, auch der Marker für terminal ausdifferenzierte GABAerge Neurone, *GAD67*, in der MZ exprimiert, mit Ausnahme des Hypothalamus (Abb. 51). Jedoch lassen sich bei E12.5 auch *GAD67*-positive Zellen in Regionen, in denen *Mgn* nicht exprimiert wird, wie z.B. im Metencephalon, detektieren. *Mash1* Expression ist bei E12.5 nahezu ubiquitär im anterioren Neuralrohr zu finden und überlappt dadurch mit allen Bereichen der *Mgn* Expression in der VZ.

Dieses Expressionsmuster der drei Gene legt nahe, dass neuronale Vorläuferzellen, die *Mgn* und *Mash1* in der VZ exprimieren, im sich entwickelnden Maushirn zu GABAergen Neuronen in der MZ ausdifferenzieren.

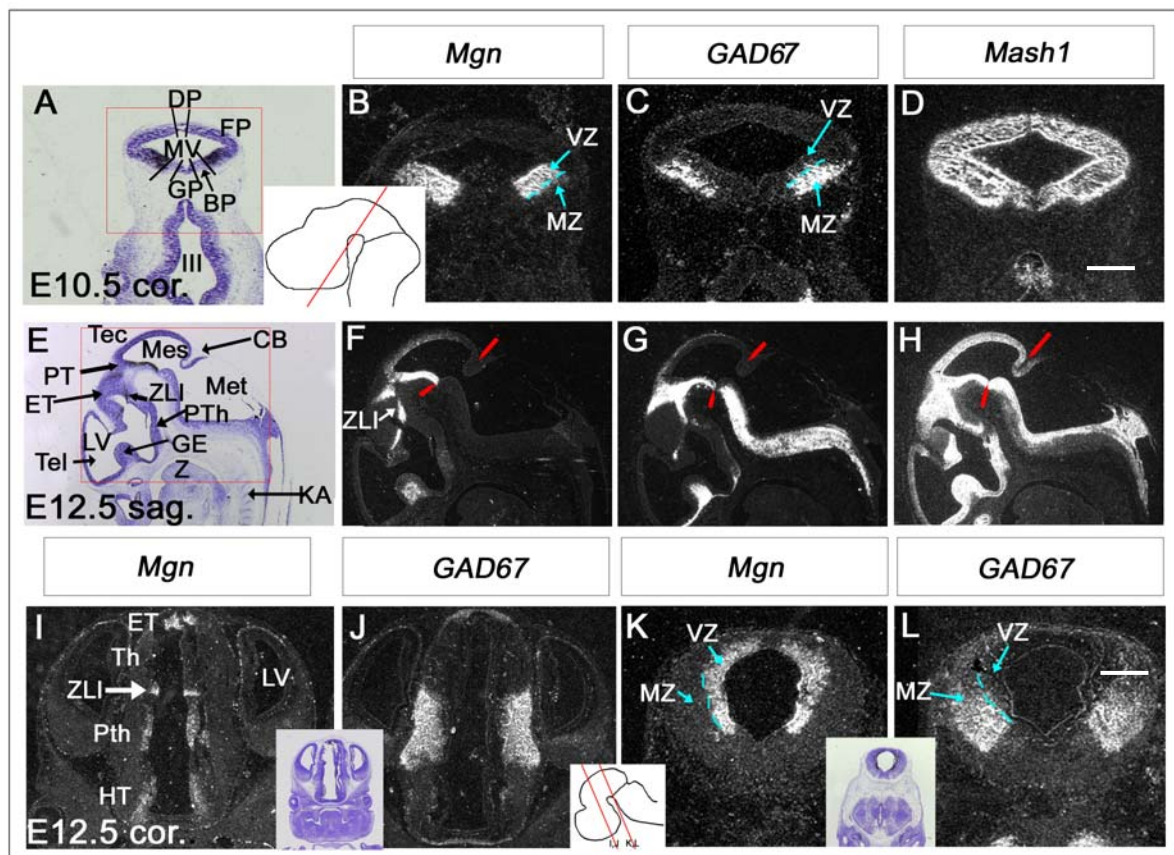


Abb. 51: Die Expression von *Mgn* und *Mash1* ist mit der Entstehung von GABAergen Neuronen im Mausembryo bei E10.5 und E12.5 in bestimmten Regionen korreliert. Eine radioaktive *ISH* wurde an konsekutiven, coronalen E10.5 (**A-D**), sagittalen E12.5 (**E-H**) und coronalen E12.5 (**I-L**) wildtypischen Mausembryonen durchgeführt. Es wurden Sonden gegen *Mgn* (**B,F,I,K**), *GAD67* (**C,G,J,L**) und *Mash1* (**D,H**) verwendet. (**A,E**) sind Hellfeld Aufnahmen der Schnitte in (**B,F**), die kleinen Einsätze in (**I/J**) und (**K/L**) sind Hellfeld-Aufnahmen der Schnitte in (**I,J**) bzw. (**K,L**). Das rote Rechteck markiert jeweils den vergrößerten Bereich. Bei (**I,J**) handelt es sich um Schnitte auf Höhe des Diencephalons, (**K,L**) sind Schnitte auf Höhe des Mes/Metencephalons. Die Einsätze in (**A/B**) bzw. (**J/K**) stellen die Schnittebene der entsprechenden Schnitte dar. Türkise Striche und Pfeile markieren die VZ und MZ. Bei E10.5 erkennt man, dass *GAD67* im ventralen Mittelhirn mit der *Mgn* Expression korreliert. *GAD67* befindet sich in der Mantelzone (**C**), *Mgn* hingegen in der VZ (**B**). Es findet sich auch eine vollständige Überlappung von *Mgn* und *GAD67* mit *Mash1* (**D**). Bei E12.5 ist *Mgn* in der ganglionic eminence (GE), in der ZLI, im Prethalamus (PTh), im Epithalamus (ET), im Pretectum (PT), im Tectum und im ventralen Mesencephalon exprimiert (**F,I,K**) und korreliert in diesen Regionen mit der *GAD67* Expression (**G,J,L**). In diesen Bereichen ist auch gleichzeitig Expression von *Mash1* zu finden (**H**). GABAerge Neurone entstehen jedoch auch in anderen Regionen, in denen *Mgn* nicht exprimiert ist, wohl aber *Mash1* (Metencephalon) (**F,G,H**). Rote Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. III: dritter Ventrikel, A: Auge, CB: cerebellare Anlage, BP: Basalplatte, Di: Diencephalon, DP: Deckplatte, ET: Epithalamus, FP: Flügelplatte, GE: ganglionic eminence, GP: Grundplatte, HT: Hypothalamus, LV: lateraler Ventrikel, KA: Knorpelanlagen, Mes: Mesencephalon, Met: Metencephalon, MZ: Mantelzone, PT: Pretectum, PTh: Prethalamus, Tec: Tectum, Tel: Telencephalon, , VZ: Ventrikulärzone, Z: Zunge, ZLI: zona limitans intrathalamica. Der Maßstab beträgt 500 µm.

4.2.4.3 Analyse des GABAergen Phänotyps in Knock-out Modellen von *Mgn* und *Mash1*

Basierend auf den Ergebnissen des Hefe Zwei-Hybrid Screens und der Expressionsstudie mit *Mash1* und *GAD67*, stellte ich die Hypothese auf, dass eine Interaktion von *Mgn* und *Mash1* eine Rolle in der Entstehung von GABAergen Neuronen spielen könnte. Dies wiederum bedeutet, dass beide Proteine für diesen Prozess notwendig wären. In der Tat war bereits bekannt, dass *Mash1* eine Rolle in der Entstehung von GABAergen Neuronen des Telecephalons spielt (Übersicht in Ross et al., 2003). Außerdem gab es aus unserer eigenen Gruppe und von der

Gruppe um Kageyama Hinweise darauf, dass auch *Mgn* eine Rolle in der Spezifizierung dieser Neuronen im Mausembryo spielen könnte (Guimera et al., in Vorbereitung, Miyoshi et al., 2004). Diese Studien wiesen jedoch die Notwendigkeit von *Mgn* im GABAergen Spezifizierungs-/Differenzierungsprozess nicht nach. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Interaktion von *Mgn* mit *Mash1* eine Rolle bei der Entstehung von GABAergen Neuronen spielen könnte, analysierte ich das Vorhandensein von GABAergen Neuronen sowohl in *Mgn* als auch in *Mash1* Knock-out Mäusen (Abb. 52 und 53).

Die *Mgn* KO Maus wurde von Dr. Jordi Guimera am Institut für Entwicklungsgenetik des GSF Forschungszentrums hergestellt. Dabei wurde die bHLH Domäne, die wichtig sowohl für die DNA-Bindung als auch für die Dimerisierung mit anderen Proteinen ist, deletiert (Guimera et al., unveröffentlicht). Bei E10.5 war in der *Mgn* KO Maus (*Mgn*^{-/-}) eine starke Reduktion der Marker für ausdifferenzierte GABAerge Neurone *GAD67* und *GAD65* (Daten nicht gezeigt) im ventralen Mittelhirn zu erkennen (Abb. 52).

Bei E10.5 als auch bei E13 und E18 ist in der *Mgn* KO Mausmutante die *GAD67/65* Expression im ventralen Mesencephalon reduziert, während die Expression im dorsalen Mesencephalon (superiore Colliculi) und dorsalen Diencephalon (Pretectum) komplett fehlt. In anderen Regionen (Telencephalon (ganglionische Eminenzen), ventrales Diencephalon (Prethalamus) und Metencephalon) ist die *GAD67* Expression in einem Ausmaß vergleichbar mit dem Kontrolltier (wildtypisches Geschwistertier) vorhanden. Dies bedeutet, dass terminal differenzierte GABAerge Neurone nicht in allen Regionen fehlen, in denen *Mgn* und *Mash1* ko-exprimiert werden.

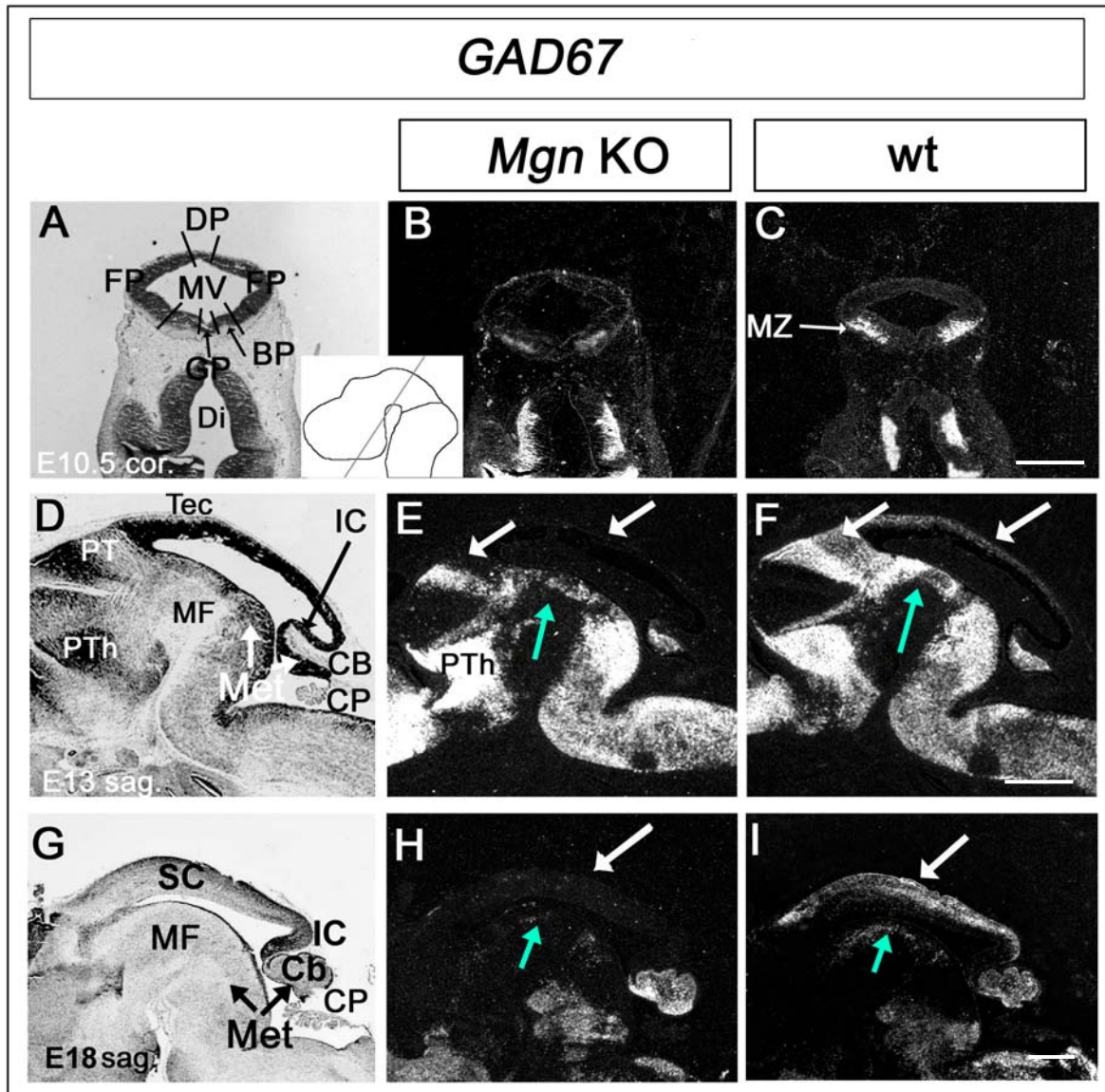


Abb. 52: Die Inaktivierung des *Mgn* Gens führt zu einem spezifischen Verlust der *GAD67* Expression des Mes- und Diencephalons und zu einer Reduktion der Expression im Mesencephalon. Eine radioaktive *ISH* wurde mit der Probe gegen *GAD67* an coronalen Schnitten von *Mgn* KO (**B**) bzw. Wildtyp (**C**) Embryonen bei E10.5, an sagittalen Schnitten von E13 (**E**) bzw. Wildtyp (**F**) Embryonen, und an E18 *Mgn* KO (**H**) bzw. Wildtyp Embryonen (**I**) durchgeführt. (**A,D,G**) sind Hellfeldaufnahme jeweils zu (**B,E,H**). Der Einsatz in (**A,B**) zeigt die Schnittebene der coronal geschnittenen E10.5 Embryonen. Im Vergleich zum Wildtyp (**C**) ist die *GAD67* Expression des ventralen Mesencephalons bei E10.5 in der *Mgn* KO Maus stark reduziert (**B**). Bei E13 und E18 fehlt *GAD67* Expression im dorsalen Mesencephalon (superiore Colliculi) und im dorsalen Diencephalon (Pretectum) (**E,H**; weisse Pfeile), im Vergleich zum Wildtyp (**F,I**, weisse Pfeile). Die Expression von *GAD67* im ventralen Mesencephalon ist bei E13 und E18 stark reduziert (türkise Pfeile in

E,H). In anderen Regionen (Prethalamus, Metencephalon) ist mit dem Wildtyp vergleichbare Expression von *GAD67* festzustellen (**E,F**). BP: Basalplatte, CB: Cerebellare Anlage, CP: choroid plexus, Di: Diencephalon, DP: Deckplatte, FP: Flügelplatte, GP: Grundplatte, IC: inferiore colliculi, Met: Metencephalon, MF: mesencephale Flexur, MV: mesencephaler Ventrikel, MZ: Mantelzone, PT: Pretectum, PTh: Prethalamus, SC: superiore colliculi, Tec: Tectum. Der Maßstab beträgt 500 µm.

Bei der Konstruktion der *Mash1* KO Maus wurde fast die gesamte *Mash1* cDNA deletiert (Guillemot et al., 1993). In Analogie zu der *Mgn* KO Maus, ist in der *Mash1* KO Maus (*Mash1*^{-/-}) bei E10.5 die *GAD67* und *GAD65* Expression (nicht gezeigt) im ventralen Mesencephalon stark reduziert. Bei E12.5 ist die Expression in dieser Region ebenfalls reduziert, während die Expression im dorsalen Mesencephalon (Tectum) und im dorsalen Diencephalon (Pretectum) komplett fehlt. Im ventralen Telencephalon (ganglionische Eminenzen) fehlt *GAD67* Expression, was bereits publiziert ist (Casarosa et al., 1999). In anderen Regionen hingegen (Prethalamus, Metencephalon) ist Expression in normalem Ausmaß vorhanden (Abb. 24).

Somit fehlt die *GAD67* Expression in der *Mash1* KO Maus ebenso wie in der *Mgn* KO Maus in spezifischen Regionen (Tectum und Pretectum) bzw. ist im ventralen Mesencephalon reduziert. Dies zeigt, dass beide Gene in diesen spezifischen Regionen für die Entstehung von GABAergen Neuronen notwendig sind. Ob dies auf eine Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist, lässt sich durch die Analyse der beiden KO Mäuse jedoch nicht zeigen.

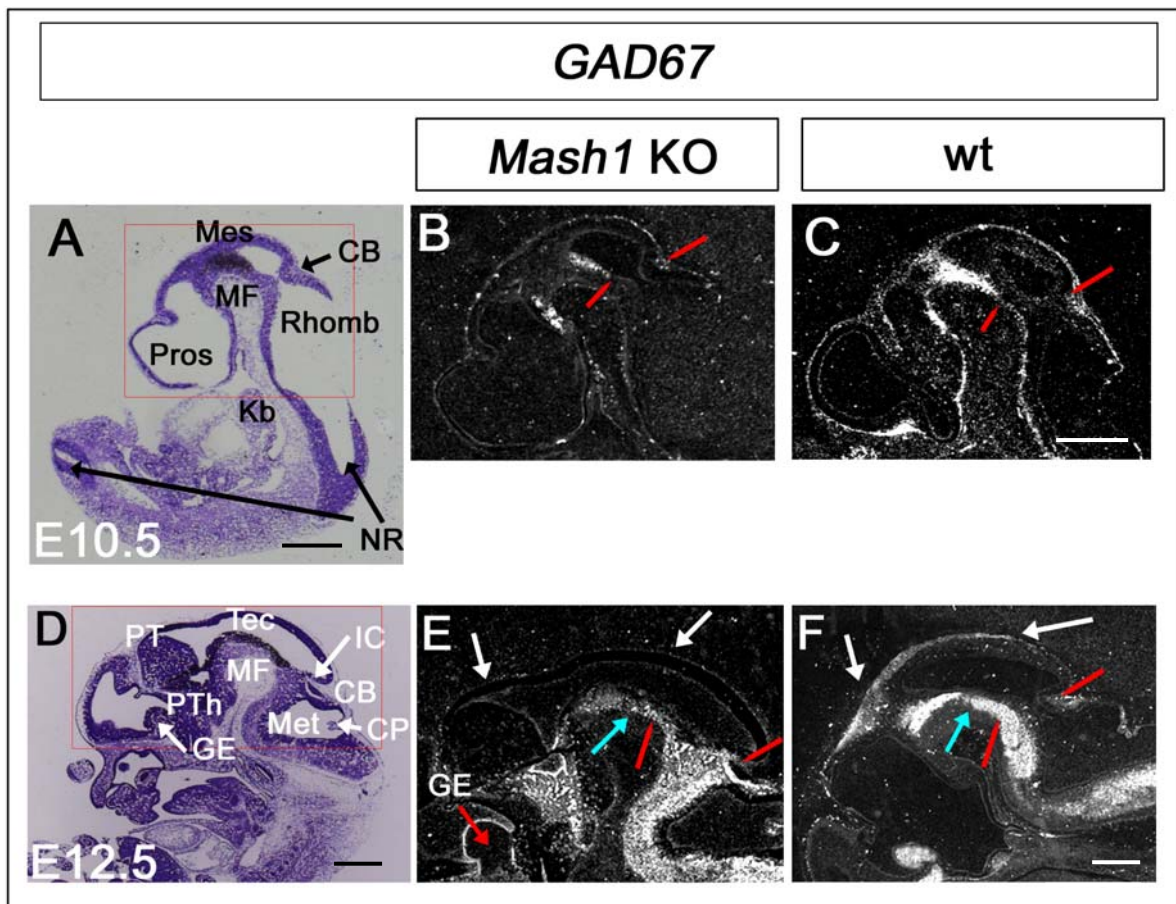


Abb. 53: Dorsale GAD67 Expression des Mesencephalons und Diencephalons fehlt in *Mash1* KO Embryonen, ventrale expression im Mesencephalon ist stark reduziert. Eine radioaktive *ISH* mit der Probe gegen *GAD67* wurde an einem sagittalen Schnitt einer *Mash1* KO Maus bei E10.5 (**B**) bzw. E12.5 (**E**) und an einem vergleichbaren Schnitt einer wildtypischen Maus bei E10.5 (**C**) bzw. E12.5 (**F**) durchgeführt. (**A,D**) sind Hellfeldaufnahmen zu (**B**) bzw. (**E**). Die roten Rechtecke markieren jeweils den vergrößerten Bereich. Im ventralen Mittelhirn ist bei E10.5 in der *Mash1* KO Maus die *GAD67* Expression reduziert (**B,C**). Bei E12.5 fehlt die *GAD67* Expression des Mesencephalons (superiore Colliculi) und des Pretectums (Diencephalon) im Vergleich zum Wildtyp, und die Expression im ventralen Mesencephalon ist reduziert (türkise Pfeile) (**E,F**). Zusätzlich fehlt auch die *GAD67* Expression in den ganglionischen Eminenzen (roter Pfeil). Im ventralen Diencephalon (Prethalamus) ist hingegen Expression vorhanden (**E**), ist im Wildtyp jedoch aufgrund der Schnittebene nicht zu erkennen. Rote Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. CB: cerebellare Anlage, CP: choroid plexus, IC: inferiore colliculi, Kb: Kiemenbögen, GE: ganglionic eminence, Met: Metencephalon, Mes: Mesencephalon, MF: mesencephale Flexur, NR: Neuralrohr, Pros: Prosencephalon, PT: Pretectum, PTh: Prethalamus, Rhomb: Rhombencephalon, Tec: Tectum. Der Maßstab beträgt 500 μm .

4.2.5 Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung von *Mgn* und *Mash1* auf transkriptioneller Ebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von *Mgn* und *Mash1* in den Vorläuferzellen der VZ des dorsalen und ventralen Mittelhirns überlappt und dieses Expressionsmuster der beiden bHLH Gene offenbar mit der Entstehung des GABAergen Phänotyps korreliert, wurde die Möglichkeit überprüft, ob diese beiden Faktoren (*Mgn* und *Mash1*) nicht nur als Proteine interagieren, sondern auch auf transkriptioneller Ebene, d.h. ob sie sich gegenseitig regulieren.

Dazu untersuchte ich in der *Mash1* KO Maus die *Mgn* Expression und in der *Mgn* KO Maus die *Mash1* Expression. Beide Gene waren in den beiden KO Mäusen zu dem Zeitpunkt bei dem die GABAerge Differenzierung beginnt, in ihrer Expression unverändert (Abb. 54). Dies bedeutet, dass die Expression/Transkription von *Mgn/Mash1* unabhängig voneinander erfolgt und beide Faktoren offenbar nur auf Proteinebene miteinander interagieren.

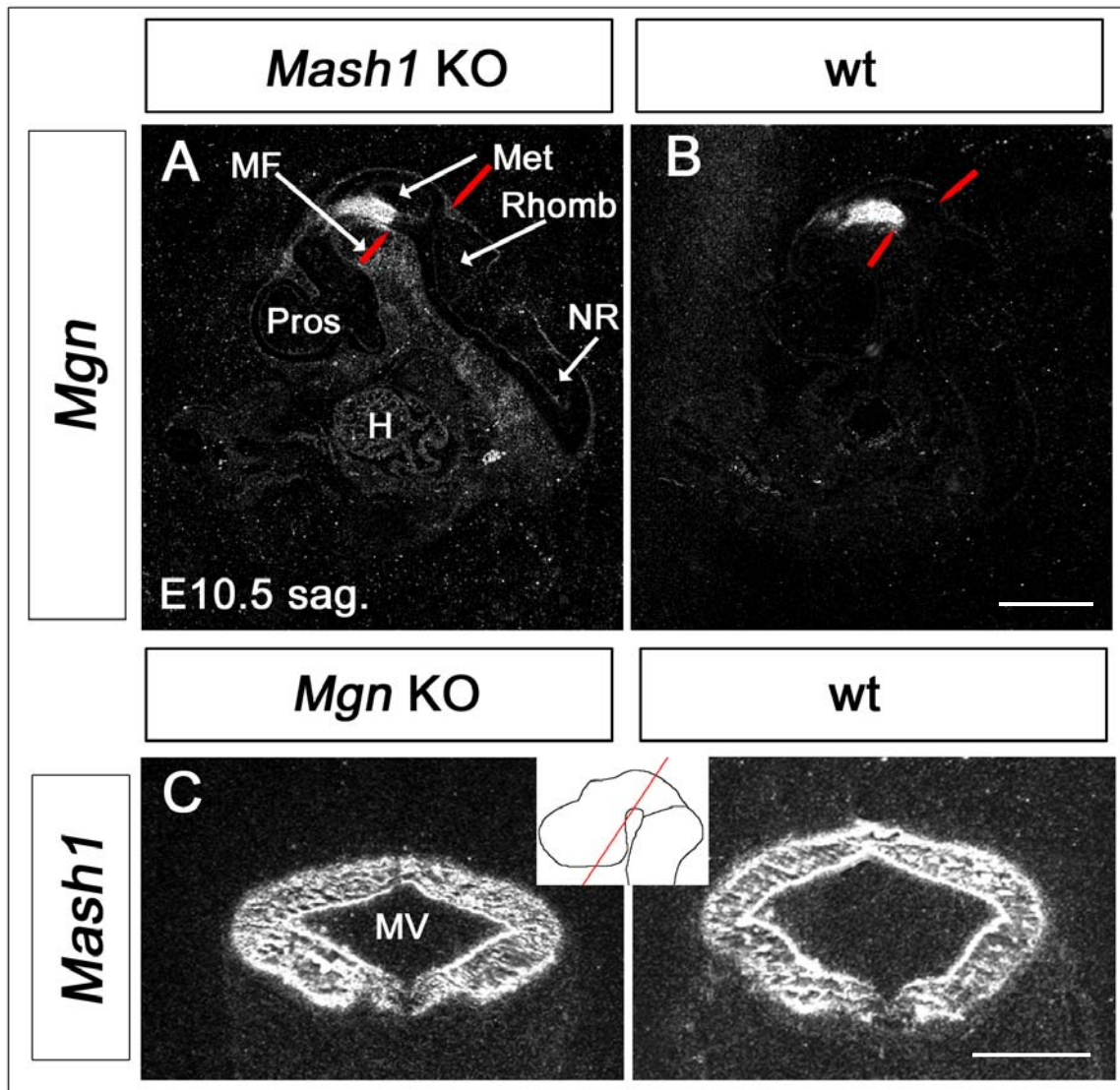


Abb. 54: Die Expression von *Mgn* ist in *Mash1* KO Mäusen unverändert. Die *Mash1* Expression ist in *Mgn* KO Mäusen unverändert. Eine radioaktive ISH mit der Sonde gegen *Mgn* wurde an sagittalen Schnitten von E10.5 *Mash1* KO Embryonen (A) im Vergleich zu einem wildtypischen Embryo an einem vergleichbaren Schnitt (B) durchgeführt. Eine ISH mit der Sonde gegen *Mash1* wurde an coronal geschnittenen E10.5 *Mgn* KO Embryonen (C) im Vergleich zu einem wildtypischen Embryo an einem vergleichbaren Schnitt (D) durchgeführt. Es zeigt sich, dass die Expression beider Gene im KO des jeweils anderen Gens nicht verändert ist. Rote Pfeile markieren die ventrale und dorsale MHG. Der Einsatz zeigt die Schnittebene der coronalen Schnitte. H: Herz, MF: mesencephale Flexur, Met: Metencephalon, MV: mesencephaler Ventrikel, NR: Neuralrohr, Pros: Prosencephalon, Rhomb: Rhombencephalon. Der Maßstab beträgt 500 μ m.

Insgesamt konnte ich zeigen, dass das Mgn Protein mit dem Mash1 Protein *in vitro* interagiert. Diese Interaktion könnte *in vivo* ebenfalls eine Rolle spielen, da die Expression der entsprechenden beiden Gene räumlich und zeitlich überlappt. Gleichzeitig korreliert die *Mgn* und *Mash1* Expression in bestimmten Regionen des Neuroepithels der sich entwickelnden Maus mit der Expression von *GAD67/65*. *Mgn* und *Mash1* KO Mäuse zeigen eine vergleichbare Deletion der terminalen GABAergen Marker *GAD67/65* im dorsalen Mes- und Diencephalon, während die Expression im ventralen Mesencephalon stark reduziert ist. In anderen Regionen des Gehirns jedoch ist die Expression beider Marker in normalem Ausmaß vorhanden. Dies weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen Mgn und Mash1 spezifisch im Mittelhirn und dorsalen Diencephalon eine Rolle in der Entstehung des GABAergen Phänotyps spielt, und damit beide Gene gleichermaßen notwendig sind. In anderen Regionen jedoch, in denen beide Gene ko-exprimiert sind (Telencephalon, ventrales Diencephalon), sind GABAerge Neurone in normalem Ausmaß vorhanden und in diesen Regionen spielt Mgn vermutlich keine notwendige Rolle in der Entstehung von GABAergen Neuronen.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Aspekte der Entwicklung des ZNS, speziell in der Mittel-/Hinterhirnregion (MHR) untersucht.

1. wurde die Rolle des *Fgfr2* im Musterbildungsprozess in der MHR anhand einer konditionalen Mausmutante untersucht. Diese Mutante zeigte jedoch unerwarteterweise keinen Phänotyp, was durch eine funktionelle Redundanz mit dem *Fgfr1* erklärt werden könnte. Diese Hypothese wurde durch die Analyse von konditionalen Doppelmutanten bestätigt.

2. wurde untersucht, inwiefern ein neu identifiziertes bHLH Gen (*Mgn*) an der Neurogenese in dieser Region beteiligt ist. Es wurde gezeigt, dass das Mgn Protein mit einem weiteren bHLH Protein (*Mash1*) interagiert, und dass diese Interaktion möglicherweise für die Ausbildung des terminalen GABAergen Phänotyps im Tectum und Pretectum notwendig ist.

5.1 Die Rolle des *Fgf* Rezeptor 2 in der Musterbildung der MHR

5.1.1 Expression der *Fgf* Rezeptoren 1-4 in der Mittel-/Hinterhirnregion

Dem sezernierten Protein *Fgf8* wird eine Schlüsselrolle in der embryonalen Musterbildung der zukünftigen Mittel-/Hinterhirnregion (MHR) zugewiesen. Auf der Suche nach dem *Fgf* Rezeptor (*Fgfr*), der das *Fgf8* Signal transduziert, wurden Expressionsstudien durchgeführt, die zeigten, dass der *Fgfr1* der einzige *Fgfr* ist, der in enger räumlicher Nähe zu der *Fgf8* Expressionsdomäne an der Mittel-/Hinterhirngrenze (MHG) exprimiert wird (Ishibashi and McMahon, 2002; Liu et al., 2003; Trokovic et al., 2003). Hingegen wies die Expression der *Fgf* Rezeptoren (*Fgfrs*) 2 und 3 eine Lücke an der MHG und damit zur *Fgf8* Expression hin auf. Basierend auf diesen Expressionsdaten, wurde dem *Fgfr1* als einzigem der *Fgfrs* eine Rolle in der *Fgf8* Signalweiterleitung an der MHG zugesprochen. Da der konventionelle Knock-out (KO) des *Fgfr1* einen frühen letalen Phänotyp aufwies, wurde die konditionale Mausmutagenese angewandt, um die Funktion dieses *Fgf* Rezeptors in der MHR zu untersuchen. Mit Hilfe der *En1^{Cre/+}* Maus wurde eine

konditionale *Fgfr1* KO-Maus in der MHR hergestellt. In dieser Maus sind die dorsalen Bereiche der MHR (inferiore Colliculi und Cerebellum) deletiert. Im Gegensatz dazu fehlen in der konditionalen *Fgf8* KO Maus, in der *Fgf8* ebenfalls mittels der *En1^{Cre/+}* Maus in der MHR deletiert wurde, sowohl dorsale als auch ventrale Strukturen der MHR. Da in der konditionalen *Fgf8* KO Maus der Gewebeverlust auch ventrale Strukturen umfasst, müssen außer dem *Fgfr1* noch weitere Fgf Rezeptoren an der Transduktion des *Fgf8* Signals im ventralen Teil der MHR beteiligt sein. Daher führten wir mit Fokus auf die MHR eine detaillierte Expressionsstudie der Fgfrs mittels der sehr sensitiven radioaktiven *in-situ* Hybridisierung (*ISH*) an mehreren Embryonalstadien durch, welche kritisch für die Musterbildung der MHR sind.

Es stellte sich heraus, dass der *Fgfr1*, wie bereits berichtet, von E8.5 bis E12.5 ubiquitär im gesamten Neuralrohr exprimiert wird und somit zu jeder Zeit mit der Expression von *Fgf8* und *En1* überlappt.

Der *Fgfr2* wurde, im Gegensatz zu den bekannten Daten, sehr früh (ab E8.5) im Mittelhirn an die *Fgf8* Expression an der MHG angrenzend exprimiert. Im Hinterhirn schloss die Expression ab E9.5 ventral an die MHG an. Dorsal war, wie zuvor berichtet, ab E9.5 eine Lücke in der Expression des *Fgfr2* vorhanden. Diese schloss sich jedoch bis E12.5 fast vollständig von ventral nach dorsal. Bemerkenswert war die sehr spezifische Expression des *Fgfr2* in der gesamten Grundplatte der MHR. Im anterioren Hinterhirn ist der *Fgfr2* somit genau an der Stelle exprimiert, an der die *Fgf8* Expression eine Lücke in der Grundplatte aufweist (Crossley und Martin, 1995).

Die *Fgfr3* Expression wies, wie ebenfalls in der Literatur berichtet, eine Lücke an der MHG auf. Jedoch war diese kleiner als beschrieben. Die *Fgfr3* Expression reichte im ventralen Hinterhirn bereits ab E8.5 an die MHG heran während sie im ventralen Mittelhirn die *Fgf8* Expression bis E12.5 nicht vollständig erreichte. Interessanterweise überlappte die *Fgfr3* Expression bei E12.5 sogar mit der *Fgf8* Expression.

Die Diskrepanz zwischen unseren und den veröffentlichten Daten könnte darauf beruhen, dass wir die sehr sensitive radioaktive *ISH* als Methode zur Detektion der Expressionsdomänen auf Schnitten verwendet haben. Diese Methode ist zur Zeit der auf einer Farb-Präzipitationsreaktion beruhenden sog. „kalten“ *in situ* Hybridisierung vorzuziehen, insbesondere wenn es um die Detektion von schwach exprimierten Genen und/oder kleinste Expressionsdomänen geht. Die in der Literatur publizierten Daten bezogen sich außerdem meist auf Ganzkörper-Präparate (sog. „whole-mount“

in-situ), die eine geringere histologische Auflösung der Expressionsdomänen erlauben als Schnitte. Diese Einschätzung bezüglich der Sensitivität der beiden Techniken wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt, da neben den in der kalten *ISH* bereits detektierten Expressionsdomänen weitere, zusätzliche Expressionsdomänen beobachtet werden konnten.

5.1.2 Besitzt *Fgf8* eine repressive Wirkung auf die *Fgfrs*?

Basierend auf den kalten *in-situ* Daten und *in vitro* Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass *Fgf8* die Expression des *Fgfr2* und des *Fgfr3* unterdrückt, nicht jedoch die des *Fgfr1* (Liu et al., 2003). In der Tat überlappt die Expression des *Fgfr1* mit der *Fgf8* Expression. Expression des *Fgfr2* hingegen ist in den Bereichen, in denen *Fgf8* exprimiert wird, nicht nachweisbar. Die *Fgfr2* Expression reicht jedoch unmittelbar an das *Fgf8* Signal heran und ist interessanterweise entlang des MHO in der Grundplatte angrenzend an die *Fgf8* Expression erkennbar. Geht man davon aus, dass *Fgf8* ein sezerniertes Molekül ist und über mehrere Zelldurchmesser hinweg diffundieren kann, würde eine reprimierende Wirkung von *Fgf8* auf den *Fgfr2* eine Lücke in seiner Expression zur Folge haben. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die Diskrepanz zu der publizierten *in vitro* Studie ließe sich dadurch erklären, dass diese im caudalen Diencephalon durchgeführt wurde, welches möglicherweise eine andere Regulation der *Fgfr2* Expression aufweist.

Im Gegensatz zu den angrenzenden Expressionsdomänen von *Fgfr2* und *Fgf8*, überlappt die Expressionsdomäne des *Fgfr3* im Hinterhirn sogar mit der von *Fgf8*, was ebenfalls nicht auf eine Repression durch *Fgf8* im Hinterhirn schließen lässt. Die Hypothese, dass *Fgf8* den *Fgfr3* reprimiert beruht neben den *in vitro* Studien (Liu et al., 2003) auch auf Beobachtungen im Zebrafisch. So ist in der sog. „*Acerebellar*“ Mutante, in der ein hypomorphes Allel von *Fgf8* exprimiert wird, die *Fgfr3* Expression aufgrund der verminderten *Fgf8* Signalgebung ins caudale Mittelhirn verschoben (Sleptsova-Friedrich et al., 2001). Gleichzeitig hierzu geht aber in dieser Region auch die *En1* Expression verloren (Reifers et al., 1998). Interessanterweise folgt in unseren Studien die *Fgfr3* Expression in der MHR eng dem *En1* Signal nach. Die *En1* Expression zieht sich im Laufe der Embryonalentwicklung aus der VZ in die MZ der MHR zurück, und komplementär dazu wird der *Fgfr3* exprimiert. Die beiden

Expressionsdomänen überlappen also während der Entwicklung der MHR nicht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in der MHR eher *En1* die *Fgfr3* Expression reprimiert als *Fgf8* selbst. Eine regionenabhängige Beteiligung von *Fgf8* an der reprimierenden Wirkung auf den *Fgfr3* ist jedoch nicht auszuschließen, insbesondere deshalb, da im Mittelhirn die *Fgfr3* Expression zu jeder Zeit (E8.5-E12.5) eine Lücke zur *Fgf8* Expression an der MHG aufweist.

5.1.3 Welcher *Fgfr* vermittelt die musterbildende Funktion von *Fgf8* an der MHG?

Die dargestellten Expressionsdaten werfen ein völlig neues Licht auf die Interpretation der Daten jener konditionalen Mutanten, in der spezifisch der *Fgfr1* an der MHG inaktiviert wurde (Trokovic et al., 2003). Es ist aufgrund des von uns gefundenen Expressionsmusters vorstellbar, dass in den ventralen Bereichen der MHR nicht der *Fgfr1*, sondern der *Fgfr2* alleine (oder gemeinsam mit dem *Fgfr1*) das musterbildende Signal von *Fgf8* weiterleitet. Auch könnte der *Fgfr2* eine Rolle in der Spezifizierung der ventralen neuronalen Populationen (dopaminerge und serotonerge Neuronen) der MHR spielen. Speziell deshalb, weil gezeigt werden konnte, dass diese beiden Populationen durch *Fgf* Signale induziert werden können (Ye et al., 1998, Heynes und Rosenthal, 1999), sie aber in der konditionalen *Fgfr1* Mutanten nicht verändert sind. Eine Funktion des *Fgfr3* in der Spezifizierung dopaminergener Neurone kann höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da er erst nach deren Spezifizierungsphase (Ye et al., 1998) im Mittelhirn exprimiert wird (Blak et al., 2005). Hingegen könnte der *Fgfr3* aber aufgrund der im Hinterhirn an die *Fgf8* Expression eng angrenzenden Expression ab E8.5, sehr wohl auch eine Rolle in der Spezifizierung der serotonergenen Neurone des rostralen Hinterhirns spielen.

5.1.4 Die konditionale $En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}$ Mutante

5.1.4.1 Technische Aspekte

Um die mögliche ventrale Funktion des $Fgfr2$ in der Weiterleitung des Fgf8 Signals am MHO zu untersuchen, wurde der $Fgfr2$ analog zur konditionalen $Fgfr1$ Mutante in der MHR mittels konditionaler Mutagenese deletiert und die frühe Musterbildung dieser Region, sowie die Entwicklung von neuronalen Subpopulationen (insbesondere der DA Neurone) wurde im ventralen Mittelhirn untersucht.

Zu diesem Zweck wurde eine Maus verwendet, in der die Cre Rekombinase in den $En1$ Locus eingeführt worden war ($En1^{Cre/+}$). $En1$ wird bereits im 1-Somiten-Stadium in der späteren Mittel-/Hinterhirn Region exprimiert, es vergeht jedoch einige Zeit (mehrere Stunden) bis die Cre Rekombinase vollständig aktiv ist (Nagy et al., 2000). Tatsächlich war in der konditionalen $Fgfr2$ Mutante ($En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}$) das gefloخته fünfte Exon bei 8 Somiten in der MHR noch nicht vollständig deletiert, wie ich mit einer speziellen *in-situ* Sonde zeigen konnte. Höchstwahrscheinlich ist das Exon 5, ab einem Stadium von etwa 10 Somiten vollständig deletiert, da ich zeigen konnte, dass in diesem Stadium die Cre Rekombinase hoch aktiv ist. Diese Beobachtung deckt sich auch mit veröffentlichten Daten (Li et al., 2002). In der adulten Maus schließlich konnte mittels PCR an Gewebe der MHR eindeutig bewiesen werden, dass in dieser Region das fünfte Exon des $Fgfr2$ in der genomischen DNA fehlt.

Die Deletion von Exon 5 führt zu einer Leserasterverschiebung und frühzeitigen Abbruch der Translation, was wiederum in einer trunkierten Form des Rezeptors resultiert. Diesem trunkierten Rezeptor fehlen der gesamte Transmembran- und der cytoplasmatische Teil, wodurch der Rezeptor, inklusive aller Spleißvarianten, inaktiviert wird. Es ist hier jedoch zu beachten, dass eine frei diffusible Form des Rezeptors noch gebildet werden könnte, die eine trunkierte Fgf Bindestelle besitzt. Dieser trunkierte Rezeptor könnte eine dominant negative Funktion auf die Fgf Signaltransduktion allgemein ausüben, wie für mutante Formen der Fgfrs 2 und 3 gezeigt wurde (Liu et al., 2003). Da jedoch die Fgf Signaltransduktion in der MHR der konditionalen Mutante nicht verändert war, ist dies eher unwahrscheinlich.

5.1.4.2 Analyse der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Mutante: kein veränderter Phänotyp

Die konditionalen *Fgfr2* KO Mäuse überleben ins Erwachsenenalter und sind fertil. Der Effekt der Deletion des *Fgfr2* auf die Musterbildung in der MHR wurde an embryonalen Stadien (E10.5 und E12.5) der mutanten *Fgfr2* Mäuse untersucht. Erwartet wurden, speziell im ventralen Bereich der MHR, Veränderungen in der Genexpression, welche analog zu den Veränderungen in der konditionalen *Fgfr1* Mutante z.B. der Verlust von *Gbx2*, *Pax2* und *En1* Expression sowie eine offensichtliche Veränderung der Stärke der *Wnt1* Expression, sein könnten (Trokovic et al., 2003). Jedoch waren weder diese Marker noch andere, die auf eine veränderte Musterbildung in der MHR hinweisen könnten in ihrem Expressionsmuster und/oder -stärke verändert.

Auch die histologische Integrität des Gewebes in der MHR wurde untersucht. Mit den Markern *TH*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1* und *Pou4f1* ließ sich nachweisen, dass das ventrale Mittelhirn korrekt regionalisiert wird. Besonderes Augenmerk wurde hier auch auf die Expression von *Shh* an der MHG gelegt, als Marker für die Grund- und Basalplatte in der der *Fgfr2* spezifisch exprimiert wird. Jedoch zeigte auch diese Expression keine Veränderung. Somit ist die histologische Integrität der Grundplatte durch die Deletion des *Fgfr2* nicht beeinflusst.

Die Untersuchung von neuronalen Subpopulationen (GABAerge, dopaminerge, serotonerge, noradrenerge Neuronen und der Motoneurone der Nuclei des dritten und vierten Hirnnerven) untermauerte die histologische Integrität der MHR, da auch die Expression der terminalen Marker für diese Subpopulationen nicht verändert waren. Außerdem konnte dadurch ein spezifischer Effekt des *Fgfr2* in der Spezifizierung der dopaminergen und der in Rhombomer 1 entstehenden serotonergen Neurone der Raphe Nuclei ausgeschlossen werden.

Da der *Fgfr2* nicht nur im embryonalen Gewebe sondern auch während späterer Entwicklungsstadien und im adulten Gehirn der Maus exprimiert wird (eigene Daten) könnte er einen Einfluss auf die späte Entwicklung bzw. die Aufrechterhaltung dieser Region haben. Jedoch haben unsere Analysen der adulten MHR gezeigt, dass auch im adulten Tier weder die histologische noch die zelluläre Integrität der Region gestört ist.

Diese Tatsache schließt jedoch nicht aus, dass dennoch subtile Veränderungen in den adulten Mutanten vorhanden sein könnten. Z.B. wären Unterschiede die

axonalen und/oder dendritischen Verzweigungen der Neurone betreffend denkbar. Tatsächlich konnte ich zeigen, dass der *Fgfr2* im adulten Maushirn in den Faserschichten des Cerebellums und der superioren und inferioren Colliculli exprimiert wird und außerdem vor kurzem gezeigt werden konnte, dass Fgf2 einen positiven Effekt auf die Verzweigung von Axonen hat (Übersichtsartikel Reuss und Bohlen und von Halbach, 2003). Spezifisch konnte auch gezeigt werden, dass Fgf8 das Axonenwachstum der Neuronen des vierten Hirnnerven reguliert (Irving et al., 2002). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch eine Beobachtung im Fadenwurm *C. elegans*, in dem der dort vorkommende einzige Fgfr das Auswachsen von Axonen und die Aufrechterhaltung derer Position beeinflusst (Bulow et al., 2004). Dieser Effekt könnte durch den Fgfr2 vermittelt werden, und eine Veränderung aufgrund seines Fehlens wäre mit unserer Analyse nicht detektierbar gewesen. Erst Verhaltensanalysen und sehr detaillierte morphologische Analysemethoden würden einen solchen Phänotyp detektieren.

Eine weitere Rolle des *Fgfr2* könnte die Vermittlung eines generellen neurotrophen oder neuroprotektiven Effekts auf die DA Neuronen oder andere Neuronenpopulationen im adulten Tier sein. Um dies zu untersuchen, müsste in älteren adulten Mäusen untersucht werden, ob diese Neurone vorhanden sind und in welcher Anzahl. Ein neurotropher Effekt auf DA Neurone in der adulten Maus konnte für Fgf1, 2 und 20 nachgewiesen werden (Engele und Bohn, 1991, Grothe et al., 2000, Ohmachi et al., 2003) und könnte durch den Fgfr2 vermittelt werden. Da wir in unserer Analyse Tiere im Alter von 4 Monaten verwendet haben, könnte es sein, dass dieser Effekt durch unsere Analyse nicht erkannt wurde, da er u.U. erst in höherem Alter sichtbar wird. Aufgrund der Expression des *Fgfr2* in der SN und in der VTA im adulten Tier ist ein solcher neurotropher Effekt tatsächlich denkbar (Grothe et al., 2004, eigene unpublizierte Beobachtung). Auch hier wären Verhaltensanalysen und sehr detaillierte morphologische Analysen notwendig.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Deletion des *Fgfr2* weder einen Einfluss auf die frühe Musterbildung der MHR noch auf die Spezifizierung und Aufrechterhaltung von neuronalen Subpopulationen während der Embryogenese und in frühen Erwachsenenstadien in der MHR der Maus hat.

5.1.4.3 Der unveränderte Phänotyp der *En1^{Cre/+}Fgfr2^{lox/lox}* Mutante könnte durch einen kompensatorischen Mechanismus erklärt werden

Der Fgf8 Signalweg an der MHG umfasst zahlreiche nachgeordnet gelegene Komponenten. So können drei unterschiedliche intrazelluläre Kaskaden aktiviert werden, der RAS/MAPK Signalweg, der Phosphoinositol 3-Kinase/AKT (PI3K/AKT) und der Phospholipase-Cy/Protein Kinase C (PLC- γ /PKC) Signalweg. Es ist bekannt dass der PI3K/AKT-Signalweg zur Aktivierung des negativen Modulators des Fgf8 Signaltransduktionsweges, Mkp3, führt, während der RAS/MAPK Signalweg zur Aktivierung der nachgeordneten Effektoren Erm und Pea3 aber auch der negativen Regulatoren Spry und Sef, führt (Niehrs und Meinhardt, 2002, Tsang et al., 2004, Echevarria et al., 2005). Eine verminderte Expression der nachgeordneten Effektoren des Fgf Signalweges wäre durch den Verlust des *Fgfr2* zu erwarten gewesen.

Jedoch war keiner dieser Wege verändert. Dies bedeutet, dass die Fgf8 Signaltransduktion an der MHG durch das Fehlen des *Fgfr2* nicht beeinflusst wird. Eine Kompensation des Fehlens des *Fgfr2* durch verstärkte Expression der Liganden und anderer Rezeptoren wie sie im Falle der Tgfs bekannt sind (Xian et al., 2001), konnte ich durch meine Analyse ausschließen.

Jedoch muss hier erwähnt werden, dass meine Analyse sich rein auf die Transkriptionsebene beschränkte. Daher ist eine kompensatorische Regulation auf Translationsebene bzw. auf der Ebene der Protein-Protein-Interaktion (z.B. Veränderungen in Phosphorylierungszuständen von Proteinen) nicht auszuschließen.

5.1.4.4 Der *Fgfr1* ist mit dem *Fgfr2* in der MHR funktionell redundant

Eine Erklärung für den nicht veränderten Fgf Signaltransduktionsweg könnte eine funktionelle Redundanz des *Fgfr2* mit dem *Fgfr1* sein. Dies ist erstens aufgrund unserer Expressionsstudie tatsächlich denkbar, da diese gezeigt hat, dass der *Fgfr1* und der *Fgfr2* räumlich (insbesondere in der ventralen MHR) und auch zeitlich überlappend exprimiert werden. Zweitens ist gezeigt worden, dass Fgf8 an beide Fgfrs binden kann (MacArthur et al., 1995, Blunt et al., 1997, Xu et al., 2000).

Eine Redundanz des *Fgfr2* mit dem *Fgfr3* ist zwar nicht auszuschließen, jedoch weniger wahrscheinlich, da die *Fgfr3* Expression insbesondere dorsal eine Lücke an

der MHG aufweist und ventral erst nach E9.5 im ventralen Mittelhirn exprimiert wird und somit zu spät um das frühe musterbildende Fgf8 Signal in der ventralen MHR zu vermitteln.

Der *Fgfr1* und der *Fgfr2* werden auch in vielen Geweben nicht-neuronalen Ursprungs exprimiert (Übersicht in Powers et al., 2000). Jedoch konnte bisher eine funktionelle Redundanz der beiden Fgfrs nicht gezeigt werden. So sterben die konventionellen *Fgfr1* und *Fgfr2* KO Mutanten, obwohl beide Rezeptoren überlappend exprimiert sind und beide Gene daher gegenseitig für den Verlust des jeweils anderen Fgf Rezeptors kompensieren könnten (Deng et al., 1994, Arman et al., 1998). Dass diese so stark ausgeprägte Redundanz in Bezug auf die Musterbildung und Aufrechterhaltung neuronaler Populationen in der MHR ein überraschender Befund ist, wird auch dadurch belegt, dass die Ausschaltung des *Fgfr2* bzw. des *Fgfr1* in anderen neuronalen Systemen, z.B. in der Entstehung des olfaktorischen Bulbus (Hebert et al., 2003) und kürzlich in der Entstehung von Oligodendrozyten (Fortin et al., 2005), trotz der Anwesenheit des jeweils anderen Rezeptors sehr wohl zur Ausprägung eines Phänotyps führt.

In der MHR jedoch ist es aufgrund der Phänotypen der konditionalen *Fgfr2* und *Fgfr1* KO Mäuse sehr wahrscheinlich, dass der *Fgfr1* in der konditionalen *Fgfr2* KO-Maus sowohl ventral als auch dorsal die Funktion des *Fgfr2* übernimmt und in der konditionalen *Fgfr1* KO-Maus der *Fgfr2* die normale Entwicklung der ventralen Strukturen (und der superioren colliculi (anteriores Mittelhirn)) garantieren kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden konditionale Doppelmutanten der beiden Rezeptoren analysiert.

5.1.4.5 Analyse der $En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr1^{lox/lox}$ Mutante: Verlust der dorsalen und ventralen MHR

Im Gegensatz zu den konditionalen Einzelmутanten des *Fgfr1* und des *Fgfr2* überleben die konditionalen Doppelmutanten nur bis zur Geburt. Im Vergleich zur $En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox}$ Mutante ist das Ausmaß der Deletion in der MHR dorsal größer und die Deletion umfasst nun auch die ventrale MHR.

Im dorsalen Bereich fehlen neben den inferioren colliculi (caudales Mittelhirn), zusätzlich nun auch die superioren Colliculi (anteriores Mittelhirn). Interessanterweise ist der anteriorste Teil des dorsalen Mittelhirns, der posterior preectal nucleus (PPT)

noch vorhanden. Im Gegensatz zum dorsalen Verlust, der mittels Nissl-Färbung leicht feststellbar war, war der Verlust ventraler Strukturen weniger offensichtlich. Um diesen Verlust eingrenzen zu können, wurden in der ventralen MHR entstehende neuronale Populationen näher untersucht. Es wurden der noradrenerge Locus coeruleus, der im ventralen Teil von Rhombomer 1 entsteht, der dritte und vierte Hirnnervenkern, die im ventralen Teil des Mittelhirns bzw. im Bereich des MHO/r1 entstehen, und die DA und 5-HT Neurone, die ebenfalls im ventralen Mittelhirn bzw. Hinterhirn entstehen, untersucht. Die Analyse der Doppelmutanten zeigt, dass diese Subpopulationen bei E18.5 deletiert sind. Lediglich einige wenige Zellen der rostralen 5-HT Neuronenpopulation (dorsale Raphe Nuclei) sind noch vorhanden.

Dieser Befund weist in der Tat auf eine funktionelle Redundanz der beiden Rezeptoren in der MHR hin. In der konditionalen *Fgfr2* Mutante kann der *Fgfr1* dessen Verlust ventral und dorsal kompensieren, was mit dem unveränderten Fgf8 Signaltransduktionsweg im Einklang ist. Hingegen kann der *Fgfr2* in der konditionalen *Fgfr1* Mutanten nur in der ventralen MHG und im anterioren Mittelhirn (superiore Colliculi sind noch vorhanden) für das Fehlen des *Fgfr1* kompensieren, da er in der kritischen Phase der Musterbildung in der MHR (E8-E10) vor allem in diesen Bereichen exprimiert ist. Dies bedeutet auch, dass beide Rezeptoren somit die gleiche Funktion bezüglich der Weiterleitung des Fgf8 Signals ausüben und sie gemeinsam (je nach ihrer Expressionsdomäne) die Musterbildungsfunktion von Fgf8 an der MHG garantieren.

Eine Rolle der Fgf8 Signaltransduktion in der Spezifizierung der dopaminergen und serotonergen Neuronenpopulationen konnte mit Hilfe der konditionalen Doppelmutante nicht gezeigt werden, da das Gewebe der MHR in Analogie zu der konditionalen *Fgf8* KO Maus bereits früh durch Apoptose verloren geht (persönliche Mitteilung: Juha Partanen) und somit diese Neurone nicht bis zum Differenzierungszustand gelangen. Um den Effekt der Fgf Rezeptoren auf die Spezifizierung dieser neuronalen Subpopulationen zu untersuchen, wäre eine Ausschaltung der Rezeptoren zu einem frühen Zeitpunkt spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen, die später zu den DA oder 5-HT Neuronen werden, nötig. Dadurch würde man den Musterbildungsdefekt der MHR durch die frühe Ausschaltung der Rezeptoren in dieser Region umgehen. Da es jedoch z.Z. noch nicht genau bekannt ist, zu welchem Zeitpunkt diese Neurone spezifiziert werden und welche Gene in diesen spezifischen Vorläuferzellen exprimiert werden, gestaltet sich die Wahl des

Promoters unter dem die *Cre* Rekombinase zur Ausschaltung der Rezeptoren in diesen Vorläuferzellen exprimiert werden könnte, schwierig.

5.1.4.6 Die Entwicklung der MHR ist dosisabhängig von der Stärke des *Fgf8* Signals

Interessanterweise entspricht der Phänotyp der konditionalen *Fgfr1/Fgfr2* Doppelmutante *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* nicht genau dem der konditionalen *Fgf8* KO Maus (Chi et al., 2003): bei E18.5 sind noch der PPT und einige „dorsale Raphe“ 5-HT (dR 5-HT) Neurone vorhanden. In der konditionalen *Fgf8* KO Maus ist die MHR bereits zu einem frühen Zeitpunkt komplett deletiert (E10), d.h. hier fehlen PPT und die dorsalen dR 5-HT Neurone.

Zwei Hypothesen könnten die nicht komplett übereinstimmenden Phänotypen der *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* Doppelmutante und der konditionalen *Fgf8* Mutante, die ebenfalls unter Verwendung der *En1^{Cre/+}* Mauslinie hergestellt wurde, erklären.

Die erste basiert auf der Tatsache, dass die *Cre* Rekombinase erst ein paar Stunden nach Beginn ihrer Expression ihre vollständige Aktivität erreicht (Nagy, 2000). Diese zeitliche Verzögerung hat im vorliegenden Fall zur Folge, dass, da sich die *En1* Expression entlang der A/P Achse verengt (Sgaier et al., 2005), die distalst zur MHG gelegenen Bereiche der MHR nur eine unvollständige Deletion der *Fgfrs* erfahren: hier findet man also noch eine Restaktivität der Rezeptoren zum Beginn der *Fgf8* Signaltransduktion (3-5 Somiten) vor (Abb. 55A). Hingegen sind ab Somitenstadium 8-12 in dem bereits enger gewordenen *En1*-positiven Bereichen die Rezeptoren vollständig deletiert und somit ist hier keine Signaltransduktion mehr möglich. Nur in den Bereichen, in denen diese Signaltransduktion durch das vollständige Fehlen der *Fgfrs* komplett unterbunden wurde, findet auch der Gewebeverlust statt. In den Bereichen, in denen noch Restaktivität vorhanden ist (anteriorstes Mittelhirn und caudalstes Hinterhirn), kann eine korrekte Musterbildung/Regionalisierung noch stattfinden und das Gewebe geht auch anschließend nicht durch Apoptose verloren, wahrscheinlich vermittelt durch andere Faktoren als *Fgf8*.

Diese Hypothese weist auf eine Dosisabhängigkeit der Geweberegionalisierung der MHR durch das *Fgf8* Signal hin, da die *Fgfrs 1* und *2* in den distalen Regionen der MHR nur teilweise deletiert sind und es dennoch hier zur Entwicklung des Gewebes kommt. Erst wenn die gesamte Signaltransduktion unterbunden ist (Abb. 55B), geht das Gewebe zu Grunde.

Die zweite Hypothese beruht auf einer möglichen funktionellen Redundanz des *Fgfr3* mit dem *Fgfr2* und *Fgfr1* in den distalen Bereichen der MHR. Dies wird durch meine Expressionsstudie untermauert, die gezeigt hat, dass der *Fgfr3* tatsächlich in diesen Regionen exprimiert ist. Da der *Fgfr3* in den distalen Bereichen der MHR noch zu 100 % vorhanden ist, könnte er den Verlust der *Fgfrs* 1 und 2 ausgleichen. Da jedoch der *Fgfr3* zum frühen Zeitpunkt der MHO-Aktivität nur ventral exprimiert wird, jedoch in der *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* Doppelmutante auch dorsale Strukturen erhalten bleiben, ist diese Hypothese weniger wahrscheinlich.

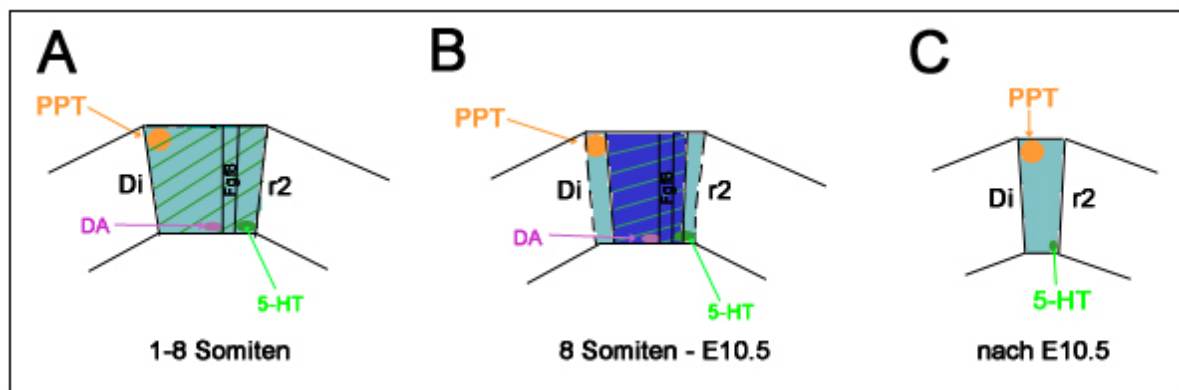


Abb. 55: Schematische Darstellung des in der konditionalen *En1^{Cre/+} Fgfr1^{lox/lox} Fgfr2^{lox/lox}* Doppelmutante beobachteten Phänotyps. (A) Die *Cre* Rekombinase beginnt in der MHR aktiv zu werden (1-8 Somiten). Aufgrund der noch nicht vollständigen *Cre*-Aktivität im Bereich der *En1*-Expressionsdomäne (grün schraffiert) werden der *Fgfr1* und 2 lediglich unvollständig deletiert, was in einer Restaktivität der *Fgf8* Signaltransduktion resultiert (hellblaue Region). **(B)** Aufgrund der sich verengenden *En1*-Expression (grün schraffiert) ist die *Cre* Rekombinase nur in den zentralen Bereichen der MHR vollständig aktiv, wodurch die *Fgf8* Signaltransduktion komplett inhibiert wird (dunkelblaue Region), während in den distalsten Bereichen noch eine Restaktivität vorhanden bleibt (hellblaue Region). **(C)** Nach E10.5 ist die MHR bis auf die distalsten Bereiche inklusive der *Fgf8* sezernierenden Zellen deletiert. Diese distalen Bereiche müssen durch andere Signale als *Fgf8* aufrechterhalten werden.

Insgesamt lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass die *Fgfrs* 1 und 2 in der MHR redundant agieren und möglicherweise dosisabhängig die musterbildende Funktion von *Fgf8* in dieser Region gewährleisten.

5.2 Die Rolle von *Mgn* in der Neurogenese im Mesencephalon

Mgn gehört zur Familie der bHLH Gene, von denen bekannt ist, dass sie an der Spezifizierung neuronaler Subpopulationen beteiligt sind, und die Proteine ihre Funktion als Homo- und Heterodimere ausüben (Übersicht in Bertrand et al., 2002, Ross et al., 2003). Das spezifische Expressionsmuster von *Mgn* im Mittelhirn legte nahe, dass dieses neue Gen an der Spezifizierung von mesencephalen Neuronenpopulationen beteiligt sein könnte. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch nichts über die Funktion von *Mgn* bekannt war, wurde mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems nach Interaktionspartnern von *Mgn* in dieser Region gesucht, um über diese Hinweise auf eine mögliche Funktion von *Mgn* in dieser Region zu erhalten.

5.2.1 Identifikation von *Mgn*-Interaktionspartnern mittels des Hefe Zwei-Hybrid-Systems – unvoreingenommener Screen: *Mgn* interagiert mit *Nr2f2*

Als potentieller Interaktionspartner von *Mgn* wurde im unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen der nukleäre Rezeptor *Nr2f2* identifiziert. *Nr2f2* ist ein "orphan nuclear receptor". Das bedeutet, dass bislang keine Liganden für diesen Rezeptor, der zur Familie der Steroidhormone gehört, identifiziert werden konnten (Giguere et al., 1999). Nachdem mehrere Versuche zur Verifizierung der gefundenen Interaktion (Überprüfung der Interaktion von *Mgn* mit dem „full-length“ *Nr2f2* Protein, Ko-IP der beiden Proteine in kultivierten Säugetierzellen) positiv verliefen, wurde die Ko-Expression der beiden Gene untersucht. Beide Gene sind bereits bei E10 in der Flügelplatte des Mittelhirns ko-exprimiert. Bei E12.5 überlappt die *Mgn* Expression in der LGE und der Ventrikulärzone (VZ) des caudalen Mittelhirns mit der *Nr2f2* Expression. In diesen Regionen lässt sich daher auf eine biologische Funktion der Heterodimerbildung in der Neurogenese schließen.

In Analogie zur *Nr2f2*-Funktion während der Myogenese, wo *Nr2f2* mit dem bHLH Protein Myo-D interagiert, könnte die Heterodimerisierung von *Nr2f2* und *Mgn* im sich entwickelnden Gehirn eine Rolle in der Entstehung von Neuronen des caudalen Mittelhirns und des ventralen Telencephalons (laterale ganglionische Eminenzen-LGE) spielen. In myogenen Vorläuferzellen (Myoblasten) reprimiert *Nr2f2* die Aktivität von Myo-D. Diese Repression ist essentiell für die Proliferation der myogenen

Vorläuferzellen (Bailey et al., 1998), bevor diese durch die Funktion von MyoD zu Myotuben differenzieren. In neuronalen Vorläuferzellen könnte Nr2f2 daher ebenfalls eine auf Proteinebene beruhende reprimierende Wirkung auf Mgn ausüben, vergleichbar mit den neurogenen Proteinen. Es wäre denkbar, dass Mgn als proneurales Protein die neuronalen Vorläuferzellen in der VZ des caudalen Mittelhirns determiniert und Nr2f2 als funktioneller Antagonist zunächst deren Proliferation garantiert. Um diese mögliche Funktion der Heterodimerbildung zwischen Mgn und Nr2f2 zu untersuchen, wären weiterführende Experimente notwendig wie z.B. die Analyse der Einzel- und Doppel-LOF-Mutanten im Hinblick auf die Neurogenese, eine Analyse von konditionalen Mausmutanten, in denen beide Gene spezifisch in Neuronen ausgeschaltet wurden oder GOF Experimente, in denen beide Gene in neuronalen Vorläuferzellkulturen überexprimiert werden, um festzustellen, ob diese Zellen über einen verlängerten Zeitraum hin proliferieren und ob, falls man den Zellen das Nr2f2 Protein entzieht, diese Zellen zu Neuronen differenzieren. Die Durchführung dieser Experimente ging jedoch über den Rahmen dieser vorliegenden Arbeit hinaus.

5.2.2 Identifikation von Mgn-Interaktionspartnern mittels des Hefe Zwei-Hybrid-Systems – Hypothesengetriebener Screen: Mgn interagiert mit Mash1 und bildet Homodimere

Parallel zum unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid System sollte gezielt untersucht werden, ob Mgn Homodimere bilden kann und mit den im sich entwickelnden Mittelhirn vorkommenden bHLH Proteinen Mash1, Ngn1, Ngn2 und Ngn3 Heterodimere bildet.

Mgn war tatsächlich in der Lage in Hefe und in Zellkultur Homodimere zu bilden, eine Fähigkeit, die es mit zahlreichen anderen bHLH Proteinen teilt (Übersicht in Ross et al., 2003). Diese Beobachtung wurde während der Entstehung dieser Arbeit unabhängig von uns publiziert (Nakatani et al., 2004). Ich konnte jedoch zusätzlich zeigen, dass Mgn in der Lage ist mit Mash1 Heterodimere zu bilden. Die Interaktion zwischen Mgn und Mash1 konnte in kultivierten Säugetierzellen durch Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden. Mgn interagierte hingegen nicht mit Ngn1, 2 und 3. Eine Expressionsanalyse dieser bHLH Gene bei E10.5 im ventralen Mittelhirn zeigte, dass in der Tat Mgn und Mash1 miteinander in der VZ ko-exprimiert sind, was

auf eine biologische Relevanz der von mir *in vitro* gefundenen Interaktion zwischen Mgn und Mash1 hinweist. Hingegen waren die Gene Ngn1, 2 und 3 in der MZ exprimiert und überlappten daher nicht mit der Mgn Expression.

Welche Proteindomänen von Mgn für die Interaktion mit Mash1 notwendig sind, würden zusätzliche Experimente noch zeigen. Jedoch, in Analogie zu den schon bekannten Interaktionen zwischen Mgn und Hes5 bzw. Hey2, liegt es nahe, dass auch hier die HLH und/oder die Orange-Domäne von Mgn für die Heterodimerbildung zuständig ist (Nakatani et al., 2004).

Überraschenderweise konnte Mash1 nicht als Interaktionspartner von Mgn im unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen identifiziert werden, obwohl Mash1 in der aus Mittelhirn-Gewebe hergestellten cDNA Bibliothek vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass ein sehr großer Selektionsdruck auf die Hefezellen ausgeübt wurde, um lediglich die stärksten Interaktoren zu selektieren. Es ist durchaus möglich, dass die Interaktion zwischen Mgn und Mash1 nicht stark genug war, um diesem Selektionsdruck standzuhalten.

5.2.2.1 *Mgn* ist mit *Mash1* in bestimmten Bereichen des sich entwickelnden Neuralrohrs ko-exprimiert

Um einen Hinweis auf die *in vivo* Relevanz der *in vitro* gefundenen Interaktion zwischen Mgn und Mash1 zu erhalten, sollte ein detaillierter Vergleich der Expressionsdomänen von *Mgn* und *Mash1* die Regionen identifizieren, in denen eine Heterodimerbildung zwischen Mgn und Mash1 eine Rolle spielen könnte.

Mash1 ist im sich entwickelnden Neuralrohr ab E9 nahezu ubiquitär exprimiert. Die *Mgn* Expression beginnt ebenfalls bei E9 in der VZ des ventralen Mittelhirns, so dass beide Gene zu diesem Zeitpunkt in dieser Region überlappen. Diese Überlappung bleibt im ventralen Mittelhirn bis E11.5 bestehen. Ab E12.5 wird *Mgn* zusätzlich zu der Expressionsdomäne im ventralen Mittelhirn auch in der VZ anderer Hirnregionen exprimiert: im Telencephalon (laterale ganglionische Eminenzen (LGE), im Diencephalon (Pretektum, Epithalamus, ZLI, Prethalamus), im ventralen und im dorsalen Mittelhirn (Tectum) und überlappt auch in diesen Bereichen des Neuralrohrs mit der ubiquitären *Mash1* Expression.

5.2.2.2 *Mgn* und *Mash1* regulieren sich gegenseitig nicht auf transkriptioneller Ebene

Wie bereits erwähnt können bHLH Gene gemeinsam mit anderen bHLH Genen oder auch Genen anderer Familien (allgemein bezeichnet als „regional cues“) ihre Funktion in der Ausdifferenzierung von neuronalen Subpopulationen ausüben (Übersicht in Ross et al., 2003).

Dabei beeinflussen sich die kooperierenden Gene häufig auch auf transkriptioneller Ebene. Z.B. kann *Mash1* die Expression von *Ngn1* unmittelbar positiv regulieren (Cau et al., 1997). Ein Beispiel für eine negative Regulation hingegen sind die miteinander interagierenden bHLH Proteine *Mash1* und *Ngn2*: fehlt *Ngn2* wird *Mash1* in den Bereichen in denen *Ngn2* normalerweise exprimiert wird, hochreguliert (Fode et al., 2000).

Um die gegenseitige Regulation von *Mgn* und *Mash1* auf transkriptioneller Ebene zu überprüfen, untersuchte ich in der *Mash1* KO Maus die *Mgn* Expression und in der *Mgn* KO Maus die *Mash1* Expression. Beide Gene waren in den KO Mäusen zu dem Zeitpunkt bei dem die Differenzierung von neuronalen Subpopulationen im Diencephalon und ventralen Mittelhirn beginnt (E10.5), in ihrer Expression unverändert. Dies bedeutet, dass die Expression/Transkription von *Mgn/Mash1* unabhängig voneinander erfolgt und beide Faktoren offenbar nur auf Proteinebene miteinander interagieren.

Dies steht im Gegensatz zu dem Bericht von Miyoshi et al. (2004), in dem gezeigt wurde, dass das *Mgn* (Heslike)-Protein in der *Mash1* KO Maus im ventralen Mittelhirn bei E11.5 hochreguliert ist. Die Diskrepanz zu dem vorliegenden Ergebnis könnte auf das unterschiedliche untersuchte embryonale Stadium zurückzuführen sein oder aber eine Regulation auf der Ebene der Translation bedeuten.

5.2.2.3 *Mgn* und *Mash1* Expression in der VZ ist mit der Expression von *GAD67* in unterschiedlichen Regionen des embryonalen Maushirns assoziiert

Da gezeigt wurde, dass *Mash1* im Vorderhirn eine Rolle bei der Entstehung von GABAergen Neuronen spielt (Casarosa et al., 1999) und außerdem parallel zu meinen Ergebnissen während der Entstehung dieser Arbeit eine Rolle von *Mgn* in der Entwicklung von GABAergen Neuronen vorgeschlagen wurde (Guimera et al., in

Vorbereitung, Miyoshi et al., 2004), wäre es möglich, dass die Interaktion zwischen *Mgn* und *Mash1* eine Rolle in der Spezifizierung dieses Neuronensubtyps haben könnte. Daher untersuchte ich die räumliche Korrelation der Expression von *Mgn* und *Mash1* mit der Entstehung von GABAergen Neuronen im Mittelhirn bei E10.5 und E12.5.

Die ersten GABAergen Neurone differenzieren bei E10.5 in der MZ des Diencephalons und des ventralen Mittelhirns. Sie wurden mit Hilfe des terminalen Markers für GABAerge Neurone, *GAD67*, detektiert. Interessanterweise korrelierte die *GAD67* Expression zu diesem Zeitpunkt mit der *Mgn/Mash1* Expression in der VZ des ventralen Mittelhirns. Auch bei E12.5 korrelieren alle *Mgn/Mash1* positiven ventrikulären Bereiche des Neuralrohrs mit der *GAD67* Expression.

Bei E12.5 lassen sich zusätzlich *GAD67*-positive Zellen in Regionen, in denen *Mash1* aber nicht *Mgn* nicht exprimiert wird, wie z.B. im Metencephalon, detektieren.

Dieses Expressionsmuster der drei Gene legt nahe, dass neuronale Vorläuferzellen, die sowohl *Mgn* als auch *Mash1* in der VZ exprimieren, im sich entwickelnden Mittelhirn zu GABAergen Neuronen in der MZ ausdifferenzieren. Somit könnte *Mgn* in den Regionen in denen es gemeinsam mit *Mash1* exprimiert wird, für die Entstehung der GABAergen Neurone, möglicherweise sogar für deren Spezifizierung notwendig sein.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde das Vorhandensein von GABAergen Neuronen in *Mgn* und *Mash1* Knock-out Mäusen untersucht.

5.2.2.4 Fehlen des terminalen GABAergen Phänotyps in spezifischen Regionen der *Mgn* KO Mäuse

In *Mgn* Knock-out Embryonen (von Jordi Guimera zur Verfügung gestellt) ist spezifisch die *GAD67* Expression im ventralen Mittelhirn bei E10.5, E13 und E18 reduziert (dorsale Expression ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht detektierbar). *GAD67* Expression im dorsalen Mittelhirn (Tectum) und dorsalen Diencephalon (Pretectum) ist hingegen zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. In allen anderen Regionen des Gehirns ist *GAD67* Expression jedoch vorhanden.

Das selektive Fehlen der terminal differenzierten GABAergen Neurone in spezifischen Regionen in der *Mgn* KO Maus, zeigt eindeutig, dass *Mgn* lediglich in bestimmten Regionen oder in bestimmten Subpopulationen (dorsales Mes- und

Diencephalon und zum Teil auch ventrales Mesencephalon) für die Entstehung des GABAergen Phänotyps notwendig ist.

Im ventralen Diencephalon (Prethalamus) und ventralen Telencephalon (LGE), in dem *Mgn* ebenfalls während der Embryogenese exprimiert wird, ist der Marker *GAD67* vorhanden und somit differenzieren GABAerge Neurone unabhängig von *Mgn* aus. Es lässt sich anhand unsere Analyse jedoch nicht ausschließen, dass in dieser Region *Mgn* nicht doch an der Entstehung einer Subpopulation von GABAergen Neuronen beteiligt ist, die jedoch in ihrer Zellzahl im Vergleich zur Gesamtzahl der GABAergen Neurone gering ist.

Inwieweit GABAerge Neurone in der *Mgn* KO-Maus spezifiziert werden, oder ob sie lediglich die terminalen Differenzierungsmarker *GAD67/65* nicht exprimieren, konnte durch meine Analysen nicht geklärt werden. Jedoch weisen unpublizierte Daten von Dr. J. Guimera darauf hin, dass die GABAergen Neurone/Zellen in der Tat entstehen, somit spezifiziert werden, jedoch nicht bis zum terminalen Phänotyp ausdifferenzieren. Es ist außerdem möglich, dass aufgrund des Fehlens von *Mgn*, stattdessen ein oder andere bHLH Proteine in den neuronalen Vorläuferzellen agieren, so dass ein anderer Subtyp an Neuronen aus diesen entsteht. Die Überprüfung des Neurotransmitter-Phänotyps dieser Zellen stellt daher einen unerlässlichen Schritt dar, um das „Schicksal“ der *Mgn*-defizienten neuronalen Vorläuferzellen in der VZ zu bestimmen. Dadurch würde man auch *Mgn* zeitlich in den Entstehungsprozess des GABAergen Phänotyps einordnen können: würden nur die terminalen Marker der GABAergen Neurone fehlen, und wäre kein anderer Neurotransmitterphänotyp dieser Zellen feststellbar, ist es wahrscheinlich, dass *Mgn* möglicherweise einen „späten“ Schritt in der Entstehung der GABAergen Neurone reguliert, wie etwa die *GAD67/65* Transkription. Würden jedoch die *GAD67*-negativen Zellen terminale Marker anderer Neuronensubtypen exprimieren, wäre dies ein Hinweis darauf, dass die Vorläuferzellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Neurogenese „umspezifiziert“ wurden, etwa durch die Übernahme der proneuralen Funktion und auch der Spezifizierung der neuronalen Vorläufer durch ein anderes bHLH Gen. *Mgn* wäre in diesem Szenario somit für einen frühen Determinierungsschritt des neuronalen Subtyps notwendig.

5.2.2.5 Fehlen des terminalen GABAergen Phänotyps in spezifischen Regionen der *Mash1* KO Mäuse

Interessanterweise zeigte die *Mash1* KO Maus (von Francois Guillemot zur Verfügung gestellt) in unseren Untersuchungen einen ähnlichen Phänotyp wie die *Mgn* KO Maus: bei E10.5 fehlt die *GAD67* Expression lediglich im ventralen Mittelhirn und bei E12.5 fehlt die Expression im dorsalen Di- und Mesencephalon (Pretectum und Tectum).

Im Gegensatz dazu wurde in unterschiedlichen Studien gezeigt, dass in *Mash1* KO Mäusen GABAerge Neurone in fast allen Regionen des Neuroepithels fehlen (Casarosa et al., 1999, Miyoshi et al., 2004). Dieser vollständige Verlust der GABAergen Neurone ist jedoch in späteren Embryonalstadien zu beobachten. Die wenigen Analysen, in denen ebenso in der vorliegenden Arbeit frühe Embryonalstadien untersucht wurden, bestätigen, dass früh die GABAergen Neurone in der *Mash1* KO Maus bis auf die o.g. Regionen, noch vorhanden sind (Casarosa et al., 1999).

5.2.3 Die Interaktion zwischen *Mgn* und *Mash1* ist essentiell für die Entstehung von terminal differenzierten GABAergen Neuronen

Dass die von uns gefundene Heterodimerbildung zwischen *Mgn* und *Mash1* in der Tat *in vivo* relevant sein könnte, spiegelt sich in drei Befunden wider.

1. fehlen in der *Mgn* KO Maus die terminalen Marker für GABAerge Neurone des dorsalen Mesencephalons und dorsalen Diencephalons und sind im ventralen Mesencephalon reduziert. Dies bedeutet, dass *Mgn* notwendig für die Entstehung von GABAergen Neuronen ist und *Mash1* in diesen Regionen alleine nicht in der Lage ist, den GABAergen Phänotyp entstehen zu lassen.
2. fehlen auch in den *Mash1* KO Mäusen, obwohl *Mgn* noch vorhanden ist, in denselben Regionen wie in der *Mgn* KO Maus die GABAergen Neurone. Folglich ist auch *Mash1* in denselben Regionen des Neuroepithels notwendig, und *Mgn* ist alleine wiederum nicht in der Lage, den terminalen GABAergen Phänotyp zu bestimmen.
3. haben Miyoshi et al. (2004) in einem GOF Experiment gezeigt, dass *Mgn* GABAerge Neurone ausschließlich in *Mash1* positivem Territorium induzieren kann.

Meine Analyse der *Mgn* KO Mäuse geht über die GOF-Experimente von Miyoshi et al. (2004) insofern hinaus, als dass ich zeigen konnte, dass *Mgn* notwendig für die Entstehung GABAerger Neurone nur in bestimmten Regionen ist und seine Funktion wahrscheinlich aufgrund der direkten Interaktion mit *Mash1* gemeinsam mit diesem bHLH Protein ausübt.

Jedoch muss hier erwähnt werden, dass *Mgn* und *Mash1* auch zwei voneinander unabhängige Genkaskaden aktivieren könnten. Erst nachgeordnet zu diesen beiden Genkaskaden könnte dann eine Interaktion zweier Proteine aus den beiden unabhängigen Genkaskaden für die Entstehung der GABAergen Neurone von Wichtigkeit sein. Diese Möglichkeit lässt sich momentan von der direkten Interaktion zwischen *Mgn* und *Mash1* durch die Analyse der beiden KO Mäuse nicht unterscheiden.

5.2.4 Unterschiedliche Kombinationen von Genen bestimmen den GABAergen Phänotyp in unterschiedlichen Regionen des sich entwickelnden ZNS

Die bisherigen Befunde und meine eigene Analyse der *Mash1* KO Maus implizieren, dass *Mash1* in einem Grossteil, wenn nicht sogar in allen GABAergen Vorläuferzellen für die Entstehung der voll differenzierten GABAergen Interneurone mitverantwortlich ist.

Es war bisher jedoch nicht bekannt gewesen, ob *Mash1* alleine für die Entstehung der GABAerge Neurone verantwortlich ist, oder ob tatsächlich Kombinationen von unterschiedlichen Genen, die sog. „regional cues“ dafür notwendig sind. In der Tat wurde im ventralen Telencephalon gezeigt, dass *Mash1* notwendig für die Entstehung der dortigen GABAergen Neurone ist, dort jedoch auch die Funktion der Homeoboxgene *Dlx1/2* und *Nkx2.1* benötigt wird (Yun et al. 2002). Caudal zum Mittelhirn sind wiederum andere Gene an der Entstehung GABAerger Neurone beteiligt. Z.B. wurde vor kurzem gezeigt, dass ein neues bHLH-Gen (*Ptf1a*) für die Entstehung der GABAergen Nervenzellen im gesamten Kleinhirn notwendig ist (Hoshino et al. 2005). Ob *Ptf1a* mit anderen Proteinen heterodimerisiert und dadurch seine Funktion ausübt, ist jedoch nicht untersucht worden.

Der „transkriptionelle Code“, der verantwortlich für die Entwicklung des GABAergen Phänotyps im Di- und Mesencephalon ist, war jedoch gänzlich unbekannt.

Ich konnte durch meine Analyse zeigen, dass das neue bHLH Protein Mgn vermutlich durch eine direkte Interaktion mit Mash1 in diesen Regionen eine Rolle in der Entstehung von GABAergen Neuronen spielt.

Insgesamt lassen sich unsere Erkenntnisse in die immer größer werdende Liste an Publikationen einordnen, in der belegt wird, dass das neuronale Schicksal von Vorläuferzellen durch bestimmte und für jede neuronale Subpopulation spezifische kombinatorische Codes von Transkriptionsfaktoren festgelegt wird, d.h. dass auch das Schicksal der GABAergen Neurone stark von regional unterschiedlichen Gegebenheiten abhängt.

6 Material und Methoden

6.1 Geräteliste

| | |
|--------------------------------------|---|
| Agarosegel - | |
| Elektrophoreseapparaturen: | MWG-Biotech; PeqLab |
| Autoklav: | ASS und Aigner, Typ 667-1ST |
| Elektrophorese-Netzgeräte: | E-C Apparatus Inc., EC 250-90, |
| EC3000-90 | Consort, E443 |
| Entwicklermaschine für Röntgenfilme: | AGFA, Curix 60 |
| Feinwaagen: | Sartorius LC220S, LC6201S, BA210S |
| Gefrierschrank (- 80°C): | Heraeus |
| Gefrierschrank (- 20°C): | Liebherr |
| Geigerzählrohr: | Berthold, LB122 |
| Geldokumentationsanlage: | Herolab |
| Heizblöcke: | Eppendorf, Thermomixer 5463Comfort |
| Heizer / Magnetrührer: | IKA Labortechnik, RCT basic |
| Hybridisierungsöfen: | ThermoHybaid, Hybridizer HB100 |
| Hybridisierungsflaschen: | Thermo Hybaid |
| Inkubatoren (Bakterien): | New Brunswick Scientific, Innova 4230 |
| Inkubatoren (Hefe): | Memmert Modell UM 400 |
| Inkubatoren (Zellen): | Heraeus |
| Isotopenzähler: | Scott - lab, Easicount 400 |
| Kaltlichtquellen: | Leica, KL 1500; Zeiss, KL 2500 LCD |
| Kameras: | Zeiss, AxioCam MRC, HRC; Fuji, HC2000 |
| Kryostat: | Microm, HM 560 |
| Kühlschränke: | Liebherr |
| Mikroskope: | Zeiss Axioplan 2, Zeiss Stemi SV 6 |
| Mikrotome: | Microm, HM 355S; Leica, RM2155 |
| Mikrowelle: | Sharp |
| Paraffin-Einbettvorrichtung: | Sakura, Tissue-TEK [®] TEC |
| PCR-Geräte: | Eppendorf, Mastercycler Gradient |
| Photometer: | Eppendorf, Biophotometer |
| pH-Messgerät: | WTW, pH 538 |
| Pipettierhilfe: | Brand, Accujet [®] |
| Pipetten (10µl - 1 ml): | Gilson |
| Reinstwasser-Aufbereitungsanlage: | Millipore, MilliQ |
| Rotor Stator Dispergiengerät: | IKA Labortechnik, Ultraturrax |
| Schüttler: | Heidolph, Polymax 1040; Brand, Nutator |
| Sonifier: | Branson sonifier, cell disrupter B15 |
| Sterilbank: | Nunc, Microflow 2 |
| Thermomixer | Eppendorf, S436, comfort |
| UV-DNA / RNA-Crosslinker: | Stratagene, UV Stratalinker [®] 1800 |
| Vibrator: | Microm HM650 |
| Vortex: | Scientific Industries, Vortex Genie |

Wasserbäder: Julabo U3 ; Lauda A100/E100
Zentrifugen: Sorvall, RC5C Plus
(Rotoren: GSA, SA600)
Heraeus, Biofuge pico/fresco, Varifuge
3.0R
Hettich, Universal 30F, Eba 12

6.2 Bezugsquellen von Enzymen, Chemikalien, Kits und anderen Verbrauchsmaterialien

Die Bezugsquellen der Materialien und Kitsysteme sind direkt bei der entsprechenden Methode angegeben.

Laborglaswaren wurden von der Firma Schott bezogen.

Falls nicht anders angegeben wurden als Gebrauchs-Chemikalien die der Firma Sigma Aldrich verwendet.

Restriktionsenzyme, PCR Reagenzien T3-, T7-, SP6-RNA Polymerasen, RNase-Inhibitor und Hefe-t-RNA und T4 DNA Ligase stammten von Roche Diagnostics.

Verbrauchsmaterialien:

| | |
|--|---|
| Ampuwa [®] -Wasser: | Fresenius AG |
| Autoradiographie-Filme: | Biomax, X-OMAT, Sigma |
| Autoradiographie-Emulsion (Typ NTB-2): | Kodak, New Haven, USA |
| Bakterienkulturschalen, Einmalpipetten: | Greiner Labortechnik |
| Einmalpipetten-Spitzen 0.1-10 µl; 1-20 µl; 1-200 µl; 101-1000 µl: | Starlab |
| Einbettgefäße: | Polysciences, Peel-A-Way |
| Entwickler (D-19), Fixierer: | Sigma |
| Falcon [®] -Gefäße, Kanülen, Spritzen: | Becton Dickinson, Europe (Schubert & Weiss, München) |
| Längenstandard, DNA-Gele (Smartladder [®]): | Eurogentec |
| Parafilm [®] : | American National Can, USA |
| Röntgen- Kassetten: | Amersham |
| Safe-Lock-Reaktionsgefäße (1,5/2,0 ml): | Eppendorf |
| Verbrauchsmaterial aller Art für die Zellkultur: | Nunc |

6.3 Arbeitstechniken auf der Basis von Ribonukleinsäuren

6.3.1 Spaltung von Vektor-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Vektor-DNA wird mit kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen (RE) gespalten. Pro μg zu spaltender DNA werden 1-10 U RE eingesetzt. (Eine Enzym-Einheit (U = unit) ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μg DNA in einer Stunde linearisieren kann.) Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben eingestellt und der DNA-Restriktionsansatz für mindestens 1 h bei der Aktivitätstemperatur des verwendeten Enzyms inkubiert.

6.3.2 Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors

Um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern, können die 5'-Enden vor der Aufreinigung über das Gel dephosphoryliert werden. Hierfür wird der Vektor für 30 min bei 37°C mit der Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 1U/ μl (Roche Diagnostics) behandelt. Das Enzym kann unmittelbar nach dem Verdau des Vektors zum Ansatz hinzugegeben werden.

Der auf diese Weise für die Ligation (s. 6.3.5) vorbereitete Vektor wird über ein Agarosegel (s. 6.3.3) aufgereinigt

6.3.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Lineare, doppelsträngige DNA bewegt sich durch die Agarose-Matrix mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Auch die Konformation spielt eine Rolle: ringförmige superhelikale DNA wandert schneller als linearisierte („relaxierte“) DNA. Je nach Länge der zu erwartenden DNA-Fragmente werden Agarose (Biozym)/1x TBE-Gele mit einem Anteil von 0.5% (gute Auftrennung großer Fragmente von 1-10 kb) bis zu 1.5% (gute Auftrennung kleiner Fragmente von 0.1-2 kb) Agarose verwendet. Zur sauberen Auftrennung von sehr kleinen Fragmenten (100-200 bp) werden Gele mit einer Konzentration von bis zu 4% Agarose verwendet. Die DNA-Fragmente werden durch Fluoreszenz von in die DNA interkalierten Ethidiumbromids (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei UV-Licht einer Wellenlänge von 366 nm oder 312 nm sichtbar gemacht.

Die DNA-Proben werden mit 6x Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 80-100 V bei maximaler Stromstärke aufgetrennt.

1x TBE: 0,89 M Tris
 0,89 M Borsäure
 1 mM EDTA

6x Probenpuffer: 0.2 % Bromphenolblau
 60 % Glycerin
 in Aqua Dest.

6.3.4 Aufreinigung von DNA

6.3.4.1 Aufreinigung eines Vektors oder eines Fragmentes aus dem Agarosegel

Die Isolation der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen). Die gewünschte DNA-Bande wird aus dem Agarosegel (siehe 6.3.3) ausgeschnitten und dem Protokoll entsprechend aufgereinigt.

6.3.4.2 Aufreinigung eines PCR-Produktes

PCR Produkte in einer einzigen eindeutigen Größe werden mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen) laut Herstellerprotokoll aufgereinigt.

6.3.5 Ligation

Um zwei DNA-Enden kovalent zu verbinden, müssen mit Hilfe von Ligase Phosphordiesterbindungen verknüpft werden. Dazu ist es nötig, dass mindestens ein DNA-Ende eine 5'-Phosphatgruppe trägt.

Freie Enden entstehen durch den Verdau der DNA mit Hilfe von RE (s. 6.3.1).

Üblicherweise setzt man 50 ng Vektor und eine 3-fache Menge Insert (in pmol) ein.

Die Ligation erfolgt bei 14°C üN.

Ligationsansatz :

1.6 µl 10 x Ligasepuffer
 x µl Vektor
 x µl Fragment
 0.4 µl T4 DNA-Ligase (5U/µl)
 ad. 16 µl Aq.dest.

6.3.5.1 TOPO-TA Klonierung

Dieses Verfahren wurde hauptsächlich dazu benutzt, um PCR-Fragmente in einen TOPO Vektor zu klonieren und diesen dann zu sequenzieren.

Laut Herstellerprotokoll werden 2-4 µl des PCR Ansatzes/gereinigten PCR-Fragmentes zu dem "TOPO TA" Vektor hinzugegeben und es wird etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei findet die Ligation von Fragment und Vektor statt. Zur Vervielfältigung des Ligationsproduktes wird die Hälfte des Ligationsansatzes zu den im Kit enthaltenen Bakterienstamm *E.coli* top 10 One shot™ Zellen (DH5α) hinzugegeben. Die Transformation erfolgt wie unter 6.6.3 beschrieben.

6.3.6 Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Ein Standard PCR-Ansatz sieht wie folgt aus:

| | | |
|----------------------|------------------|--|
| PCR-Reaktionsansatz: | 2.5 µl | 10x Taq-Puffer (Roche Diagnostics; enthält MgCl ₂) |
| | 10 ng | Vektor-DNA-Template (~ 100-200 ng genomische DNA) |
| | 0.2 mM | dNTP (Stocklösung 10 mM, bei -20°C) |
| | 0.4 µM | primer1 (Stocklösung 10 µM, bei -20°C) |
| | 0.4 µM | primer2 (Stocklösung 10 µM, bei -20°C) |
| | 0.25 µl (1.25 U) | Polymerase (z.B. Taq 5 U/µl, Roche Diagnostics) |
| | ad. 25 µl | Aq.dest. |

Um die Fragmentgröße der amplifizierten DNA zu bestimmen, wird die PCR-Reaktion auf ein Agarosegel (s. 6.3.3) aufgetragen und die DNA nach Bedarf weiterverwendet. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer und die spezifischen PCR-Bedingungen sind im Anhang angegeben.

Oligonukleotidprimer

Oligonucleotide wurden in der Arbeitsgruppe Biologische Datenverarbeitung (AG BIODV) der GSF mit einem Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer hergestellt. Die Oligonucleotide wurden lyophilisiert geliefert und zur Konzentrationsbestimmung sowie zur weiteren Verdünnung über Nacht bei 4°C in 200 µl Wasser gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (OD_{260}) entspricht für einzelsträngige Oligonucleotide ca. 30 µg/ml (Sambrook et al., 1998). Die Konzentrationsberechnung erfolgte näherungsweise nach der Formel: $OD_{260} \times 20 \times$ Verdünnungsfaktor.

6.3.7 Automatische DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der von Sanger (Sanger et al., 1977) entwickelten Methode. Bei dieser auch als „Strangabbruch-Methode“ bezeichneten Technik werden spezielle farbmarkierte 2',3'-dideoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs) in der Sequenzier-PCR verwendet, um die Nukleotid-Abfolge einer DNA-Sequenz zu markieren. Das Spektrophotometer des ABI PRISM 3100 Analyzers (Applied Biosystems) ist anschließend in der Lage, die unterschiedlichen Fluoreszenzemissionen in einer Gelmatrix zu detektieren. Die Data Collection Software 40100 erkennt aus den Informationen des Spektralphotometers die Abfolge der Nukleotide. Es wurde für die Sequenzier-PCR das ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Kit verwendet. Im BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR 100-Mix sind die für die Reaktion notwendigen Reagenzien in den jeweiligen Konzentrationsverhältnissen enthalten. Der Mix enthält:

- Strangterminatoren (ddNTPs, mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert):
 - A-Big Dye Terminator v3.1 (emittiert Licht im grünen Spektrum)
 - C-Big Dye Terminator v3.1 (emittiert Licht im blauen Spektrum)
 - G-Big Dye Terminator v3.1 (emittiert Licht im gelben Spektrum)
 - T-Big Dye Terminator v3.1 (emittiert Licht im roten Spektrum)
- Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)
- AmpliTaq Polymerase
- MgCl₂
- Tris/HCl Puffer pH 9.0

Für die Fragmentsequenzierung werden 50 ng in der Sequenzierreaktion eingesetzt, für die Vektor-Sequenzierung werden 500 ng verwendet.

Der Sequenzier-PCR Ansatz sieht wie folgt aus:

1.8 µl Big Dye Terminator
0.2 µl primer (20 pmol/µl)
ad 10 µl hochreines Aq. dest.

Das folgende PCR Programm wird 25 Mal wiederholt:

30 sec 95°C
15 sec 50°C (Temperatur von primer abhängig, bei T7 oder T3 beträgt sie 42°C)
4 min 60°C

Nach der PCR werden die Produkte durch Zugabe eines 4-fachen Volumens an 80% EtOH gefällt: Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wird 30 min bei RT zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit 125 µl 70% EtOH gewaschen und erneut 15 min bei 16000 g zentrifugiert. Nach Trocknung wird es in 100 µl Wasser aufgenommen. Zum Sequenzieren werden 25 µl verwendet.

6.3.8 Herstellung einer DNA-Sonde durch radioaktive Markierung

Für die radioaktive Markierung (α -³²P-dCTP, Amersham) eines DNA-Fragmentes wird das MegaprimeTM DNA-Labeling-System (Amersham) verwendet. Es werden 50 ng DNA eingesetzt.

Nach der Markierung wird die Sonde über die S300 MicrospinTM Columns (Pharmacia Biotech) aufgereinigt. In Szintillationslösung (Rotiszint[®], Roth) wird die Radioaktivität der Probe überprüft. Sie sollte mindestens 30 000 cpm haben. Vor der eigentlichen Hybridisierung wird die Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert.

6.4 Arbeiten mit genomischer Maus-DNA

6.4.1 Extraktion von DNA aus Mausschwanz und adultem Hirngewebe

Die etwa 1 cm langen Schwanzspitzen bzw. das ca. 0.3-0.5 cm³ grosse Gewebstück werden in einem Eppendorf-Gefäß mit 600 µl Tail-Puffer und Proteinase K 1.5 mg/ml versetzt. Der Ansatz wird bei 55°C üN geschüttelt. Am nächsten Tag werden 600 µl Phenol / Chloroform-Lösung (Roth) zugefügt und der Deckel des Eppendorf-Gefäßes mit Phase Lock[®] Gel (Eppendorf) ausgefüllt. Nachdem die Mischung eine halbe Stunde lichtgeschützt bei RT geschüttelt hat, wird für 10 min bei 16000 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die genomische DNA mit 600 µl Isopropanol ausgefällt. Es wird für 10 min bei 16000 g zentrifugiert um die DNA zu pelletieren. Anschließend wird mit 600 µl 70%igem EtOH gewaschen und erneut für 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend ca. 30 min getrocknet. Die genomische DNA wird dann üN in 100 µl TE-Puffer bei 37°C gelöst. Für die Typisierung mit Hilfe der PCR -Technik (siehe 6.3.6) werden 0.5 µl (etwa 100-200 ng) dieser Lösung. eingesetzt, für die Typisierung per genomischem Southern-Blot 10 µl (4 µg) (siehe 6.4.3).

Tail-Puffer: 50mM Tris-HCl, pH 8.0
50 mM EDTA pH 8
100 mM NaCl
0.5% SDS

6.4.2 Extraktion von DNA aus der Amnion-Hülle von Maus Embryonen

Das Gewebe wird 3-4 Std bzw. üN in 100 µl Tail-Puffer bei 55°C verdaut (Puffer s. 6.4.1). Nachfolgend wird die genomische DNA durch Zugabe von 10 µl (1/10 Vol) 3 M Kaliumacetat und 300 µl 100% EtOH gefällt. Nun wird für 10 min bei 16000 g zentrifugiert, 2 x in 100 µl 70% EtOH gewaschen und die DNA leicht getrocknet. Das Pellet wird in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Für eine PCR-Reaktion (siehe 6.3.6) wird 1 µl DNA-Lösung eingesetzt.

6.4.3 Genomischer Southern-Blot und Hybridisierung mit DNA-Proben

6.4.3.1 Restriktionsenzymatischer Verdau genomischer DNA

Die genomische DNA wird üN wie folgt verdaut:

10 µg genomische DNA
3 µl 10x Puffer
0.3 µl RNaseA (Stocklösung 10 mg/ml, bei -20°C)
3 µl konzentriertes RE (40 U/µl)
2 µl Spermidin (Stocklösung 0.1 M, bei -20°C)
ad. 30 µl Aq.dest.

6.4.3.2 Auftrennung der genomischen DNA im Agarosegel mit anschließendem Blotting

Die Auftrennung der DNA erfolgt üN im 0.8%igen Agarose-TBE-Gel. Das Gel wird anschließend für 30 min in Denaturierungslösung geschwenkt, wodurch die DNA denaturiert wird. Nachfolgend wird 2 mal 30 min neutralisiert.

Denaturierungslösung: 0.5 M NaOH
1.5 M NaCl

Neutralisierungslösung: 1.5 M NaCl
0.5 M Tris-HCl pH 7.5

20x SSC: 3 M NaCl
0.3 M Natriumcitrat
pH 7

Das Gel wird üN mit 20x SSC geblottet. Hierfür wird eine Brücke mit Whatmanpapier in 20x SSC gebaut um einen ständigen Flüssigkeitstransfer zu garantieren, worauf zunächst das Gel, darauf eine feuchte (2x SSC) Hybridisation Hybond N+ Membran (Amersham), zwei Lagen mit 2x SSC angefeuchtetes 3MM Filterpapier (Whatman) und zuletzt mehrere Lagen Zellstoff gestapelt. Der Blot wird beschwert und am nächsten Tag abgebaut.

6.4.3.3 Hybridisierung der genomischen DNA mit einer DNA-Sonde

Der Filter, auf dem sich nach dem Blotten die genomische DNA befindet, wird in 2x SSC geschwenkt und die DNA wird mittels UV-Licht an die Membran gebunden. Anschließend wird der Filter in 10 ml Rapid Hyb Buffer (Amersham) mit der markierten DNA (s. 6.3.8) bei 65°C für mindestens 3 Std hybridisiert, in 2x SSC/0.1% SDS bei RT; 1x SSC/0.1% SDS bei 42°C oder 0.5x SSC/0.1%SDS bei 65°C (zunehmende Stringenz) nach Bedarf gewaschen und ein Autoradiographie-Film wird üN auf dem Blot exponiert.

6.5 Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)

Alle Arbeiten mit RNA werden mit Handschuhen und unter der Verwendung von Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser durchgeführt.

6.5.1 *Präparation von Gesamt-RNA aus embryonalem Hirngewebe*

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgt nach Anleitung mit dem RNeasy® Midi Kit (Qiagen). Dazu wird das Gewebe zunächst gewogen um die Menge an Lysispuffer (RLT) anpassen zu können. Für 200 mg Gewebe wurden 4 ml Puffer verwendet. Das Gewebe wird in diesem Puffer unter Verwendung eines Dispergiergerätes zerkleinert. Das Lysat wird entsprechend der Anleitung weiterbehandelt.

6.5.2 *Überprüfung der Integrität der RNA mittels eines Agarose-Geles*

Ein 1.5% iges Gel wird mit 1x Laufpuffer und 7.4 % Formaldehyd hergestellt. Die RNA-Proben werden mit 1x Ladepuffer bei 65°C für 15 min erhitzt und dann auf Eis abgeschreckt. Nach der Zugabe von 2 ng/µl EtBr werden die Proben auf das mit 1x Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt üN.

5x Laufpuffer: 0.1 M MOPS, pH 7.0
 40 mM Naacetat

ad. 800 ml mit DEPC-Wasser auffüllen, pH 7.0 einstellen und anschließend 5 mM EDTA (10 ml Stocklösung 0.5 M) zugeben. Das Endvolumen beträgt 1l. Diese Lösung wird steril filtriert und lichtgeschützt gelagert.

| | | |
|-------------------------|-------|----------------|
| 10x Lade-Puffer: | 50% | Glycerol |
| | 1 mM | EDTA, pH 8.0 |
| | 0.25% | Bromphenolblau |
| | 0.25% | Xylencyanol FF |
| | | DEPC-Aq.dest. |

6.6 Allgemeine Methoden zur Arbeit mit dem Prokaryonten *E.coli*

6.6.1 Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen werden Glycerinstocks angefertigt (50% Glycerin/50% Bakterienkultur), die bei -80°C gelagert werden.

6.6.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Etwas Material einer bei -80 °C gelagerten *E.coli DH5α* (Genotyp s. Anhang) Glycerinkultur wird auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Von der üN bei 37°C inkubierten Bakterienplatte wird ein Klon in 2.5 ml LB-Flüssigmedium resuspendiert und üN bei 37 °C im Luftschüttler (220 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag werden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser üN-Kultur angeimpft. Die Bakterien werden solange bei 37°C und 175 rpm im Schikanekolben geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0.3-0.4 erreicht haben. Dann wird die Suspension bei 3000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet auf Eis mit 1/10 Vol. (10 ml) TSS resuspendiert. Pro Transformation werden 200 µl der Zellen eingesetzt.

| | | |
|-------------------|------|-----------------------------|
| LB-Medium: | 10 g | Bactotrypton (Difco) |
| | 50 g | Bacto-Yeast-Extract (Difco) |
| | 10 g | NaCl |

ad. 800 ml Aq.dest. auffüllen, auf pH 7.0 einstellen. Auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren. Bei 4°C lagern.

TSS: 50 ml 2 x LB (autoklaviert)
33 ml 30% Polyethylenglycol (PEG) (frisch, steril filtrieren)
5 ml DMSO
5 ml 1 M MgCl₂ (autoklaviert)
7 ml Aq.dest

6.6.3 Chemische Transformation von Bakterien

Bei der Transformation wird die Zellwand von Bakterien kurzzeitig durchlässig gemacht, so dass die Vektoren in die Bakterien eindringen können. Diese werden dann im Zuge der Vermehrung der Bakterien vervielfältigt. Die Vektoren enthalten Resistenzgene für bestimmte Antibiotika, so dass die transformierten Bakterien auf die Aufnahme des Plasmides hin selektioniert werden können.

Hier wird ein Hitzeschock dazu benutzt, die Membran permeabel zu machen. Dazu werden 200 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend werden ca. 50 ng DNA bzw. 1/2 Ligationsansatz (s. 6.3.5) zugegeben und vorsichtig unter die Bakterien gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wird der Hitzeschock bei 42°C für 30 sek im Wasserbad durchgeführt. Danach werden 800 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 1 Std bei 37°C geschüttelt. 50-200 µl transformierte Bakterienlösung werden auf Selektionsplatten (LB-Agar-Ampicillin (Amp) Platten (100 µg/ml) oder LB-Agar-Kanamycin (Kan) (50 µg/ml) ausplattiert.

LB-Agar: LB-Medium (s. 6.6.2) +1.5% Agar (Bacto-Agar, Difco)

6.6.4 Präparation von Vektor-DNA aus Bakterien

Die Extraktion von Vektor-DNA aus E.coli basiert auf der modifizierten "Alkalischen Lyse" Methode von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Es werden je nach Menge der Bakterien suspension sog. „Mini“- (3-5 ml Bakterienkultur) und „Maxipreps“ (100 ml Bakterienkultur) gemacht. Dazu werden das QIAprep[®] Miniprep Kit und QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet.

6.7 Allgemeine Methoden zur Arbeit mit der Hefe *Sacharomyces cerevisiae*

6.7.1 Kultivierung und Selektion auf bestimmte Eigenschaften

Die Verwendung auxotropher Hefestämme erlaubt es, durch selektives Auslassen bestimmter Komponenten im Nährmedium wie z.B. Aminosäuren nach Hefezellen zu selektieren, die einen Vektor aufgenommen haben und dadurch zur Synthese des fehlenden Stoffes befähigt sind. Nicht transformierte Hefe wird in sog. YPDA-Vollmedium kultiviert (Platten- oder Flüssigkultur). Vektor-transformierte Hefen werden hingegen in Minimalmedium (SD = "single dropout" Medien) kultiviert.

Die hier verwendeten Stämme AH109 und Y187 (Genotyp s. Anhang) sind defizient für die Synthese von Adenin, Tryptophan, Leucin und Histidin. Hefen, die im Rahmen des Hefe Zwei-Hybrid Systems mit dem Beute-Vektor pGBKT7 transformiert worden sind, der ein Gen enthält, das die Hefe zur Synthese von Tryptophan befähigt, werden auf SD/-Trp Medium kultiviert. Diesem Medium fehlt die Aminosäure Tryptophan. Hefen, die mit dem Beute-Vektor pGADT7 transformiert wurden, sind in der Lage auf SD/-Leu zu wachsen. Der pGADT7 Vektor enthält ein Gen, das die Synthese von Leucin vermittelt.

YPDA-Vollmedium: 20 g/l Peptone (Difco)
 10 g/l yeast extract (Difco)

YPDA-Vollmedium-Platten: YPDA-Vollmedium
 20 g/l Agar (Difco)

6.7.2 Herstellung kompetenter Hefezellen im kleinen Maßstab

1 ml YPDA-Medium wird mit einer 2-3 mm großen Hefekolonie angeimpft. Nach Homogenisierung wird die Suspension in 50 ml YPDA überführt und in einem 500 ml Kolben bei 30°C und 250 rpm für 16-18 Stunden inkubiert bis eine OD von $OD_{600} > 1.5$ erreicht ist. Von dieser Übernachtskultur werden 30 ml abgenommen und in 300 ml frisches Medium (in einem 2 l Kolben) überführt. Die OD dieser Kultur wird alle 30 min überprüft bis sie eine OD von 0.4-0.6 erreicht. Die Hefezellen werden bei 1000 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1.5 ml einer frisch hergestellten 1x TE-Lösung resuspendiert und aliquotiert.

10x TE (Tris EDTA) Puffer, pH 7.6: 100 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA (pH 8), autoklavieren

6.7.3 Transformation von Hefe im kleinen Maßstab

Man gibt 0.1 µg der DNA, die transformiert werden soll und 0.1 mg Heringssperma DNA (Clontech, 10µg/µl) in ein Eppendorfgefäß. Es werden 100 µl der kompetenten Hefezellen (s. 6.7.2) hinzugefügt und anschließend werden 0.6 ml einer sterilen PEG/LiAc-Lösung zu den Ansätzen pipettiert. Der gevortexte Ansatz wird für 30 min bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl DMSO werden die Lösungen durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Zur Aufnahme der Vektor-DNA in die Hefezellen werden die Ansätze 15 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert (Hitzeschock) und dann für 2-5 min auf Eis gelagert. Durch Zentrifugation (5 sec bei 16000 g und RT) erfolgt die Abtrennung der Zellen vom Überstand. Die Zellen werden in 0.5 ml sterilem 1x TE-Puffer (s. 6.7.2) resuspendiert. Jeweils 100 µl aus dem Transformationsansatz werden auf SD-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C für 2-4 Tage inkubiert.

PEG/LiAc Lösung: 40% Polyethylene Glycol (PEG 3350)
1x TE
1x LiAc

10x LiAc: 1M Lithium acetat. pH 7.5 mit verdünnter Essigsäure einstellen; autoklavieren

6.7.4 Isolation von Proteinen aus Hefe

Eine 5 ml üN-Kultur des transformierten Hefestammes, aus dem die Proteine isoliert werden sollen, wird aus einer 1-2 mm großen Hefekolonie in entsprechendem Selektionsmedium angelegt. Die üN Kultur wird 1 min lang gevortext um Klumpen zu lösen. Mit dieser Kultur werden jeweils 50 ml frisches Medium inokuliert und bei 30°C und 220-250 rpm inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte zwischen 0.4-0.6 betragen. Der exakte Wert wird mit der Anzahl der ml der Kultur multipliziert. Dies ergibt die sog. OD₆₀₀ units (z.B.: 55ml x 0.6 OD = 33 OD₆₀₀ units). Die Kultur wird rasch in einem zur Hälfte

mit Eis gefüllten Zentrifugenröhrchen abgekühlt und bei 1000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Es wird erneut zentrifugiert. Um die Hefezellen aufzubrechen, wird der sog. „Cracking-Puffer“ auf 60°C vorgewärmt. 100 µl cracking Puffer werden pro 7.5 OD₆₀₀ units eingesetzt. Für die im Beispiel berechneten 33 units werden also 0.44 ml Puffer benötigt. Das Zellpellet wird in dem Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf Glassperlen (425-600 µm Durchmesser) gegeben, wobei 80 µl Perlen auf 7.5 OD₆₀₀ units verwendet werden. Das Gemisch wird für 10 min bei 70°C erwärmt. Anschließend wird für mindestens 1 min heftig gevortext. Die Glasperlen werden bei 16000 g für 5 min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorf-Tube überführt. Um eine hohe Proteinausbeute zu garantieren, wird das Glasperlen-Pellet für 5 min im Wasserbad gekocht und erneut für 1 min gevortext. Es wird für 5 min zentrifugiert und der Überstand wird mit dem ersten Überstand vereinigt.

Cracking Puffer: Cracking Puffer Stocklösung: 1 ml
β-Mercaptoethanol 10 µl
Protease Inhibitor Cocktail 70 µl
PMSF 50 µl einer 1 M Stocklösung

Cracking Puffer Stocklösung: Urea 8 M
SDS 5% w/v
Tris-HCl (pH 6.8) 40 mM
EDTA 0.1 mM
Bromophenol Blau 0.4 mg/ml
in Aq. dest.

Protease Inhibitor Cocktail: 1 Complete Mini Tablette (Sigma) wird in 1 ml Tris-HCl (pH 6.8) aufgelöst.

6.7.5 Isolierung von Vektoren aus Hefe

Der zu untersuchende Hefeklon wird mit einer sterilen Impföse gepickt und 1 ml SD-Selektionsmedium wird angeimpft und üN inkubiert. Das Pellet der abzentrifugierten üN-Kultur wird in 500 µl S-Puffer (enthält frisch zugesetzte Lytikase in einer Konzentration von 50U/µl) resuspendiert und der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer wird gevortext und der Ansatz für 30

min in den auf 65°C temperierten Heizblock gestellt. Durch Zugabe von 166 µl 3 M Kaliumacetat pH 5,5 wird die genomische Hefe-DNA gefällt und zusammen mit Proteinen und Zelltrümmern nach 10 min Inkubation auf Eis durch Zentrifugation (16000 g, 4°C) von der übrigen Lösung getrennt. Der überstand wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 800 µl 100 % Ethanol. Der Ansatz wird für 10 min auf Eis belassen und dann 15 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, ca. 5 min an der Luft getrocknet und in 40 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die isolierte DNA stellt eine Mischung aus chromosomaler Hefe-DNA und Vektor-DNA dar.

S-Puffer: 10 mM K₂HPO₄ pH 7.2
 50 mM β-Mercaptoethanol
 10 mM EDTA pH 8,0
 pH auf 7,2 einstellen
 + 50 U/µl Lyticase (frisch)

Lysis-Puffer: 25 mM Tris-HCl pH 7,5
 25 mM EDTA pH 8,0
 2,5 % SDS
 pH auf 7,5 einstellen

6.7.6 PCR aus Hefezellysat

Dazu wird etwas Material einer Hefekolonie mit einer Pipettenspitze abgenommen und in 20 µl H₂O resuspendiert. Es werden 10 µl Lyticase (67 mg/ml ≈ 900 u/ml in 0.01 M Phosphatpuffer/50% Glycerol) zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 5 min bei 95°C erhitzt um das Enzym und die DNA zu denaturieren. Nach 2 min Kühlung auf Eis wird 1 µl dieser Suspension für die PCR eingesetzt. Die fertigen PCR Produkte werden auf einem 1.2 %igen Agarose Gel analysiert.

6.8 Das Hefe Gal4 Zwei-Hybrid-System – Etablierung der Köder- und Beute-Hefestämme

Das Zwei-Hybrid-System ist ein molekulargenetischer Ansatz, um Protein-Protein Wechselwirkungen *in vivo* zu untersuchen.

Das 1989 von Fields and Song entwickelte Hefe-Zwei-Hybrid System basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren voneinander unabhängige und trennbare DNA-Binde- und transkriptionelle Aktivierungsdomänen aufweisen (Fields und Song, 1989).

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner wird ein Fusionskonstrukt aus der DNA-Bindedomäne des Hefe Transkriptionsfaktors GAL4 (GAL4-BD) und dem bekannten Protein hergestellt (bait = Köder) und in einen haploiden Mat α Hefestamm transformiert. Ein zweiter Vektor enthält die GAL4 Transaktivierungsdomäne (GAL4-AD) und Sequenzen aus einer cDNA Bibliothek (prey = Beute), der in den haploiden Mat α Hefestamm transformiert ist. Durch Ko-Kultivierung beider Stämme bilden sich diploide Hefeklone, die sowohl den Köder als auch den Beute Vektor enthalten. Die Hefezelle besitzt GAL4 abhängige Reportergene. Die GAL4-DNA-Bindedomäne kann an sog. „upstream activating sequences“ (UAS) binden, die in den Promotoren dieser Reportergenen liegen. Im Falle einer Interaktion von „Köder“ und „Beute“ kommen die GAL4-BD und die GAL4-AD in gegenseitige Nähe und erleichtern dadurch die Anlagerung des gesamten Transkriptionskomplexes was zur Transkription der Reportergene führt. Bei den Reportergenen handelt es sich um Gene, die der Hefe das Wachstum auf sog. Selektionsmedien ermöglichen. Werden diese Gene transkribiert ist die Hefe in der Lage auf Medium, dem die Aminosäuren Histidin und Adenin fehlen zu wachsen.

Um zwei Proteine gezielt auf eine Interaktion miteinander zu testen, werden entweder zwei haploide Hefestämme miteinander verpaart, die jeweils das Köder- oder Beuteprotein exprimieren oder beide Vektore werden als Alternative in einen Hefestamm ko-transformiert (s. Abb. 56).

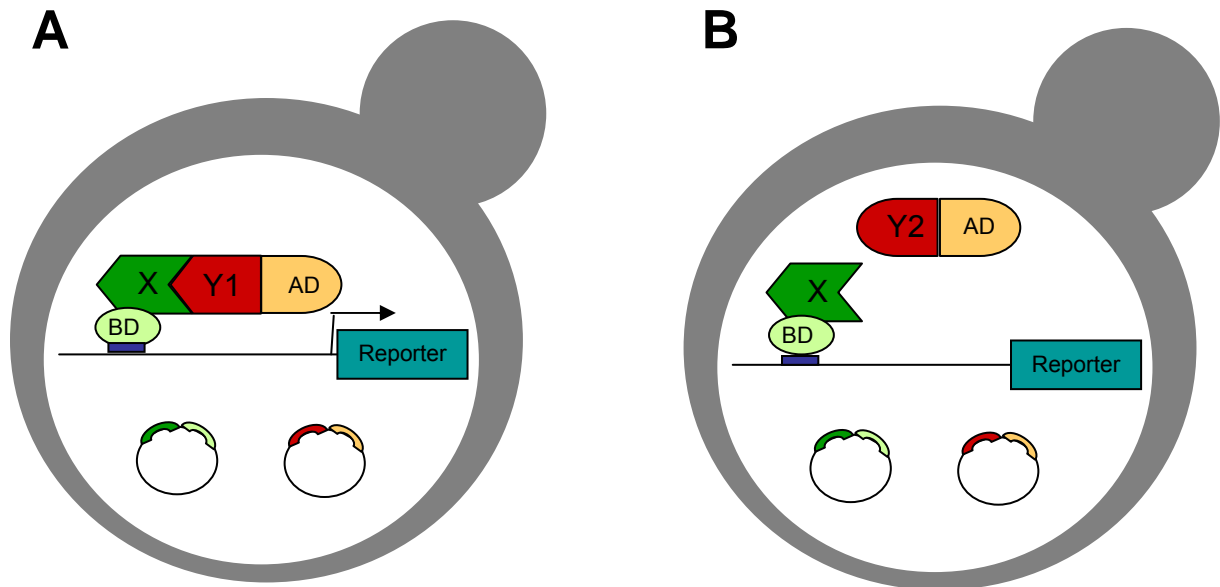


Abb. 56: Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid Systems. Das Köder-Fusionsprotein zwischen der GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) und dem Köderprotein (hier: X) wird gemeinsam mit dem Beute-Fusionsprotein zwischen der GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne (AD) und dem Beuteprotein (hier: Y) in einer Hefezelle exprimiert (entweder eingebracht durch Ko-Transformation oder Verpaaren zweier Hefestämme) (dargestellt als Vektoren innerhalb der Hefezellen). **(A)** Findet eine Interaktion zwischen Köder- und Beute-Protein statt, kommen BD und AD in Nähe zueinander und die Reportergene werden aktiviert. **(B)** findet keine Interaktion statt, werden auch die Reportergene nicht aktiviert.

6.8.1 Verifizierung des korrekten Phänotyps der Hefe-Stämme AH109 und Y187

Die beiden verwendeten Hefestämme AH109 und Y187 sind auxotroph gegenüber Tryptophan (Trp), Leucin (Leu), Histidin (His) und Adenin (Ade). Beide Stämme sollten daher nicht auf Selektionsmedien, denen diese Aminosäuren bzw. diese Nukleinbase (Adenin) fehlen, wachsen. Die Gene für die Synthese von Leucin und Tryptophan sind Selektionsmarker für die Überprüfung der Aufnahme des Ködervektors (Tryptophan) und des Beutevektors (Leucin), Gene für die Synthese von Adenin und Histidin stellen Reportergene dar, die im Falle einer Interaktion zwischen dem Köder und einem Beuteprotein aktiviert werden.

Um den Phänotyp der Hefen zu überprüfen wurden sie auf verschiedenen Medien ausplattiert, denen jeweils ein Selektionsmarker fehlte (bezeichnet als SD (selective dropout)-Medium). Die beiden Hefestämme verhielten sich beim Wachstumstest den Erwartungen entsprechend. Sie waren nicht in der Lage auf den Selektionsmedien zu wachsen, jedoch war geringes Hintergrundwachstum des Stammes AH109 auf Medium ohne Histidin erkennbar. Dieses Phänomen ist bekannt, da laut Herstellerangaben die Ausschaltung des Promoters bei der Konstruktion des His-Reportergens nicht zu 100 % möglich war (laut BD Clontech).

Das Hintergrundwachstum auf SD/-His lässt sich vermeiden, indem man einen kompetitiven Inhibitor der Histidin Proteinproduktion, das 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) dem Medium hinzugibt. Dadurch wird die Synthesefähigkeit der Hefe für Histidin unterdrückt und es können nur Hefen die zwei miteinander interagierende Proteine innehaben, wachsen, da die Inhibition der Histidin-Synthese durch die Aktivierung des entsprechenden Reportergenes überwunden werden kann. Durch Erhöhung der Konzentration kann auf besonders starke Interaktoren selektieren werden.

Um das Hintergrundwachstum des Stammes AH109 zu verhindern, wurde die optimale 3-AT Konzentration durch Ausstreichen der Hefen auf SD/-His Medium mit 3-AT in den Konzentrationen 1 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM und 10 mM, getestet. Bei einer Konzentration von 3 mM war kein Wachstum der Hefe mehr zu verzeichnen. Diese Konzentration wurde daher in den durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid Screens den SD/-His Medien zugesetzt.

6.8.2 Herstellung der Köderproteine für den Hefe Zwei-Hybrid Screen

6.8.2.1 Klonierung der Köderkonstrukte pGBKT7-*Mgn* und pGBKT7-*Ngn2*

Es sollte ein Fusionsprotein zwischen der GAL4-DNA-Bindedomäne (441 Bp) (n-terminal) und *Mgn* (722 Bp) (c-terminal) konstruiert werden. Bei der Klonierung musste beachtet werden, dass die *Mgn* cDNA kein Startkodon (ATG) enthält, um ein Fusionsprotein zu garantieren, jedoch ein Stop-Kodon, um die Translation zu terminieren. Mittels PCR (Primersequenzen s. Anhang) wurde ein *Mgn* Fragment (719 Bp, ohne ATG, mit TGA) von der cDNA des *Mgn* Transkripts (722 bp) (von J.Guimera zur Verfügung gestellt) amplifiziert. Mit Hilfe der verwendeten Primer

wurden eine *EcoRI* Schnittstelle am 5'Ende und eine *SaI* Schnittstelle am 3'Ende integriert. PCR-Fragment und Vektor wurden beide mit diesen Enzymen linearisiert und durch eine Ligation miteinander verbunden (s. Vektorkarte, Anhang).

Die *Ngn2* cDNA wurde aus dem pGADT7 Vektor (zur Klonierung s. 6.8.3.1) mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* extrahiert und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Köder-Vektor pGBKT7 mittels Ligation eingesetzt (s. Vektorkarte, Anhang).

Die beiden Konstrukte wurden zur Vermehrung in *DH5 α* Bakterien transformiert. Kolonien, die die Konstrukte enthielten, wurden mittels restriktionsenzymatischem Kontrollverdau mit *EcoRI/SaI* bzw. *EcoRI/BamHI* identifiziert. Die korrekte Nukleotidabfolge wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA verifiziert.

6.8.2.2 Transformation der Köder-Vektoren pGBKT7-*Mgn* und pGBKT7-*Ngn2* in den Hefestamm AH109

Die beiden Köder-Konstrukte pGBKT7-*Mgn* und pGBKT7-*Ngn2* als auch die drei Kontrollen des Herstellers Clontech, pGBKT7-*p53* (enthält einen Teil des *p53* Gens), pGBKT7 (enthält die GAL4 Bindedomäne) und pGBKT7-GAL4, das den gesamten GAL4 Transkriptionsfaktor enthält, wurden in den Stamm AH109 transformiert. Die transformierten Hefen wurden auf SD/-Trp Medium selektiert.

6.8.2.3 Test auf Selbstaktivierung der Hefe-Reportergene durch die Köder-Konstrukte pGBKT7-*Mgn* und pGBKT7-*Ngn2*

Um eine mögliche unspezifische Aktivierung der Reportergene durch die Köderproteine *Mgn* und *Ngn2* auszuschliessen, wurden das Wachstum der mit dem *Mgn*- oder *Ngn2*-Köder-Vektor transformierten AH109-Hefen auf SD/-Trp/-His (+3 mM 3-AT) und SD/-Trp/-Ade Agarplatten überprüft. Würde eine Selbstaktivierung der Reportergene („Adenin“ und „Histidin“) stattfinden, wäre die Hefe in der Lage, auf diesen Selektionsmedien zu wachsen. Als positive Kontrolle wurde der pGBKT7-GAL4 Vektor eingesetzt, der sowohl die DNA-Bindedomäne als auch die Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionfaktors enthält. Das GAL4 Genprodukt ermöglicht die Aktivierung der Reportergene und damit das Wachstum auf Medien ohne Histidin und Adenin.

Die Köder waren nicht in der Lage die Reporter Gene eigenständig zu aktivieren.

6.8.2.4 Überprüfung der Toxizität der pGBKT7-*Mgn* und pGBKT7-*Ngn2* Köderkonstrukte für die Hefe

Um das einwandfreie Wachstum der Köderstämme im Hefe-Zwei-Hybrid Screen zu garantieren, ist es wichtig festzustellen, ob die Köderproteine toxisch für die Hefezellen sind, in denen sie exprimiert werden. Dazu wird das Wachstum der mit den *Mgn*- oder *Ngn2*-Köder-Vektoren transformierten AH109 Hefezellen mit wildtypischen AH109 Hefezellen verglichen. Eine 50 ml Kultur des jeweiligen Stammes wird in SD/-Trp/Kanamycin (50 µg/l) Medium mit einer großen 2-3 mm Kolonie inokuliert und üN bei 30°C im Luftschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wird die OD₆₀₀ der Kultur überprüft. Es stellte sich heraus dass die Teilungsaktivität der Hefen durch die Expression der Köderkonstrukte nicht beeinflusst wird. Die optische Dichte (OD) betrug am Morgen nach der Inokulation mit dem AH109 [pBGKT7-*Mgn*] Stamm 0.92, die von AH109 [pBGKT7-*Ngn2*] betrug 0.98 während die Vergleichs-OD bei 1.1 lag. Damit weisen die Köder-Konstrukte keine Toxizität für die Hefezellen auf.

6.8.3 Herstellung der Beuteproteine für den Hefe Zwei-Hybrid Screen

6.8.3.1 Klonierung von *Mgn*, der bHLH Gene *Mash1*, *Ngn1*, 2, 3 und von *Nr2f2* in den Beute-Vektor pGADT7

Da die genomische DNA für die Gene *Mash1* (695 bp), *Ngn1* (734 bp), *Ngn2* (791 bp) und *Ngn3* (634 bp) intronlos ist, konnten die Fragmente mit spezifischen Primern unmittelbar von wildtypischer Maus-DNA amplifiziert werden.

Dabei wurden über die verwendeten Primer (Primersequenzen s. Anhang) in die *Mash1*, *Ngn1* und *Ngn2* PCR-Fragmente am 5' Ende eine *EcoRI* Schnittstelle und am 3' Ende eine *ClaI* Schnittstelle eingebaut. Für die Klonierung von *Ngn3* wurde 5' eine *ClaI* und 3' Primer eine *BamHI* Erkennungsstelle integriert, da im *Ngn3* Gen eine *EcoRI* Schnittstelle vorhanden ist. *Mash1*, *Ngn1*, *Ngn2* und *Ngn3* wurden in den Beute Vektor pGADT7 kloniert, der mit den jeweiligen Enzymen linearisiert worden war. Die GAL4-AD Domäne ist dabei wie die GAL4-BD Domäne n-terminal

zu den bHLH Genen gelegen. Dementsprechend enthielten die klonierten Fragmente kein ATG, jedoch das jeweilige Stopcodon der Gene (Vektorkarten s. Anhang).

Mgn wurde aus dem pGBKT7 Vektor in den pGADT7 Vektor umkloniert, indem es mit den RE *EcoRI* und *SalI* extrahiert wurde und in den mit den RE *EcoRI* und *XhoI* (*XhoI* ist ein Isoschizomer zu *SalI*) linearisierten pGADT7 Vektor eingesetzt wurde (Vektorkarten s. Anhang).

Die gesamte 1244 Basenpaar lange *Nr2f2* cDNA (von M.-J. Tsai zur Verfügung gestellt) wurde mittels per PCR angehängter *EcoRI* (5') und *XhoI* (3') Erkennungsstellen ebenfalls in den Beute-Vektor pGADT7 kloniert (Primersequenzen und Vektorkarte s. Anhang).

6.8.3.2 Transformation der Beute-Konstrukte pGADT7-*Mgn*, -*Mash1*, -*Ngn1*, -*Ngn2*, -*Ngn3* und -*Nr2f2* in den Hefestamm Y187

Die Vektoren pGADT7-*Mgn*, pGADT7-*Mash1*, pGADT7-*Ngn1*, pGADT7-*Ngn2*, pGADT7-*Ngn3* und pGADT7-*Nr2f2* wurden in den Hefestamm Y187 transformiert. Als Kontroll-Vektoren des Herstellers wurde der Vektor pGADT7-SV40 (enthält einen Teil des large T-Antigens, der als Protein in der Lage ist mit P53 zu interagieren) und der pGADT7 Vektor, der die Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors enthält (und mit der BD Domäne interagieren kann), transformiert.

6.8.4 Verpaaren zweier transformierter Hefe Stämme im kleinen Maßstab und Selektion auf eine Interaktion

Das Verpaaren von Hefe im kleinen Maßstab wurde eingesetzt, um MGN gezielt auf eine Interaktion mit den bHLH Proteinen *Mash1*, *Ngn1*, *Ngn2* und *Ngn3* und auf Homodimerbildung zu testen. Dazu wird jeweils eine Kolonie der beiden Hefestämme, die eines der beiden zu testenden Köder- oder Beute-Vektoren enthalten, gemeinsam in 1 ml 2x YPDA Medium üN bei 30°C unter Schütteln (100 rpm) inkubiert. Die diploiden Hefen werden auf SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His Selektionsmedium ausplattiert um auf das Vorhandensein beider Vektoren und auf eine Interaktion der beiden Proteine zu selektieren.

6.8.5 Screening einer konstruierten cDNA Bibliothek auf Interaktionspartner von Mgn

Gewebe aus der Mittel-/Hinterhirn Region von insgesamt 100 wildtypischen Maus-Embryonen der Stadien E9, E9.5, E10 und E10.5 wurde isoliert. Aus dem präparierten Gewebe wurde Gesamt-RNA isoliert (s. 6.5.1). Diese RNA wurde zur Konstruktion der cDNA Bibliothek mit Hilfe des „Matchmaker library construction and screening kit“ von Clontech, verwendet. Das Protokoll ist im Internet unter „<http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3529-1.pdf>“ zu finden. Das Prinzip zur Herstellung doppelsträngiger cDNA aus Gesamt-RNA beruht auf der von Clontech entwickelten „Smart-Technologie“ (s. Abb. 57). Dabei wird aus Gesamt RNA mittels RT-PCR eine doppelsträngige cDNA hergestellt, die an beiden Enden definierte Sequenzen enthält. Diese Sequenzen sind homolog zu den "Endsequenzen" des linearisiert vorliegenden pGADT7-Rec Vektors. Durch die homologe Rekombination dieser komplementären Enden werden die cDNAs in den Vektor kloniert. Gleichzeitig wird der Hefestamm AH109 mit diesem Vektor und dem Köder-Vektor pGBKT7-*Mgn* transformiert. Da die gleichzeitige Aufnahme der beiden Vektoren ein kritischer Schritt dieses Hefe Zwei-Hybrid Systems ist, wurden kommerzielle kompetente AH109 Zellen benutzt (Clontech).

Nach erfolgter Transformation werden die AH109 Hefezellen auf ca. 50 15 cm Ø Platte Selektionsmedium (SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His + 3 mM 3-AT) ausplattiert, um auf eine Interaktion der beiden von den cDNA-Vektoren kodierten Proteine zu selektieren.

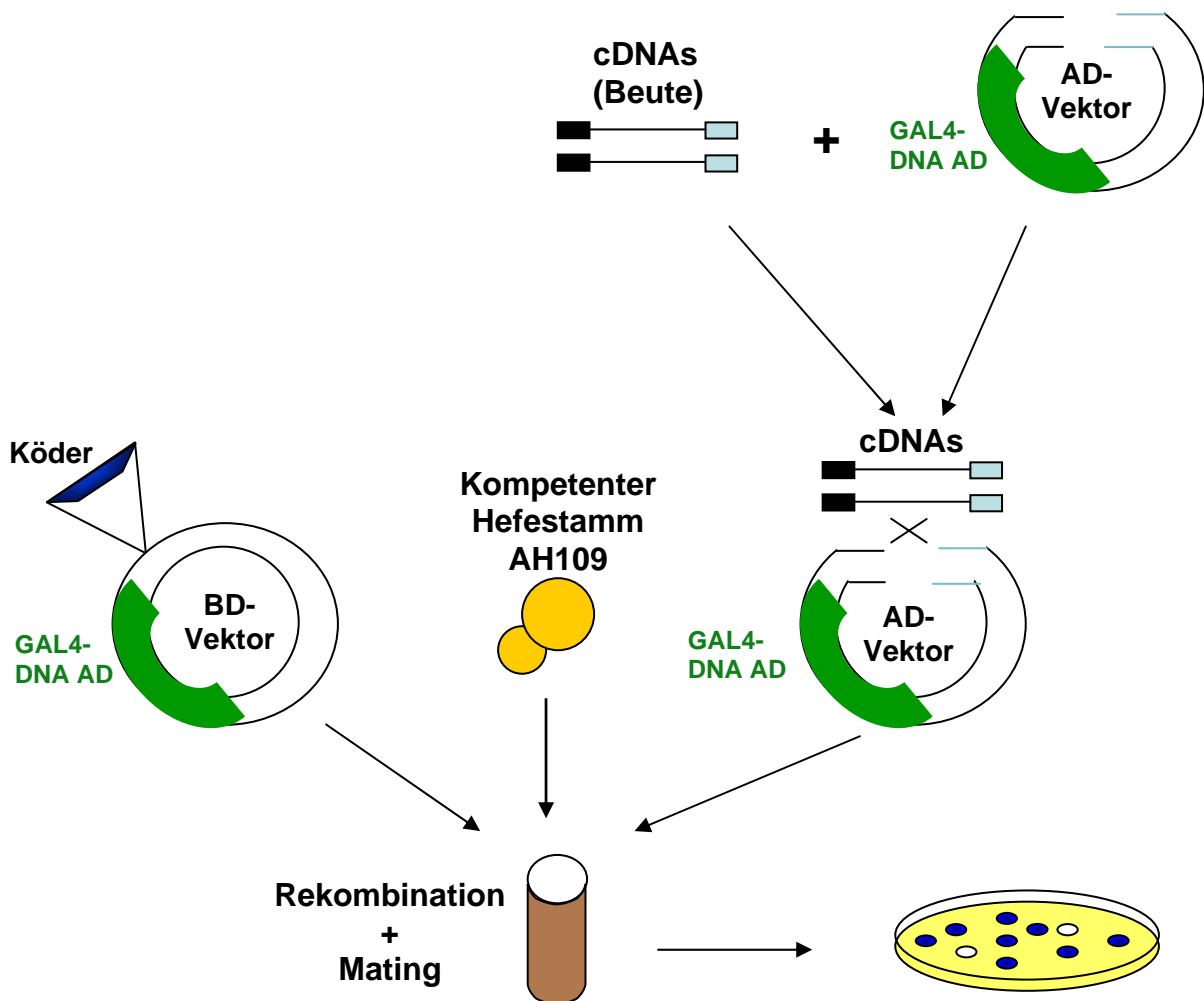


Abb. 57: Strategie der Konstruktion der cDNA Bibliothek für den unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen. In dieser „Eintopfreaktion“ werden die Ausgangs-cDNA (aus E9-E10.5 Mittelhirn Gewebe) gemeinsam mit dem linearisierten Beute Vektor (AD-Vektor) und gleichzeitig mit dem Ködervektor (BD-Vektor) mit dem Hefestamm AH109 vereint. Es findet zunächst die Rekombination der cDNAs in den AD-Vektor statt. Anschließend nehmen die Hefezellen in einem Transformationsschritt idealerweise beide Vektoren auf. Die Hefezellen werden schließlich auf eine Interaktion zwischen Köder und Beute selektiert.

6.8.5.1 Selektion von potentiellen Proteininteraktoren des Hefe Zwei-Hybrid Screens

Um für eine sinnvolle Analyse die große Anzahl der im Hefe Zwei-Hybrid Screen erhaltenen Kolonien (626) zu minimieren, wurden die stärksten Interaktoren selektiert. Aus diesem Grund wurden die Kolonien auf 25 mM 3-AT haltigem Selektionsmedium ausgestrichen. Lediglich die stärksten Interaktoren sind in der Lage den Histidin-Synthese Inhibitor zu „überwinden“. Es wurden auf diese Art insgesamt 50 Kolonien selektiert. Zusätzlich wurde ein β -Galaktosidase (β -Gal) Test auf Replika-Platten durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren. Dabei wird das Reportergen lacZ das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert mit Hilfe von X-Gal als Substrat nachgewiesen werden.

6.8.5.2 β -Galaktosidase Test

Für jede zu testende Medienplatte mit zu testenden Kolonien wird ein steriles Whatmanfilterpapier in eine 15 \varnothing cm Kulturschale gelegt und mit 7.5-10 ml Z-Puffer/X-Gal Lösung getränkt. Dann werden die Hefekolonien mit einem Nitrocellulosefilter von der Platte abgezogen. Die Kolonien werden in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Anschließend wird der Filter in die vorbereitete mit X-Gal getränkte Kulturschale gelegt und bei 37°C bis zum Erscheinen einer blauen Färbung um die Kolonie, inkubiert.

X-Gal Stocklösung: 20 mg/ml in DMSO

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Z-Puffer: | Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O | 16.1 g/l |
| | NaH ₂ PO ₄ x 7 H ₂ O | 5,5 g/l |
| | KCl | 0,75 g/l |
| | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,246 g/l |
| | pH 7, steril filtrieren | |

Z-Puffer/X-Gal Lösung: 100 ml Z-Puffer
0.27 ml b-Mercaptoethanol
1.67 ml X-Gal-Stocklösung

Mit der DNA aus den Hefe-Kolonien, die eine blaue Färbung zeigten (s. Ergebnisse, 4.1.3.2), wurde eine PCR mit 5' AD und 3' AD Primern (Primersequenzen s.

Anhang), die die in den Beutevektor integrierte cDNA flankieren, durchgeführt. Um die Sequenz der gefundenen putativen Proteininteraktoren festzustellen, wurden alle in der PCR erhaltenen Fragmente (36) mit einem für den Vektor pGADT7-spezifischen Primer am 5' Ende (5' AD Sequenzierungs-Primer, Primersequenz s. Anhang) ansequenziert.

6.8.5.3 Suche nach Homologien in der Blast Datenbank

Die Sequenzen der PCR Fragmente werden auf Homologien zu den DNA-Sequenzen der NCBI Datenbank, (Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) untersucht. Eine mindestens 80%ige Homologie auf Sequenzebene wird als Kriterium gewählt, um eine Protein-Protein Interaktion als „putativ“ zu identifizieren. Es wurde die Nukleotid-Sequenz verglichen, da in der Hefe Leserasterwechsel bekannt sind.

6.8.6 Verifizierung der im unvoreingenommenen und hypothesengetriebenen Hefe Zwei-Hybrid Screen gefundenen Interaktionen

6.8.6.1 Isolation der Beute-Vektoren aus dem unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen

Da die DNA der interessanten Hefekolonien (enthalten *Nr2f2* oder *TGF β 2*) aus dem unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screen ein Gemisch aus Köder- und Beute-Vektor darstellt, erfolgte die Trennung der beiden Vektoren durch Transformation (s. 6.6.3) von *E.coli DH5 α* mit der aus der Hefe isolierten DNA (s. 6.7.5). Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Medium mit Ampicillin ausgestrichen. Da der Köder Vektor Kanamycinresistenz und der Beute Vektor Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt, können nur Bakterien, die den Beute-Vektor aufgenommen haben, wachsen. Es wurden jeweils fünf unabhängige Bakterienklone gepickt und die Inserts mittels für den pGADT7 Vektor spezifischen Primern, die 3' und 5' vom cDNA Insert im Beute-Vektor liegen, amplifiziert. Diese DNA wurde sequenziert und diente der Transformation der Hefe (s. 6.8.6.2).

6.8.6.2 Überprüfung der Interaktionen des unvoreingenommenen Hefe Zwei-Hybrid Screens

Die Beutevektoren pGADT7-*Nr2f2* und pGADT7-*TGFβ2* wurden jeweils in den Hefestamm Y187 transfomiert. Der Hefestamm wurde mit dem AH109 Hefestamm, der den Köder-Vektor pGBKT7-*Mgn* enthielt, verpaart, um die Interaktion zu verifizieren. Das *Nr2f2*-Protein war erneut in der Lage mit *Mgn* zu interagieren, während *Tgfβ2* keine Interaktion mehr mit *Mgn* zeigte.

6.8.6.3 Kontroll-Verpaarungen zur Verifizierung der Interaktionen aus dem unvoreingenommenen und hypothesengetriebenen Hefe Zwei-Hybrid Screen

Bei den Kontrollverpaarungen ging es um die Überprüfung der Spezifität der Protein-Protein Interaktionen des hypothesengetriebenen Hefe Zwei-Hybrid Screens. So wurden die Köder-Proteine *Mgn* und *Ngn2* gegen die AD Domäne auf Wachstum auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade Selektionsmedium getestet. Es war keine Interaktion feststellbar. Die Beute-Proteine *Mgn*, *Mash1*, *Ngn1*, 2 und 3 wurden gegen die BD Domäne getestet. Auch hier war keine Interaktion zu verzeichnen. *Nr2f2* (Y187) wurde ebenfalls gegen die GAL4-BD (AH109) getestet um eine unspezifische Interaktion mit diesem Protein per se auszuschließen. Diese Interaktionen waren negativ. Diese Tests zeigen, dass keine unspezifische Interaktion zwischen Köder und AD-Domäne bzw. Beute und BD-Domäne die Reportergene aktivieren kann.

6.9 Säugetierzellkultur

6.9.1 Klonierung von *Mgn*, *Mash1*, *Ngn2* und *Nr2f2* in Säugetier Expressionsvektoren

Um Proteine in Säugetierzellen effizient exprimieren zu können, müssen die Vektoren, die in die Zellen transfiziert werden sollen, besondere Promotoren enthalten, die eine hohe Expressionsrate der Proteine in diesem System garantieren. Ein typischer Expressionsvektor, der einen solchen Promotor trägt, ist der pcDNA3.1

Vektor. Dieser enthält den viralen CMV Promotor. Es wurde hier ein pcDNA3.1 Vektor, der entweder ein n-terminales FLAG-Tag oder ein MYC-Tag enthielt, verwendet. Diese sog. „tags“ sind kurze DNA-Sequenzen, die für Epitope kodieren, die mit spezifischen dagegen gerichteten Antikörpern detektiert werden können. Dadurch lassen sich an das Tag fusionierte Proteine immun-biochemisch nachweisen, ohne dass ein Antikörper gegen das eigentliche Protein nötig ist. Dem in den Vektor integrierten Tag ist eine „multiple cloning site“ (MCS) angeschlossen, um das Test-Gen integrieren zu können. Wird das Gen im Leseraster kloniert, entsteht ein Fusionsprotein mit dem n-terminalen Tag.

Da sich die Tags jeweils am n-terminus befanden, durften die klonierten cDNAs kein Startcodon enthalten, mussten dafür aber ein Stop-Signal zum Beenden der Translation besitzen. Es wurden spezifische Primer entworfen (Primersequenzen s. Anhang), mit deren Hilfe in einer PCR Reaktion die cDNAs für die Gene *Mgn*, *Mash1*, *Ngn2* und *Nr2f2* amplifiziert wurden, jeweils mit integrierten *EcoRI* und *XhoI* Schnittstellen am 5' und 3'-terminus. Die Fragmente wurden in die Vektoren eingebracht, welche zuvor ebenfalls mit *EcoRI* und *XhoI* geschnitten worden waren (Vektorkarten s. Anhang).

6.9.2 Kultivierung von Zellen

Die hier verwendeten HEK293 Zellen (Fibroblasten) werden bei 37°C in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre in einem Inkubator kultiviert. Als Medium wird DMEM (Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Gibco BRL) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) verwendet. Haben die Zellen etwa 70-80%ige Konfluenz erreicht, werden sie auf zwei oder mehrere Zellkultur-Platten verteilt. Dazu wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit 1 ml Trypsin pro 10 cm Ø Schale für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Dies ermöglicht ein leichtes Ablösen der Zellen. Sollen die Zellen in einer bestimmten Zelldichte ausplattiert werden, wird deren Anzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Brand) bestimmt.

6.9.3 Transiente Transfektion von HEK Zellen

Bei der transienten Transfektion von Zellen wird die DNA nicht stabil in das Genom der Zelle eingebaut sondern bleibt episomal bestehen. Es wurde das FUGENE Reagenz von Roche für die Transfektion verwendet.

Am Tag vor der Transfektion werden 3×10^5 Zellen auf eine 3.5 cm \varnothing Platte ausgesät. Am nächsten Tag erhalten die Zellen 2 Std vor der Transfektion frisches Medium. Für die Transfektion einer 3.5 cm \varnothing Zellkulturschale wird 1 μg DNA (bei zwei Vektoren jeweils 0.5 μg) verwendet. Die Prozedur erfolgt nach Herstellerprotokoll.

6.10 Proteinbiochemische Methoden

6.10.1 Proteingewinnung aus Zellen

24-48 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen „geerntet“ um aus ihnen die gewünschten Proteine zu extrahieren. Dazu werden die Zellen zunächst trypsiniert (s. 5.9.2) und nach Zugabe von Medium zur Inaktivierung des Trypsins (5 ml auf 1 ml Trypsin) werden die Zellen abzentrifugiert. Sie werden 2 mal mit eiskaltem 1x PBS (Gibco BRL) gewaschen und erneut pelletiert. Das Pellet einer 3.5 cm \varnothing Platte wird in 200 μl 1x IP Puffer (im Ko-Immunopräzipitations-Kit enthalten, s. 6.10.3) gelöst, und für 15 min auf Eis inkubiert. Um die Zelltrümmer zu pelletieren, wird für 10 min bei 16000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält das gelöste Protein.

Zur Aufbewahrung wird die Proteinlösung bei -80°C gelagert oder zur späteren Auftrennung über ein SDS PAGE Gel mit 2x Laemmli Puffer versetzt und bei -20°C gelagert.

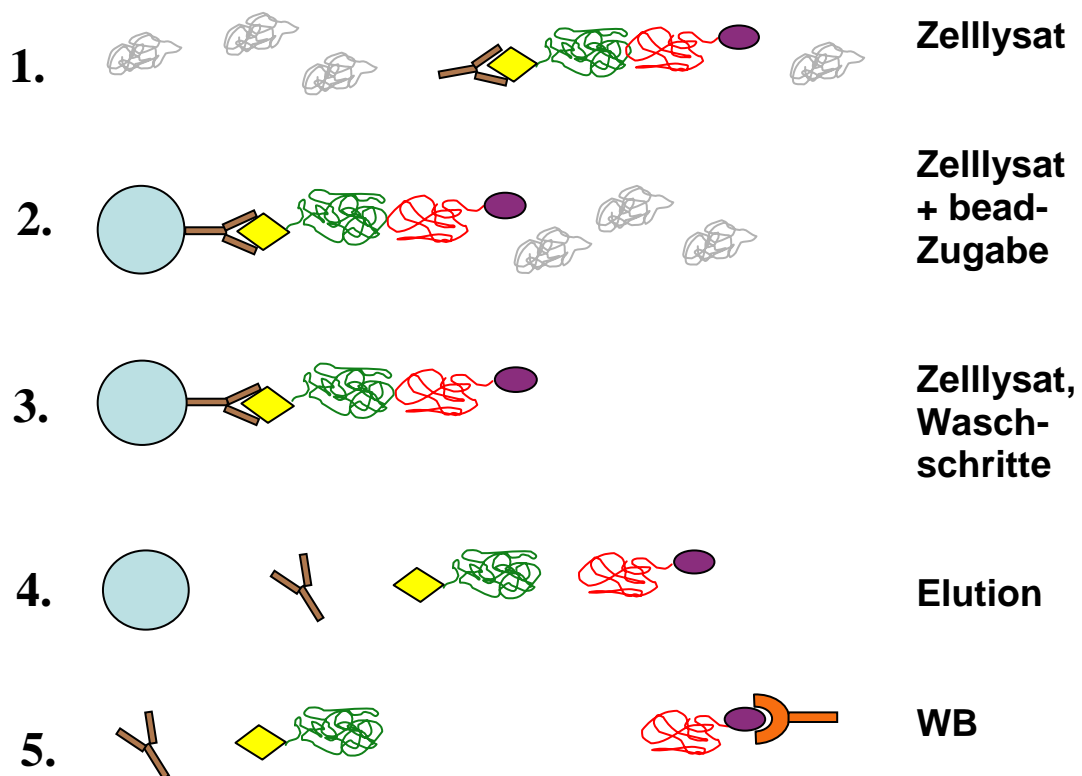
6x Laemmli-Puffer: 300 mM Tris-HCl pH 6.8
60% Glycerol (v/v)
12% SDS (w/v)
600 mM β -Mercaptoethanol (v/v)
0.6% Bromphenolblue (w/v)

6.10.2 Bestimmung der Protein Konzentration

Mit Hilfe des „BCA Protein Assay Reagent Kit“ (Biorad) wird die Gesamt-Proteinkonzentration nach Angaben des Herstellers bestimmt.

6.10.3 Ko-Immunpräzipitation

Das Prinzip der Ko-Immunopräzipitation beruht auf Antigen-Antikörper Bindungen. Der gegen das Test-Protein gerichtete Antikörper (hier: FLAG) bindet an das getagte Test-Protein. An diesem „hängt“ das interagierende Protein. Sog. Protein A Sepharosebeads (Sigma) werden eingesetzt, um den Antikörper mit dem anhängenden Protein-Komplex daran zu binden. Unspezifische Interaktionen werden durch „Waschen“ mit entsprechenden Puffern wieder gelöst. Anschließend wird der Protein-Komplex denaturiert und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Das interagierende Protein wird mit dem gegen das ihm angehängte Tag (hier MYC) gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abb. 58).



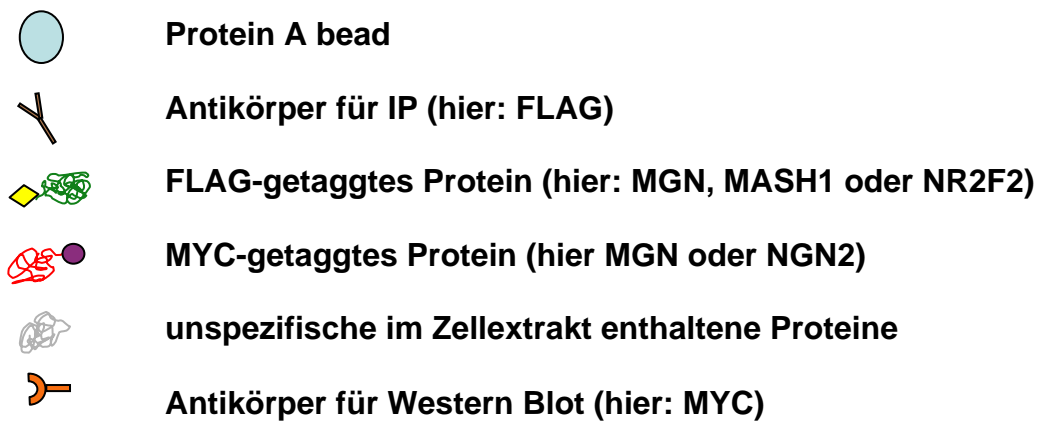


Abb. 58: Prinzip einer Ko-IP: (1) Zum HEK 293 Zellextrakt wird der präzipitierende AK gegeben (hier: α -FLAG). Er bindet an den Protein-Komplex bestehend aus dem Test-Protein und dem interagierenden Protein. Außerdem befinden sich auch andere Zellproteine (grau) im Extrakt. (2) Sepharosebeads werden hinzugefügt. Der Antikörper-Protein Komplex bindet an die beads. (3) Die unspezifischen Proteine, die u.U. auch an die beads, den FLAG AK oder den Protein-Protein Komplex gebunden haben, werden gewaschen. (4) Der Komplex, der am FLAG-AK und damit den beads hängt, wird denaturiert. (5) Der im Western blot verwendete AK (hier α -MYC) erkennt das interagierende Protein.

Für die Ko-Immunopräzipitation wird das „Protein G Immunoprecipitation Kit“ (Sigma Aldrich) verwendet. Die Gesamt-Proteine werden mit 1 x IP-Puffer aus den Zellen extrahiert (s. 6.10.1). Der Zellextrakt (0.1 mg Gesamtprotein) wird mit 1 x IP-Puffer auf 600 μ l verdünnt. Es werden 1.5 μ g Flag-Antikörper (Monoclonal Anti-FLAG[®]M2 mouse, Sigma Kat.nr. F1804; Konz. 1 mg/ml) hinzugefügt und der Zellextrakt wird 1 Std bei 4°C auf einem Taumel-Schüttler inkubiert. In dieser Zeit werden 30 μ l Protein-G-Agarose-Beads 5 mal in 1x IP-Puffer gewaschen (und jeweils bei 12000 g abzentrifugiert). Die Agarose-Beads werden zum Zellextrakt dazugegeben und es wird \ddot{u} N bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die im Kit enthaltenen Säulchen für die mechanische Aufreinigung des Protein-Komplexes verwendet. Die Proteine werden mit 1x Laemmli-Puffer von den beads eluiert und entweder sofort auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen oder bei -80°C eingefroren

6.10.4 Auftrennung von Proteinen auf denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gelen und Western blotting

Mit dieser von Laemmli (1970) beschriebenen Methode werden Proteine ihrer Molmasse entsprechend aufgetrennt. Es wurden kommerzielle Gele (NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels, Invitrogen) verwendet, die aus einem sog. Sammel- und Trenngel bestehen. Die Proben werden zunächst in dem oberen, 4%igen Sammelgel ankonzentriert und werden dann im hier verwendeten 12%igen Trenngel entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Dies resultiert in einer scharfen Auftrennung der Banden. Das Gel wird in einem von Invitrogen entwickelten Kammer-System (XCell SureLock™ Mini-Cell, Invitrogen) laufengelassen (ca. 1 Std bei 180 V und einer Stromstärke von 100 mA) und anschließend im Nassverfahren (XCell II™ Blot Module, Invitrogen) (1 Std bei 30 V und einer Stromstärke von 170 mA) auf eine PVDF-Membran (Pall) geblottet. Nach dem Blotten des Proteingeles wird die Membran aus dem Kammer-System genommen und kurz in TBS geschwenkt. Anschließend wird sie für 2 Std bei RT oder üN bei 4°C in 5% Magermilch (Difco) in TBS-T inkubiert. Dieser Schritt dient zum Abblocken von unspezifischen Bindungen des Antikörpers an die Membran. Es folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1 Std bei RT) in 5% Magermilchpulver/TBS-T. Danach werden unspezifische Antikörperbindungen in 5 Waschschritten a 10 min in TBS-T gewaschen. Danach wird für 1 Std mit dem zweiten Antikörper (hier in allen Fällen anti Maus IgG Peroxidase gekoppelt) bei RT in TBS-T inkubiert. Es wird erneut 5 x 10 min in TBS-T gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgt in TBS. Zur Detektion der Banden wird eine 1:1 Mischung der beiden Substrate des ECL-Substrates (Amersham) hergestellt (5 ml + 5 ml) und die Membran wird für 1 min darin heftig geschwenkt. Ein lichtempfindlicher Autoradiographie-Film wird in der Dunkelkammer aufgelegt und nach 10 sek bis zu 5 min entwickelt.

TBS: 137 mM NaCl
 30 mM Tris-Cl pH 7.6

TBS-T: TBS mit 0.1% Tween 20

Im WB verwendete Antikörper:

Primäre Antikörper:

anti-FLAG: Monoclonal Anti-FLAG[®]M2 mouse, Sigma Kat.Nr. F1804; Endkonzentration: 0.2 µg/ml in 5% Magermilchpulver/TBS-T
anti-myc: c-myc Ab-2 (Clone 9E10.3), Dianova; Endkonzentration: 0.2 µg/ml in 5% Magermilchpulver/TBS-T
anti-GAL4-BD: Anti-GAL4-BD Antibody, Clontech; Endkonzentration: 0.5 µg/ml in 5% Magermilchpulver/TBS-T

Sekundärer Antikörper:

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG (H+L); Endkonzentration: 1.6 µg/ml

Protein-Marker: MagicMark[™] XP Western Protein Standard (Invitrogen)
SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

6.11 Tierhaltung

Alle Mäuse (Mauslinien s. Anhang) wurden in einem geschlossenen System gemäß den Bestimmungen der Tierschutzverordnung gehalten und gezüchtet. Futter und Wasser standen den Mäusen zur freien Verfügung. Die Temperatur betrug 22±2°C und die relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5%. Eine automatische Zeitschaltuhr regelte die Tag- und Nachtphasen, die jeweils 12 Stunden betragen.

Die Hellphase dauerte von 7 Uhr bis 19 Uhr. Mäuse aus der Mutantenzucht wurden drei Wochen nach der Geburt von den Eltern abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Die Markierung der Mäuse erfolgte durch Ohrlochung.

6.11.1 Bestimmung embryonaler Stadien

Als Grundlage der Beurteilung der Entwicklungsstadien dienten sowohl das Alter der Embryonen in Tagen E als auch die von Theiler eingeführten Einstufungskriterien (TS) (Theiler, 1989; Baldock, R. A. et al., 1998).

6.12 Morphologische Techniken

6.12.1 *Perfusion von adulten Mäusen*

Mäuse werden intrakardial mit einer 4%igen PFA Lösung perfundiert. Dazu werden die Tiere zunächst mit CO₂ getötet. Dann wird der Brustkorb mit einer Schere eröffnet und eine Injektionskanüle in die linke Herzkammer eingeführt. Die rechte Herzkammer wird mit einem Schnitt geöffnet, so dass das durch eine Kanüle in den Körper mittels einer Umwälzpumpe gepumpte PFA ausgehend vom linken Ventrikel durch den ganzen Körper gespült werden kann, bevor es aus dem rechten Ventrikel wieder austritt. Zunächst wird das Blut mit 1x PBS für 1-2 min aus dem Körper gespült und dann wird für 5 min mit PFA perfundiert. Das Gehirn wird herauspräpariert. Das Gewebe wird üN bei 4°C in 4% PFA nachfixiert.

| | | |
|--------------------------------|--------|----------------------------------|
| 1x PBS-Puffer (pH 7.4): | 137 mM | NaCl |
| | 2.7 mM | KCl |
| | 10 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 2 mM | KH ₂ PO ₄ |

20% PFA:

Das Paraformaldehyd (PFA) wird bei 70°C in 1x PBS gelöst und bei -20°C gelagert. Da PFA in PBS schwer löslich ist, wird 1/10 Vol 5 M NaOH (oder NaOH Plättchen) zur Erhöhung des pH-Wertes hinzugegeben. Nach der vollständigen Lösung des PFA muss der pH-Wert wieder mit HCl auf pH 7.4 eingestellt werden.

6.12.2 *Schnittechniken*

6.12.2.1 Schneiden von Gewebe mit dem Cryostaten

Das perfundierte und nachfixierte Gehirn (s. 6.12.1) wird bei 4°C üN in 20% Sucrose/PBS inkubiert. Das Gehirn wird aus der Lösung genommen und abgetrocknet. Das Plättchen auf dem das Hirn mit Einfriermedium fixiert werden soll, wird auf -40°C vorgekühlt und mit Einfriermedium vollständig bedeckt. Nun wird das Hirn vorsichtig mit einer Pinzette in der gewünschten Orientierung auf das noch nicht

gefrorene Medium gesetzt und ein weiterer Kranz Medium wird darum gesetzt. Das Gehirn wird vor dem Schneiden für etwa eine halbe Stunde auf -20°C equilibriert. Die Schnittdicke für Zellzählungen und die meisten histochemischen Färbungen beträgt $40\ \mu\text{m}$. Die Schnitte werden direkt in PBS überführt und bei 4°C bis zu einer Woche gelagert. Für eine längerfristige Lagerung werden sie in Cryoprotektions-Lösung überführt und können so bis zu 2 Monate gelagert werden.

Cryoprotektions-Lösung: 125 ml Glyzerin
 125 ml Ethylenglycol
 250 ml 0.1 M PBS

6.12.2.2 Schneiden von Embryonen und adulten Gehirnen mit dem Mikrotom

Die Embryonen des gewünschten Alters werden mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten (FST) unter Verwendung eines Binokulars aus dem Uterus präpariert. Bei älteren Embryonen wird der vordere Bereich des Neuralrohrs präpariert. Die Dottersäcke werden für die Genotypisierung aufbewahrt (s. 6.4.2). Die präparierten Embryonen werden in 4% PFA/PBS für 24-48 Std fixiert. Anschließend werden sie durch die aufsteigende EtOH-Reihe dehydriert (70%, 96%, 100%) und in Rotihistol geklärt (jeweils für 3 min (E8.5), 10 min (E9.5-10.5), 30 min (E11.5-13.5) oder 1 Std (E14.5-18.5)). Das Paraffin (Polysciences Inc., Schmelztemperatur 65°C) wird währenddessen im Ofen bei 65°C geschmolzen. Die Embryonen werden dann für 24-48 Std in Paraffin gegeben und in Ausgiessformen (Merck) eingebettet. Adulte Gehirne werden nach der Perfusion (s. 6.12.1) ü.N. in 4% PFA nachfixiert und am nächsten Tag dehydriert (jeweils 1-2 Std. in 70%, 96%, 100% EtOH und Rotihistol). Sie werden analog zu den Embryonen eingebettet.

Nach der Aushärtung werden die Embryonen oder adulte Hirne auf den Trägern, die im Mikrotom eingespannt werden, plaziert und am Mikrotom in einer Dicke von $8\ \mu\text{m}$ geschnitten. Die Schnitte werden auf Objektträger (Superfrost[®]Plus, Menzel GmbH) im Wasserbad aufgezogen und üN bei 37°C getrocknet. Sie werden anschließend bei 4°C bis zur *in-situ*-Hybridisierung (s. 6.12.4) gelagert.

6.12.2.3 Schneiden von adulten Hirnen mit dem Vibratom

Schnitte der Dicke 50-200 µm können in kurzer Zeit mit Hilfe des Vibratomes erzielt werden. Dazu wird das Gehirn mit Sekundenkleber auf dem Träger fixiert und in PBS eingetaucht. Darin bewegt sich die Klinge vor und zurück und schneidet dabei mit Vibrationsbewegungen durch das Gewebe.

6.12.3 Immunohistochemie und Färbungen

6.12.3.1 Immunhistochemische Färbung an frei schwimmenden Schnitten

Alle Waschschriffe werden sofern nicht anders beschrieben bei RT durchgeführt. Die Schnitte befinden sich in 6-well Platten. Pro well werden 5 ml Flüssigkeit verwendet. Haben sich die Schnitte in Kryoprotektion befunden, werden sie entweder üN oder 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität werden die Schnitte für 10 min in 0.3% H₂O₂/1x PBS geschwenkt und anschließend 2 x 10 min in 1x PBS/0.2% Triton gewaschen. Danach wird das Gewebe zur Vermeidung unspezifischer Bindungen in Blocking-Lösung (2% foetales Kalbs-Serum (FCS)/0.2% Triton/1x PBS) für 2 Std inkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (s.u) erfolgt bei 4°C üN. Dieser AK wird in 1x PBS/0.2% Triton nach Anleitung verdünnt. Am nächsten Tag werden die Schnitte für 4 x 15 min in 1x PBS/0.2% Triton gewaschen und nachfolgend mit dem zweiten Antikörper (s.u.) für 45 min inkubiert. Die Verdünnung des Zweitantikörpers erfolgt in 1x PBS/0.2% Triton in einer Verdünnung von 1:300. Nach weiteren Waschschriffen in 1x PBS/0.2% Triton für 4 x 15 min findet die Detektion des Zweitantikörpers mit Hilfe des Vecta[®] stain ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) statt. Die ABC-Lösung besteht aus dem sog. „Avidin : biotinyliertes Enzym“-Komplex. Dieser Komplex bindet an den zweiten, biotinylierten Antikörper. Durch spätere Zugabe eines Substrates, welches das Enzym zersetzen kann, erfolgt die Farbreaktion.

Die ABC-Lösung wird ca. eine halbe Stunde im Voraus angesetzt (Verdünnung 1:300 in 1x PBS/0.2% Triton), die Schnitte werden darin für 45 min inkubiert und anschließend 2 x 15 min in 1x PBS und 2 x 15 min in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4-7.6) gewaschen. Die Färbereaktion erfolgt in einer DAB-Lösung (1% DAB in Tris-HCl 0.05

M, pH 7.4-7.6), wobei noch 0.00025% H₂O₂ (150 µl auf 200 ml) zugegeben werden. Die Färbung erfolgt für 1-15 min bei RT. Anschließend werden die Schnitte in 1x PBS überführt und auf Superfrost-Objektträgern aufgezogen. Die gut getrockneten Schnitte werden in einer EtOH-Reihe dehydriert (70%, 96%, 100% je 2 x 5 min) und aus Rotihistol heraus (2 x 10 min) mit Roti[®] Histokit (Roth) eingedeckelt.

DAB-Stocklösung: 1 g/100 ml Tris-HCl (0.05 M) pH 7.6, 1 ml Aliquots bei -20°C lagern

Antikörper:

Primär-Antikörper:

Parvalbumin (Swant), aus Kaninchen, eingesetzt in einer Verdünnung von 1:10000

Sekundär-Antikörper:

Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Dianova), eingesetzt in einer Verdünnung von 1:300

6.12.3.2 Immunhistochemische Färbung auf Paraffin Schnitten

Zunächst wird das Gewebe von Paraffin befreit, indem es 2 x 20 min in Rotihistol inkubiert wird. Anschließend wird das Gewebe rehydriert (2 x 5 min 100% EtOH, 2 x 5 min 96% EtOH, 2 x 5 min 70% EtOH). Danach werden die Objektträger für 10 min in Aq. dest. und 3 min in 0.01 M Natriumcitrat gewaschen. Es folgt eine Hitzebehandlung der Schnitte um die Proteine zu denaturieren und damit die Antigene für den Antikörper besser zugänglich zu machen. Die Schnitte werden dazu für 5 min in der Mikrowelle gekocht und anschließend wird die Küvette für 20 min bei RT zum abkühlen stehen gelassen. Es wird 2 x 5 min in 1x PBS gewaschen und zur Zerstörung endogener Peroxidasen wird für 5 min in 0.1% H₂O₂ in 1x PBS inkubiert. Es wird erneut 2 x 5 min in 1x PBS gewaschen. Anschließend wird 1 Std in Blocking Lösung (10% FCS, 0.05% Triton-X in PBS) geblockt und die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt in 10% FCS/1x PBS bei 4°C.

Am nächsten Tag wird 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen und für 1 Std mit dem zweiten Antikörper in 10% FCS/1x PBS (1:300 verdünnt) bei RT inkubiert. Es wird erneut 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen. Es folgt die Inkubation mit ABC-Lösung (1:300 in 10% FCS in PBS) für 30 min. Anschließend wird 2 x 5 min in 1x PBS gewaschen, gefolgt von 5 min in 0.1 M Tris-HCl. Die eigentliche Reaktion erfolgt mit dem DAB Substrat

(s. 6.12.3.1) bis eine spezifische Färbung der gewünschten Bereiche eingetreten ist (5-20 min). Danach wird 2 x 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Schnitte werden dehydriert (2 x 5 min jeweils in 70%, 96% und 100% EtOH), in Rotihistol behandelt und mit Roti Histokit eingedeckelt.

Primär-Antikörper:

Dopamin-Transporter (DAT) (Chemicon), aus Ratte, eingesetzt in einer Verdünnung von 1:1000

Sekundär-Antikörper:

Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) (Dianova), eingesetzt in einer Verdünnung von 1:300

6.12.3.3 β -Gal-Färbung

Es wurden verschiedene Embryonalstadien als auch Vibratom-Schnitte adulter Hirne angefärbt.

Die Embryonen werden in 1x PBS seziiert. Danach werden sie für 10-20 min in der Fixierlösung fixiert. Zum Waschen werden die anzufärbenden Gewebe 2 x 15 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend in X-Gal Färbelösung angefärbt. Zum Abschluß der Färbereaktion wird 3 x für 5-10 min in Waschpuffer gewaschen. Eine Verstärkung der Färbung wird bei 4°C in Waschpuffer üN erreicht. Die Embryonen werden üN in 4 % PFA/1x PBS nachfixiert und können auch darin gelagert werden.

| | |
|---------------------------|---|
| Fixierlösung: | 4% PFA/1x M PBS, pH 7.4 5 mM EGTA (0.1 M Stock Lösung.) 10 mM MgCl ₂ (1 M Stock Lösung.) verdünnt in 1x PBS pH 7.4 |
| Wasch-Puffer: | 2 mM MgCl ₂ 0.01% Deoxycholat (5% Stock Lösung.) 0.02% NP40 (10% Stock Lösung.) verdünnt in 1x PBS pH7.4 |
| X-Gal Färbelösung: | 5 mM Kaliumferrocyanid (0.5 M Stock Lösung.) 5 mM Kaliumferricyanid (0.5 M Stock Lösung.) X-Gal (1 mg/ml) verdünnt in Wasch Puffer |

Für 20 ml Färbelösung werden 20 mg X-Gal in 2 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und tropfenweise zu der Kaliumferro/ferricyanid-Lösung gegeben.

Klärung β -Gal gefärbter Schnitte adulter Hirnschnitte

Zur Klärung der β -Gal gefärbten adulten Hirnschnitte wurde ein 1:2 Gemisch aus Benzyl Alkohol und Benzylbenzoate verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden 20 min lang darin inkubiert bis sie fast durchsichtig waren. Diese Methode wurde verwendet, um die β -Gal gefärbten Bereiche zu dokumentieren.

6.12.3.4 Kresylviolett -Färbung

Kresylviolett (KV) färbt die Nissl Substanz in den Zellen an. Diese besteht überwiegend aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum. Verwendet wird eine 0.5%ige KV-Lösung, die zuvor gefiltert wird. Paraffinschnitte werden zunächst deparaffiniert und rehydriert (s. 6.12.3.2). Kryo-Schnitte werden zunächst in 50% EtOH und 70% EtOH für 1 min gewaschen und dann für 1 min in Aq.dest. gegeben. Die anschließende Färbung erfolgt für 3-10 min in der 0.5% KV-Lösung. Zum Entfärben werden die Schnitte kurz in Aq.dest und 2 x 2 min in 70% EtOH geschwenkt. Weiterhin wird in 96% EtOH mit 1 ml Eisessig pro 200 ml entfärbt (Differenzierung der Färbung). Die Dehydrierung erfolgt durch zweimalige 1-minütige Inkubation in 96% EtOH und 2 x 2 min 100% EtOH mit nachfolgender Inkubation in Rotihistol (2 x 5 min). Eingedeckelt wird in Roti Histokit.

Kresylviolett Lösung: 2.5 g Kresylviolett
102 mg Na-acetat
1.55 ml Essigsäure
ad 500 ml Aqua dest.
auf pH 3.5 mit Essigsäure einstellen

6.12.3.5 Cytochrom-Oxidase Färbung

Es werden 40-50 μ m dicke Kryo-Schnitte verwendet. Sie werden in 6-Loch-Platten in kleinen Netzen in je 5 ml Flüssigkeit unter Schütteln inkubiert. Die Schnitte werden zunächst 2 x 10 min in 5 % Sucrose in 0.1 M Phosphat Puffer pH 7.4 vorinkubiert. Danach werden die Schnitte bis zum Erscheinen einer bräunlichen Farbe in

Färbelösung inkubiert (bei 37°C unter Schütteln). Anschließend werden die Schnitte 2 x 5 min in 1x PBS gewaschen und auf Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen werden sie wie unter 6.12.3.1 beschrieben dehydriert und eingedeckelt.

Färbelösung Cytochrom Oxidase: 25 mg Cytochrom C
 50 mg DAB
 10 mg Katalase
 5% Sucrose
 add 50 ml Phosphat Puffer

0.1 M Phosphat Puffer pH 7.4: 22.6 ml 1 M NaH₂PO₄ werden zu 77.4 ml 1 M Na₂HPO₄ gegeben. Bei 25°C sollte sich ein pH Wert von 7.4 ergeben. Dieser Puffer wird auf 1 l mit Aq.dest. aufgefüllt.

6.12.3.6 Acetylcholinesterase Färbung an frei schwimmenden Schnitten

Die Färbung wird in 6-Loch-Platten in Netzchen durchgeführt. Die Schnitte werden 3 x 10 min in 0.9% NaCl gewaschen. Anschließend werden sie so lange in Inkubationslösung inkubiert bis ein weißes Reaktionsprodukt entsteht. Die Schnitte werden 3 x 10 min mit 0.9% NaCl gewaschen und anschließend in einer 10%igen K₃[Fe(CN)₆]-Lösung (Kaliumferricyanid; frisch angesetzt) angefärbt. Dabei werden die Platten heftig mit der Hand geschüttelt. Die vorher weißen Bereiche werden nun braun. Um die Reaktion zu stoppen wird mehrmals mit 0.9% NaCl gewaschen. Die Schnitte werden aufgezogen, die Objektträger üN getrocknet und dann dehydriert, in Rotihistol inkubiert und eingedeckelt (s. 6.12.3.1).

Inkubationslösung: 4.2 mM Acetylthiocholiniodid (0.12 g)
 10 mM Glycin (0.075 g)
 10 mM CuSO₄ x 5 H₂O (Kupfersulfat) (0.025 g)
 50 mM NaAc (0.41 g)
 ad 100 ml aqua dest.; pH auf 5.0-5.1 mit 0.1 M
 Essigsäure

6.12.4 *In-situ* Hybridisierung (ISH) mit radioaktiv markierten Sonden auf Paraffin-Schnitten

Für die *in-situ* Hybridisierung wurden Paraffinschnitte von embryonalem und adultem Gewebe (s. 6.12.2.2, Schnittdicke 8 µm) verwendet. Alle Arbeiten erfolgen mit aqua dest. und Puffern, die mit DEPC behandelt wurden.

6.12.4.1 Herstellung der Riboprobe

Für die *in-situ* Hybridisierung auf Schnitten werden ISH-Sonden (s. Anhang) mit einer Länge zwischen 500 bp und 1 kb verwendet. Zunächst wird ein Restriktionsverdau des Vektors, der die entsprechende DNA-Sonde enthält, angesetzt (s. 6.3.2). Die linearisierte DNA wird mit dem PCR Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt und die Konzentration wird gemessen. Folgende Bestandteile werden zur Synthese der RNA-Probe im Transkriptionsansatz eingesetzt:

- 3 µl 10x Transkriptionspuffer
- 3 µl rATP/rCTP/rGTP-Mix (10 mM, Stocklösung bei -20°C)
- 1 µl DTT (0.5 M, Stocklösung 1 M bei -20°C)
- 1 µl RNasin (40 U/µl, Roche Diagnostics)
- 2 µg linearisierter Vektor (siehe 3.5.1.1)
- 3 µl ³⁵S-rUTP (Amersham)
- ad. 29 µl aqua dest.
- 1 µl RNA-Polymerase (SP6, T7 oder T3; 20 U/µl; Roche Diagnostics)

Der Ansatz wird für drei Stunden bei 37°C inkubiert, wobei nach einer Stunde noch einmal 0.5 µl der RNA-Polymerase zugegeben wird.

Um die DNA-Matrize zu zerstören, werden 2 µl RNase-freie DNase I (10 U/µl, Roche Diagnostics) zu dem Ansatz gegeben und dieser erneut für 15 min bei 37°C inkubiert. Die fertige RNA Probe wird mit dem RNeasy Kit von Qiagen laut Herstellerangaben aufgereinigt.

1 µl der Probe wird in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint[®], Roth) gegeben. Diese Probe wird im Szintillationsmeßgerät gemessen. Man zählt bei den meisten Proben zwischen 0.7 und 2.5 Mio. counts/µl. 7 Mio. counts der Riboprobe werden pro Objektträger in 100 µl Hybridisierungsmix für die Hybridisierung verwendet. Die Proben können bei -20°C gelagert werden und sind so bis zu zwei Wochen verwendbar.

6.12.4.2 Vorbehandlung der Schnitte

Alle Inkubationsschritte erfolgen, sofern nicht anders vermerkt, bei RT. Die Paraffinschnitte werden zunächst 2 x 30 min in Rotihistol inkubiert (Auflösen des Paraffins), anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (2 x 100% EtOH 5 min, 1 x 70% EtOH 5 min, 1 x Aq.dest 3 min) und in 1x PBS für 3 min gewaschen. Zur Fixierung werden sie dann für 20 min in eiskalten 4% PFA/1x PBS gegeben und erneut zweimal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung des Gewebes werden die Schnitte mit 20 µg/µl Proteinase K (Stocklösung 20 mg/ml, bei -20°C) in 0.1 M ProteinaseK-Puffer für 7 min behandelt und danach für 5 min in 1x PBS gewaschen. Anschließend werden sie für 20 min in eiskaltem 4% PFA/1x PBS refixiert. Nach der Fixierung wird in 1x PBS für 5 min gewaschen. Anschließend werden die Objektträger in 0.1 M Triethanolamin-HCl (pH 8.0) für 10 min inkubiert. Dabei werden tropfenweise 0.6 ml Essigsäureanhydrid dazugegeben. Um eine gute Durchmischung zu garantieren, wird ein Magnetrührer zum Durchmischen verwendet. Nachfolgend werden die Objektträger zweimal in 2x SSC für 5 min gewaschen. Das Gewebe wird nun durch eine EtOH-Reihe (60%, 70%, 95%, 100% für jeweils eine Minute) dehydriert. Zum Schluß werden die Schnitte an der Luft getrocknet und anschließend für die Hybridisierung verwendet (siehe 6.12.4.3).

Proteinase K-Puffer 1 M: 0.5 M Tris-HCl pH 7.5
 0.05 M EDTA pH 8
auf pH 7.8 einstellen, autoklavieren

2x SSC: 300 mM NaCl
 30 mM Natriumcitrat

Stocklösung: 20x SSC: 175.3g NaCl 88.2g Na₃citrat Dihydrat add. 600 ml
Aq.dest., pH 7.4 mit NaOH oder Eisessig einstellen, auf 1000 ml auffüllen,
autoklavieren

6.12.4.3 Hybridisierung der Schnitte

Zunächst wird der Hybridisierungssofen auf 57°C vorgeheizt. Paraffinschnitte werden für 1 Std im Hybridisierungsmix prähybridisiert. Hierzu werden die vorbehandelten und getrockneten Schnitte (s. 6.12.4.2) mit 100 µl pro Objektträger Hybridisierungsmix überschichtet, mit einem Deckgläschen bedeckt und in einer

feuchten Atmosphäre (Box, deren Boden mit Hybridisierungs-Kammerflüssigkeit bedeckt ist) bei 57°C für 1 Std im Hybridisierungssofen inkubiert.

Für die eigentliche Hybridisierung wird der Hybridisierungsmix inklusive der Riboprobe (7 Mio.) für 2 min bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Der Hybridisierungsmix wird mitsamt des Objektträgers entfernt, und der Hybridisierungsmix mit der Riboprobe wird wie oben aufgetragen. Die Schnitte werden ün bei 57°C hybridisiert.

| | | | |
|---------------------------------------|-----------|---------------------|-------------------|
| Hybridisierungsmix: (30 ml) | 50% | Formamid | 15 ml (100%) |
| | 20 mM | Tris-HCl pH 8 | 0.6 ml (1 M) |
| | 0.3 M | NaCl | 1.8 ml (5 M) |
| | 5 mM | EDTA, pH 8 | 300 µl (0.5 M) |
| | 10% | Dextransulfat | 6 ml (50%) |
| | 0.02% | Ficoll 400 | 3 ml |
| | 0.02% | Polyvinylpyrrolidon | 6 mg |
| | 0.02% | BSA | 6 mg |
| | 0.5 mg/ml | Hefe-tRNA | 1.5 ml (10 mg/ml) |
| | 0.2 mg/ml | carrier DNA | 600 µl (10 mg/ml) |
| | 200 mM | DTT | 1.2 ml (5 M) |

Hybridisierungs-Kammerflüssigkeit 150 ml: 75 ml Formamid
 15 ml 20x SSC pH 7.4
 60 ml Aqua dest.

Hefe-tRNA 10 mg/ml:

Die pulverförmige tRNA (Roche Diagnostics) wird zunächst in 50 ml Falcon Tubes in Aq.dest. gelöst (2.5 mg/ml). Anschließend wird zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert (je 5 min bei 2800 g abzentrifugiert), das Flüssigkeitsvolumen bestimmt und die tRNA mit 1/10 Volumen 3 M Na-acetat und 2.5-fachem Volumen 100% EtOH ausgefällt. Anschließend wird 30 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 4°C und 2800 g abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen und dann getrocknet. Die tRNA wird in Aq.dest. in einer Konzentration von ca. 15 mg/ml gelöst. Nach der Bestimmung der OD₂₆₀ wird die tRNA auf die endgültige Konzentration von 10 mg/ml verdünnt. Die Lagerung erfolgt in 1ml Aliquots bei -80°C.

Carrier-DNA (10 mg/ml):

0.5 g Lachs-Sperm DNA (Sigma) werden in 7.5 ml Aq.dest. in einem 50 ml Falcon Tube gelöst (15 min bis zu 2 Std auf Schüttler im Warmraum). Die DNA-Lösung sollte gelatineartig erscheinen ohne weiße Präzipitate. Anschließend werden 1.25 ml 2 M HCl hinzugegeben, die ausgefallene DNA 1 min mit einer Pipette geknetet und für 15 min bei RT inkubiert. Danach werden 1.75 ml 2 M NaOH hinzugefügt und die DNA für 15 min bei 37°C auf dem Schüttler gelöst. Zur gelösten DNA werden 5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.4, hinzugegeben und das Volumen mit Aq.dest. auf 20 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit 2 M HCl auf 7-7.4 eingestellt und das Volumen mit Aqua dest. auf 30 ml gebracht. Die DNA wird auf 4 Gefäße verteilt, jeweils mit 1/10 Vol Naacetat pH 5.5 und dem 2.5fachen Vol. 100% EtOH auf Eis (15 min) ausgefällt und danach bei 11500 g für 15 min abzentrifugiert. Die Pellets werden mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend werden sie an der Luft getrocknet und jeweils in 5 ml Aq.dest resuspendiert. Die Lösungen werden vereinigt und die OD₂₆₀ bestimmt. Die DNA wird entsprechend auf die Endkonzentration von 10 mg/ml verdünnt, in 1.3 ml Aliquots verteilt, für 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und danach bei -20°C eingefroren.

Zur Qualitätskontrolle werden 0.5 bzw 3 µg DNA auf einem 1.5%igen Agarosegel (siehe 3.1.2) aufgetragen. Die Fragmentlängen sollten zwischen 50 und 300 bp liegen.

6.12.4.4 Waschen der Objektträger

Alle Waschschritte finden, sofern nicht anders beschrieben, bei RT statt.

Die Deckgläser werden von den Objektträgern genommen und diese 4 x in 4x SSC für je 5 min gewaschen. Die Schnitte werden danach in NTE-Puffer (37°C) überführt und dort nach der Zugabe von RNaseA (20 µg/ml) für 30 min inkubiert. Die folgenden Waschschritte finden in SSC statt:

2 x in 2x SSC / 1 mM DTT für 5 min
1 x in 1x SSC / 1 mM DTT für 10 min
1 x in 0.5x SSC / 1 mM DTT für 10 min
2 x in 0.1x SSC / 1 mM DTT für 30 min bei 64°C
2 x in 0.1x SSC für 10 min

Nach dem Waschen werden die Schnitte dehydriert (je 1x für 1 min):

30% EtOH in 300 mM NH₄OAc
50% EtOH in 300 mM NH₄OAc
70% EtOH in 300 mM NH₄OAc
95% EtOH
100% EtOH
100% EtOH
Zuletzt werden die Schnitte an der Luft getrocknet.

NTE-Puffer: 0.5 M NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 5 mM EDTA pH 8

RNaseA: Stocklösung 10 mg/ml in Aq.dest., bei -20°C lagern

6.12.4.5 Dippen der Objektträger in Fotoemulsion

Um einen ersten Eindruck von der Qualität der Hybridisierung zu bekommen wird ein Film (BioMax MR, Kodak) auf die Objektträger für zwei Tage aufgelegt. Um die Expressionsdomänen jedoch im Detail erkennen zu können, werden die Objektträger mit Fotoemulsion beschichtet. Die β -Strahlung des ³⁵S-UTP reduziert das in der Emulsion enthaltene Silber-Nitrat und dieses wird dann durch die Entwicklung (s. 6.12.4.6) sichtbar gemacht.

Es wird die KODAK NTB2 Fotoemulsion verwendet. Diese Lösung darf nicht mit Metall in Kontakt kommen. Die Lösung wird zunächst bei 37°C für ca. 45 min erwärmt. Gleichzeitig wird Aq.dest. auf die gleiche Temperatur gebracht. Mit diesem wird anschließend die Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Die Objektträger werden in die entsprechenden Plastikhalter gesteckt, für ca. 5 Sek langsam in die Lösung getaucht, auf Papier gestellt und üN getrocknet. Am nächsten Tag werden die Objektträger in Boxen umgelagert und für 4-6 Wochen bei 4°C exponiert. Vom Dippen bis hin zur Entwicklung dürfen die Objektträger nicht in Kontakt mit Licht kommen. Deshalb sollte nur mit Natriumlampen gearbeitet werden.

6.12.4.6 Entwicklung der Objektträger

Die Objektträger werden von 4°C auf RT aufgetaut (ca. 2 Std) und im Dunkeln geöffnet. Die Entwicklung erfolgt im KODAK D19 Entwickler für 6 min, danach wird für 30 Sek in Wasser gespült und anschließend in KODAK Fixer für 10 min fixiert. Am

Ende werden die Objektträger für 20 min unter fließendem Wasser gespült. Die Silberemulsion wird nun von der Rückseite der Objektträger gekratzt und die Objektträger an der Luft getrocknet. Anschließend werden die Schnitte mit Kresylviolett (s. 6.12.3.4) gegengefärbt.

6.13 Dokumentation histologischer Ergebnisse

Hell- sowie Dunkelfeldmikroskopie an histologischen Schnitten auf Objektträgern und an Ganzkörperpräparaten wurden entweder mit dem Forschungsmikroskop: Zeiss, Axioplan 2 (Objektive 5x – 100x) und/oder mit dem Binokular-Mikroskop: Zeiss, Stemi SV 6 (Planobjektiv S 1,0 x) durchgeführt. Unter der Verwendung der Digital-kameras AxioCam MRC / HRC, unterstützt durch das Computerprogramm Axiovision 3.1; 4.0, wurden die Aufnahmen dokumentiert und anschließend in AdobePhotoshop (Version 7.0) phototechnisch überarbeitet. Die Identifizierung und Benennung anatomischer Strukturen an den Präparaten erfolgte nach den Angaben in den histologischen Atlanten von (Kaufmann, 1992; Drews, 1993; Schambra et al., 1992; Altmann und Bayer, 1995; Alvarez-Bolado und Swanson, 1996; Franklin und Paxinos, 1997; Jacobowitz und Abbott , 1998).

7 Anhang

7.1 Vektoren

7.1.1 Hefe Zwei-Hybrid System : Ködervektoren

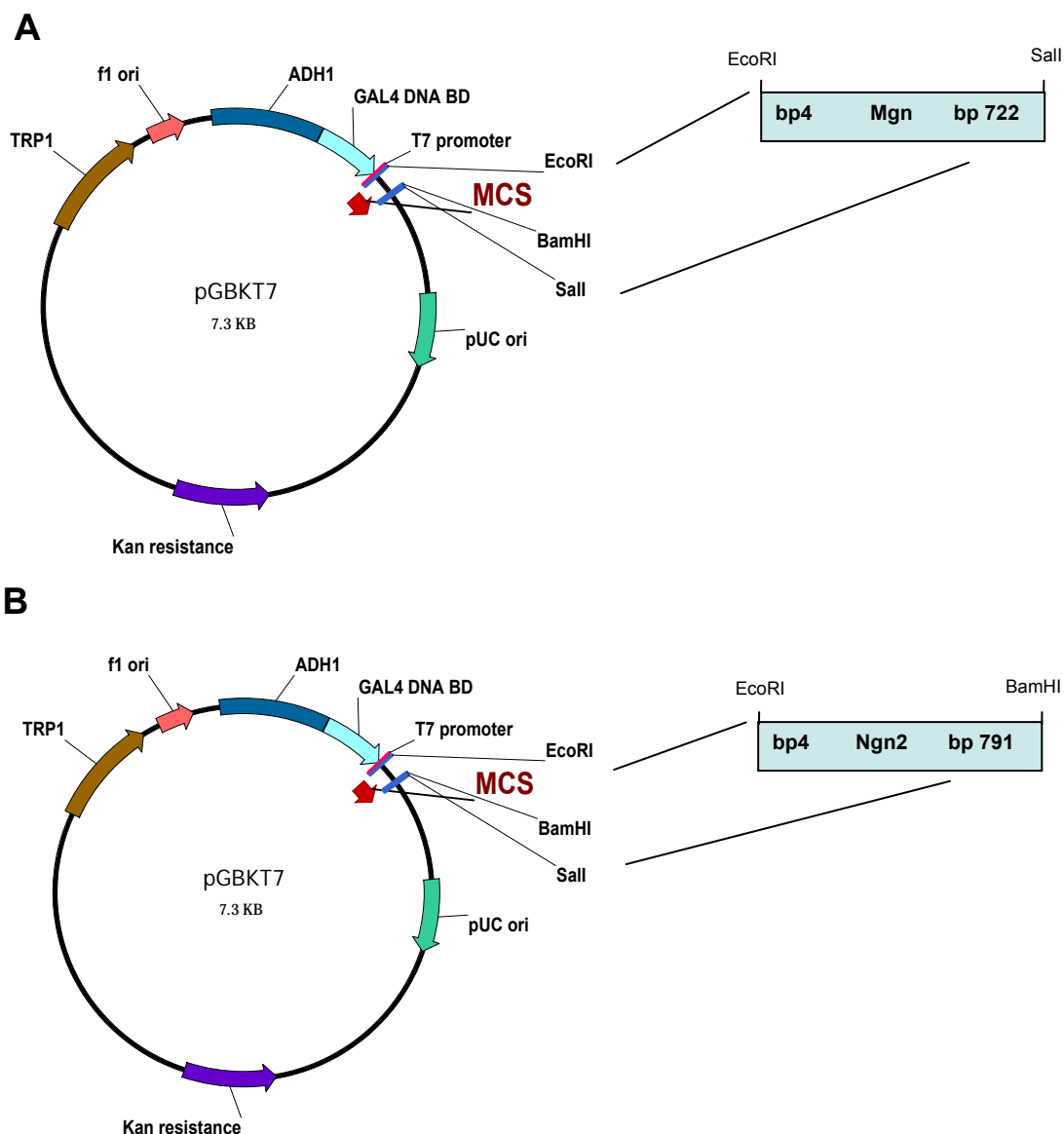


Abb. 58: Strategien der Klonierung der als Köder dienenden cDNAs *Mgn* und *Ngn2* in den Vektor pGBKT7. (A) Mittels PCR (Primersequenzen s. 7.4) wurde die *Mgn* cDNA (719 bp, ohne ATG, mit TGA) amplifiziert, an deren 5' Ende eine *EcoRI* Schnittstelle und am 3'

Ende eine *SalI* Schnittstelle eingebaut wurden. Fragment und Vektor wurden beide mit diesen Enzymen verdaut und durch eine Ligation miteinander verbunden.

(B) Die *Ngn2* cDNA ohne ATG, mit TGA (788 bp) wurde aus dem pGADT7 Vektor mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* extrahiert und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pGBKT7 mittels Ligation eingesetzt.

7.1.2 Hefe Zwei-Hybrid System : Beutevektoren

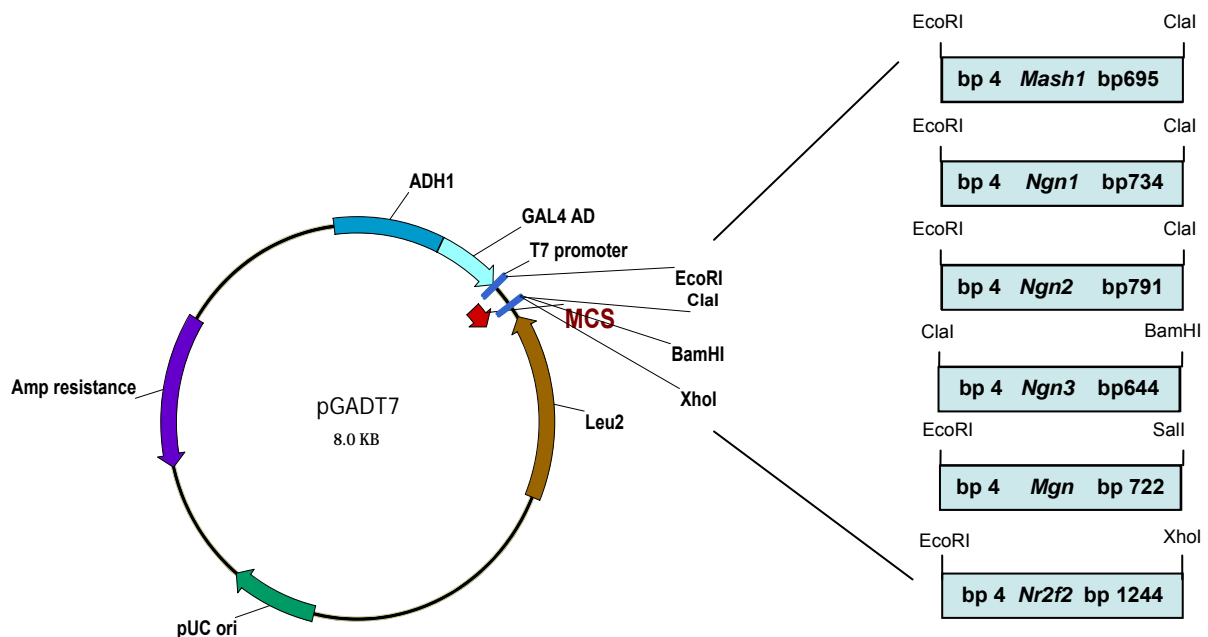


Abb. 59: Strategie der Klonierung der als Beute dienenden cDNAs in den Vektor pGADT7. Mittels PCR wurden die cDNA-Fragmente *Mash1*, *Ngn1*, *Ngn2* und *Ngn3* direkt von genomischer DNA aus wildtypischem Mausschwanz amplifiziert. Die *Nr2f2* cDNA wurde von der von M.-J. Tsai zur Verfügung gestellten *Nr2f2* cDNA amplifiziert. Über geeignete Primer wurden folgende Schnittstellen integriert: *Mash1*, *Ngn1* und *Ngn2*: 5' *EcoRI* und 3' *ClaI*. *Ngn3*: 5' *ClaI* und 3' *BamHI*, *Nr2f2*: 5' *EcoRI* und 3' *XhoI*. *Mgn* wurde mit *EcoRI* und *SalI* aus dem Köder-Vektor pGBKT7 extrahiert und in das mit *EcoRI* und *XhoI* linearisierten pGADT7-Vektor eingebracht.

7.1.3 Zellkultur: Säugetier-Expressionsvektoren

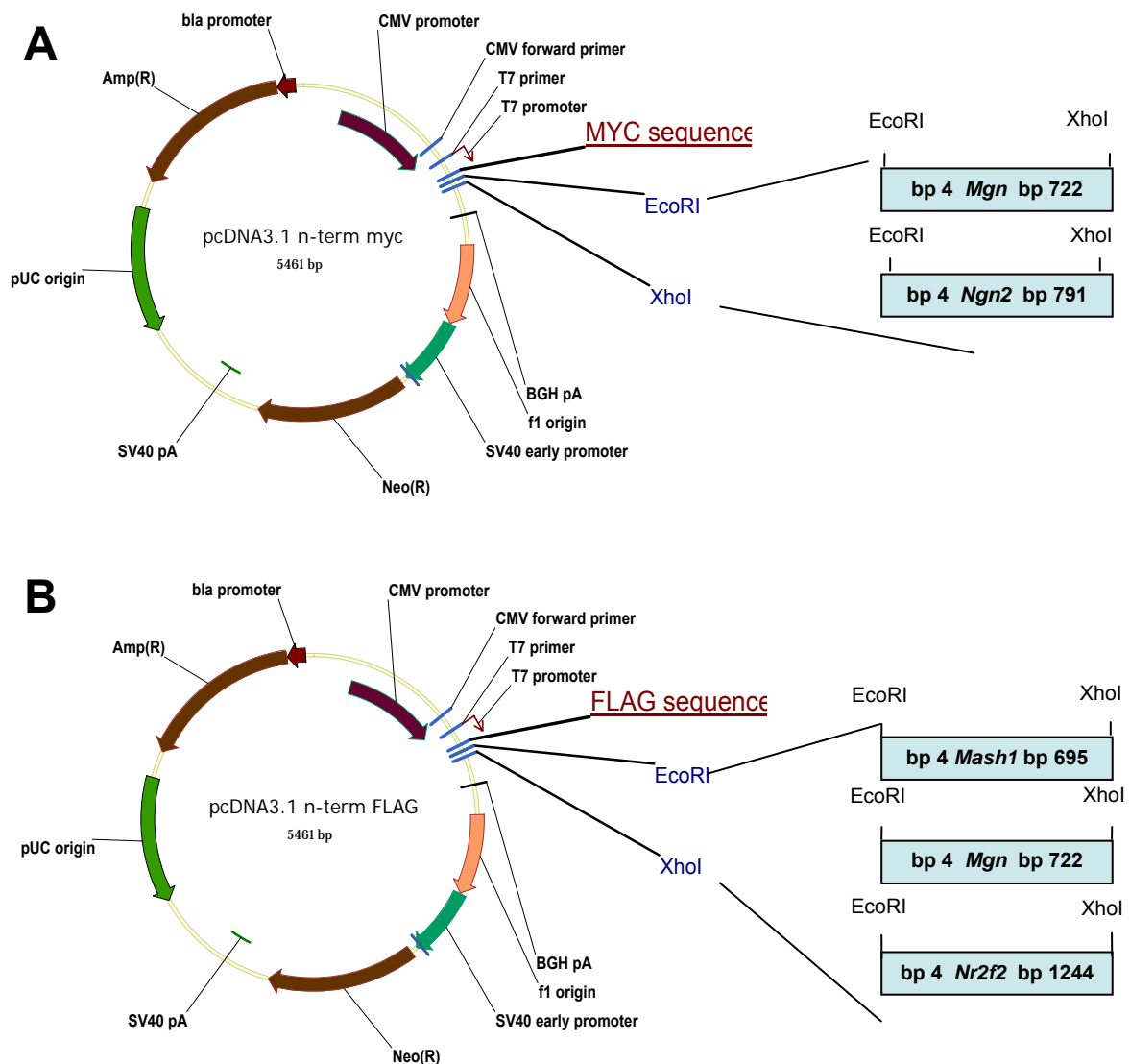


Abb. 60: Klonierungsstrategie in den Vektor pcDNA3.1 [n-term MYC] bzw. [n-term FLAG] zur Überprüfung der im Hefe Zwei-Hybrid System erhaltenen Ergebnisse in Säugetier-Zellkultur. Mit Hilfe einer PCR wurden *EcoRI* (5') und *XhoI* (3') Schnittstellen an die cDNAs für *Mgn*, *Mash1*, *Ngn2* und *Nr2f2* angehängt. **(A)** *Mgn*, *Ngn2* und *Nr2f2* sollten in den pcDNA3.1 [n-term myc] Vektor, **(B)** *Mgn* und *Mash1* in den pcDNA 3.1 [n-term flag] kloniert werden. Dazu wurden sowohl die PCR Fragmente als auch die Vektoren mit *EcoRI* und *XhoI* linearisiert. Es folgte eine Ligation jeweils von Fragment und Vektor.

7.2 Mauslinien

C57Bl/6: Inzuchtstamm mit Fellfarbe schwarz. Bezogen über GSF-interne Zucht

CD1: Ausgekreuzte Mauslinie mit Fellfarbe Albino. Bezogen über GSF-interne Zucht

En1^{Cre/+}: Mauslinie, die das *Cre*-Rekombinase-Gen des Bakteriophagen P1 unter Kontrolle des *En1* Promotors exprimiert (Kimmel et al., 2000). Die Mauslinie wurde auf C57/Bl6 Hintergrund rückgekreuzt.

Fgfr1^{lox/lox}: Mauslinie, die ein homozygot gefloxtes *Fgfr1* Allel trägt. Die Linie wurde freundlicherweise von J. Partanen, Finnland zur Verfügung gestellt (Trokovic et al., 2003).

Fgfr2^{lox/lox}: Mauslinie, die ein homozygot gefloxtes *Fgfr2* Allel (Exon 5 (NCBI acc.number Y16155) trägt. Die Linie wurde freundlicherweise von M. Sendtner, Würzburg zur Verfügung gestellt

7.3 Bakterien- und Hefestämme

7.3.1 Bakterien

DH5 α :

supE44 Δ lacU169 (\emptyset 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

7.3.2 Hefen

Y187:

MATa, ura3- 52, his3- 200, ade 2- 101,
trp 1- 901, leu 2- 3, 112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ ,
URA3 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1

AH109:

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200,
gal4 Δ , gal80 Δ
LYS2 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,
URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

7.4 Liste der Oligonukleotide

Die Sequenz der Primer ist in 5'-3'Richtung angegeben. Die Nukleotid-Abfolge der Erkennungssequenzen für RE ist in pink hervorgehoben.

| Bezeichnung | Sequenz | °C | Produktgröße |
|-------------------------|------------------------------------|----|--------------|
| Mgn in bGBKT7 5' | GCAGAATTCCTTGACAGGCTCAA | 54 | ~ 730 bp |
| Mgn in bGBKT7 5' | GCCAGTCGACTCAGAGCACC | 54 | |
| Ngn1 in pGADT7 5' | GCAGAATTCCTGCCCCTTTG | 56 | ~ 730 bp |
| Ngn1 in pGADT7 3' | GCATCGATCTAGTGGTATGGGATGA | 56 | |
| Ngn2 in pGADT7 5' | GCAGAATTCCTCGTCAAATCTGAGACTC | 56 | ~ 790 bp |
| Ngn2 in pGADT7 3' | GCATCGATCTAGATACAGTCCCTGGC | 56 | |
| Ngn3 in pGADT7 5' | GCATCGATCTGCGCCTCATC | 56 | ~ 650 bp |
| Ngn3 in pGADT7 3' | GCAGGATCCTCACAAGAAGTCTGAGAA CAC | 56 | |
| Mash1 in pGADT7 5' | GCAGAATTCGAGAGCTCTGGCAAGATG | 57 | ~ 700 bp |
| Mash1 in pGADT7 3' | GCATCGATTCAGAACCAGTTGGTAAAG TC | 57 | |
| Nr2f2 in pcDNA3.1 5' | GAATTCGGCAATGGTAGTCA | 60 | ~ 1250 bp |
| Nr2f2 in pcDNA3.1 3' | CGTCTCGAGTTATTGAATTGCCAT | 60 | |
| Mgn in pcDNA3.1 5' | GCAGAATTCATCTGACAG | 54 | ~ 730 bp |
| Mgn in pcDNA3.1 3' | GTACTCGAGTCAGAGCACC | 54 | |
| Mash1 in pcDNA3.1 5' | CGAATTCACGAGAGCTCTGGCAAG | 56 | ~ 700 bp |
| Mash1 in pcDNA3.1 3' | GTACTCGAGTCAGAACCAGTTGGTAAA G | 56 | |
| Ngn2 in pcDNA3.1 5' | GCAGAATTCCTCGTCAAATCTGAGAC | 56 | ~ 790 bp |
| Ngn2 in pcDNA3.1 3' | GTACTCGAGCTAGATACAGTCCCTGGC | 56 | |

| | | | |
|-----------------------------|----------------------------|----|---------------------|
| Genotypis. 5'-R2 | CTAGGCCAGCTGGACCAGAC | 58 | ~ 600 - 1100 bp |
| Genotypis. 3'-R2 | CGTTCTCTGATGGGCCATTG | 58 | |
| En1-Cre 5' | AGAGAGCGAGATTTGCTCCACCAG | 60 | ~ 300 bp |
| En1-Cre 3' | CAGGTATGCTCAGAAAACGCCTGG | 60 | |
| Genotypis. 5'-Fgfr1 | AATAGGTCCCTCGA CGGTATC | 54 | ~ 200 - 250 bp |
| Genotypis. 3'-Fgfr1 | CTGGGGTCAGTGTGGACAGTGT | 54 | |
| Genotypis. Rosa26 (lacZ) 5' | CGCCATTTGACCACTACC | 59 | ~ 500 bp |
| Genotypis. Rosa26 (lacZ) 3' | GGTGGCGCTGGCTGGTAA | 59 | |
| SB Probe 5' | CGGATACCTGGGACTGGCTGAG | 56 | ~ 600 bp |
| SB Probe 3' | GTCCTCCTGGGTA CTCTTAATTAGC | 56 | |
| 5' AD | TACCACTACAATGGAT | 60 | Je nach cDNA Insert |
| 3' AD | AGATGGTGCACGATGCACAG | 60 | |
| 5' AD Sequenzierungs-Primer | AGTCTGATGCCGTGACTGGATC | 50 | |

7.5 In-Situ Sonden

Antisense-Sonden wurden von linearisierten Vektoren, die die Sequenzen für die jeweiligen Gene beinhalten, transkribiert. Die Polymerasen als auch die Restriktionsenzyme sind jeweils angegeben.

| Sonde (Gen) | NCBI Accessionnr. | Enzyme/Polymerase für antisense Sonde | Kloniert/erhalten von |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Pou4f1 | NM_011143 | <i>NotI</i> , Sp6 | C. Brodski |
| Cre Rekombinase | X03453 | <i>HindIII</i> , T7 | A. Simeone |
| Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) | NM_138942/ S50200 | <i>XhoI</i> , SP6 | S. Laaß |
| Dopamine Transporter (DAT) | BC054119/ AF109072 | <i>HindIII</i> , T7 | C. Brodski |
| En1 | NM_010133 | <i>HindIII</i> , T7 | A. Joyner |

| | | | |
|------------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| Erm | BC060924 | <i>SaI</i> I, T7 | J. Partanen |
| Fgf8 | NM_010205 | <i>Pst</i> I, T7 | A. Tanaka |
| Fgfr1 (alle Isoformen) | NM_010206 | <i>Nde</i> I, T7 | R. Lauster |
| Fgfr2 (alle isoformen) | BC091652 | <i>Bam</i> HI, T7 | C. Dickson |
| Fgfr3 (alle isoformen) | NM_008010 | <i>Hind</i> III, T7 | D. Ornitz |
| Fgfr4 | NM_008011 | <i>Not</i> I, T3 | A. Blak |
| Fgfr2 Exon5 | MMY16155 | <i>Eco</i> RV, Sp6 | A. Blak |
| Fgf17 | NM_008004 | <i>Nco</i> I, Sp6 | D. Ornitz |
| Fgf18 | NM_008005 | <i>Eco</i> RI, Sp6 | D. Ornitz |
| Fgf15 | NM_008003 | <i>Bam</i> HI, T3 | C. Murre |
| Gbx2 | NM_010262 | <i>Hind</i> III, T7 | J. Guimera |
| GAD65 | MUSGAD65A | <i>Bam</i> HI, T3 | J. Guimera |
| Irx3 | NM_008393/ Y15001 | <i>Xba</i> I, T3 | P. Gruss |
| Islet1 | NM_021459/ AJ132765 | <i>Hind</i> III, T7 | C. Brodski |
| Lmx1b | NM_010725 | <i>Xho</i> I, Sp6 | C. Brodski |
| Mgn | AB098077 | <i>SaI</i> I, T3 | J. Guimera |
| Mash1 | NM_008553/ BC055748 | <i>Xba</i> I, Sp6 | F. Guillemot |
| MKP3 | BC003869 | <i>SaI</i> I, T7 | J.A. Belo |
| Ngn1 | NM_010896/ AF225969 | <i>Nhe</i> I, T7 | F. Guillemot |
| Ngn2 | NM_009718/ BC055743 | <i>Nhe</i> I; Sp6 | F. Guillemot |
| Ngn3 | NM_009719/ AF364300 | <i>Pme</i> I, T7 | A. Blak |
| Nkx2.2 | NM_010919 | <i>Not</i> I, T7 | D. Hartigan |
| Nkx6.1 | NM_144955/ AF291666 | <i>Hind</i> III, T7 | E. Puelles |
| Nurr1 | NM_013613/ S53744 | <i>Hind</i> III, T7 | C. Brodski |
| Nr2f2 (Coup Tf2) | NM_009697 | <i>Eco</i> RI, T3 | M.-J. Tsai |
| Otx2 | NM_011023 | <i>Eco</i> RI, Sp6 | A. Simeone |
| Pax2 | NM_011037 | <i>Bam</i> HI, T3 | H. Fickenscher |
| Pitx3 | NM_008852/ S53744 | <i>Not</i> I, Sp6 | J. Guimera |

| | | | |
|-----------------------------|-----------|---------------------|--------------|
| | AF005772 | | |
| Raldh1 | BC054386 | <i>Bam</i> HI, T7 | F. Guillemot |
| sert | AF013604 | <i>Hind</i> III, T7 | C. Brodski |
| shh | BC063087 | <i>Hind</i> III, T3 | A. McMahon |
| Spr1 | NM_011896 | <i>Eco</i> RI, T7 | G. Martin |
| Sef | AF459444 | <i>Nco</i> I, Sp6 | R. Friesel |
| Tyrosin Hydroxylase (TH) | NM_009377 | <i>Sph</i> I, Sp6 | J. Guimera |
| Wnt1 | NM_021279 | <i>Hind</i> III, T7 | C. Brodski |
| Wnt3a | NM_009522 | <i>Eco</i> RI, Sp6 | R. Nusse |
| vAcht | NM_021712 | <i>Not</i> I, Sp6 | C. Brodski |

7.6 Abkürzungen

| | |
|-------|----------------------------|
| 3-AT | 3-Amino-1,2,4-triazol |
| Abb. | Abbildung |
| Ac | Acetat |
| AD | Aktivierungsdomäne |
| Ade | Adenin |
| Amp | Ampicillin |
| Bp | Basenpaare |
| BD | Bindedomäne |
| Best. | bestimmt(e) |
| °C | Grad Celsius |
| cDNA | <i>copy</i> DNA |
| cpm | counts per minute |
| dATP | Desoxyadenintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytosintriphosphat |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | Desoxyguanintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |

| | |
|--------|--------------------------------------|
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymintriphosphat |
| E | embryonaler Tag |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| E.coli | Escherichia coli |
| et al. | et alteres |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| Fa. | Firma |
| Fgf | Fibroblastenwachstumsfaktor |
| Fgfr | Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor |
| g | Gramm |
| g | Erdbeschleunigung |
| GOF | <i>gain of function</i> |
| His | Histidin |
| ISH | <i>in-situ</i> Hybridisierung |
| Kb | Kilobasenpaare |
| KDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| Leu | Leucin |
| LB | Luria-Bertami |
| LOF | <i>loss of function</i> |
| Lsg. | Lösung |
| μ | micro |
| m | milli |
| M | Molarität |
| MHG | Mittelhirn/Hinterhirn Grenze |
| MHO | Mittelhirn/Hinterhirn Organisator |
| MHR | Mittelhirn/Hinterhirn Region |
| min | Minute |
| mRNA | messenger-RNA |
| n | Probenzahl |
| Nr. | Nummer |
| o.g. | oben genannt(e) |

| | |
|--------|---|
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PEG | polyethylenglykol |
| PFA | Paraformaldehyd |
| RE | Restriktionsenym |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | Ribonuklease |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| SD | single drop-out |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| Sek. | Sekunden |
| Std. | Stunde |
| Tab. | Tabelle |
| Tris | Trishydromethylaminoethan |
| Trp | Tryptophan |
| U | Unit |
| üN | über Nacht |
| Vol. | Volumen |
| wt | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Wissenschaftliche Fachbegriffe werden üblicherweise in kursiver Schrift dargestellt. In vielen Fällen haben englische Fachbegriffe die inzwischen unüblichen deutschen Begriffe aus der Fachliteratur verdrängt und werden daher in kursiver Schrift verwendet. Lateinische und griechische Termini des allgemeinen, wissenschaftlichen, deutschen Sprachgebrauchs sind in dieser Arbeit nicht besonders gekennzeichnet. Gene werden gemäß der Nomenklatur des *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* abgekürzt und kursiv geschrieben. Proteine werden

ebenso wie die entsprechenden Gene abgekürzt aber nicht kursiv geschrieben. Aminosäuren sind im Drei-Buchstaben-Code angegeben. Chemische Elemente und Verbindungen sowie DNA modifizierende Enzyme (Restriktionsenzyme u.s.w.) werden mit ihren üblichen Symbolen abgekürzt.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst bedanken, der es mir ermöglichte die beiden Projekte der vorliegenden Dissertation zu bearbeiten. Dadurch erlangte ich vielfältige Einsichten in das Gebiet der molekularen Neurogenetik und der Entwicklungsbiologie. Dankbar bin ich auch für seine ständige Diskussionsbereitschaft, seinen Ideenreichtum und seine Begeisterungsfähigkeit, die einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ebenso dankbar bin ich für die Freiräume in der Gestaltung und Durchführung der Forschungsarbeit, die mein selbstständiges Denken und Handeln sowie meine Kreativität gefördert haben.

Frau Dr. D. Vogt Weisenhorn bin ich sehr dankbar für Ihre exzellente Betreuung in allen Belangen während der gesamten Zeit der Doktorarbeit und für zahlreiche, konstruktive Diskussionen die zur Schärfung meiner wissenschaftlichen Denkweise und Argumentationsfähigkeit wesentlich beigetragen haben. Auch möchte ich mich für die grenzenlose Unterstützung und das unermüdliche Korrekturlesen während der Endphase der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Herrn Dr. J. Guimera i Vilaro danke ich für die gute Betreuung in allen molekularbiologischen Fragen. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. A. Schnieke, Herrn Prof. Dr. Schneitz und Herrn Prof. Dr. E. Grill für Ihre Bereitschaft meine Dissertation zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Dr. N. Prakash für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskriptes. Mein Dank gilt außerdem Claudia für zahlreiche unermüdliche Diskussionen und Erklärungen während der gesamten Zeit, Thorsten und Eleonora für die hilfreiche Durchsicht der Doktorarbeit. Bei Jan möchte ich mich für die beratende Unterstützung bei molekulargenetischen Fragen bedanken, bei Claude, Harry und Yoh-Ra für zahlreiche Diskussionen und Tipps im Laboralltag. Des Weiteren möchte ich den technischen Assistentinnen, vor allem Annerose, Katja, Steffi, Miriam und Irina für die tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Experimenten danken. Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegern Herrn Bichlmeier und Herrn Pellmeyer für die gute Zusammenarbeit und für Ihre über das normale Maß hinausgehende Hilfsbereitschaft. Außerdem möchte ich mich bei unseren „Computer-Experten“ Jens, Marc, Dietrich und Bernd für die Lösung der Computerprobleme bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt Daniela („ich zieh im Januar bei Dir ein!“) und meiner „Zwillingschwester“ Rouzanna für die Freundschaft während der gesamten Zeit an der GSF, Thorsten („guckst Du!“) für die angenehme und oftmals lustige Zusammenarbeit im Labor und während der Entstehung der Veröffentlichung, Harry („Jetzt gib endlich die Arbeit ab!!“), Barbara (my „dark“ side), Sabit („Alex, ich glaub Deine Mäuse sind schwul!“), Thomas („Aleeeeeex, da ist schon wieder ein Flugzeug abgestürzt!“), Bernd(l) („Konkret krass Guten Morgen!“) und allen anderen Kollegen für die hilfreiche Unterstützung und zahlreiche wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Gespräche in der Endphase der Entstehung dieser Doktorarbeit.

Allen Mitarbeiter/-innen des Instituts sei für die freundschaftliche Atmosphäre und die zahlreichen Gespräche jeglicher Art gedankt.

Abschließend gilt mein Respekt und Dank meinen Eltern und meinen Freunden, die mich während der Jahre des Studiums und der Promotion uneingeschränkt unterstützt und bestärkt haben diesen Weg zu gehen.

9 Literatur

Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., Brulet, P. (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Dev.* 121(10):3279-90

Acampora, D., Gulisano, M., Broccoli, V., Simeone, A. (2001) *Otx* genes in brain morphogenesis. *Prog Neurobiol.* 64(1):69-95

Alifragis, P., Poortinga, G., Parkhurst, S.M., Delidakis, C. (1997) A network of interacting transcriptional regulators involved in *Drosophila* neural fate specification revealed by the yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25; 94(24):13099-104

Arman, E., Haffner-Krausz, R., Chen, Y., Heath, J. K. and Lonai, P. (1998) Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 , 5082-5087.

Arman, E., Haffner-Krausz, R., Gorivodsky, M., Lonai, P. (1999) *Fgfr2* is required for limb outgrowth and lung-branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11895-9

Asano, M., Gruss, P. (1992) *Pax-5* is expressed at the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mech. Dev.* 39, 29-39

Atchely, W.R., Fitch, W.M. (1997) A natural classification of the basic helix–loop–helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5172–5176,

Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M., Kageyama, R. (2000) The bHLH gene *Hes6*, an inhibitor of *Hes1*, promotes neuronal differentiation. *Dev.* 127(13):2933-43

Bailey, P., Sartorelli, V., Hamamori, Y., Muscat, G.E. (1998) The orphan nuclear receptor, COUP-TF II, inhibits myogenesis by post-transcriptional regulation of *MyoD* function: COUP-TF II directly interacts with p300 and *myoD*. *Nucleic Acids Res.* 26(23):5501-10

Beatus, P., Lendahl, U. (1998) Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res.* 54(2):125-36

Bellot, F., Crumley, G., Kaplow, J.M., Schlessinger, J., Jaye, M., Dionne, C.A. (1991) Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J.* 10, 2849-2854

Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F. (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 3(7):517-30

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23

Blak, A.A., Naserke, T., Weisenhorn, D.M., Prakash, N., Partanen, J., Wurst, W. (2005) Expression of Fgf receptors 1, 2, and 3 in the developing mid- and hindbrain of the mouse. *Dev. Dyn.* 233, 1023-30

Blunt, A.G., Lawshe, A., Cunningham, M.L., Seto, M.L., Ornitz, D.M., MacArthur, C.A. (1997) Overlapping expression and redundant activation of mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) receptors by alternatively spliced FGF-8 ligands. *J. Biol. Chem.* 272, 3733-8.

Broccoli, V., Boncinelli, E., Wurst, W. (1999) The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer. *Nature* 401(6749):164-8

Brodski, C., Weisenhorn, D.M., Signore, M., Sillaber, I., Oesterheld, M., Broccoli, V., Acampora, D., Simeone, A., Wurst, W.. (2003) Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *J. Neurosci.* 23, 4199-207

Brown, N.L., Kanekar, S., Vetter, M.L., Tucker, P.K., Gemza, D.L., Glaser, T. (1998) Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Dev.* 125, 4821-4833

Brunet, J.F., Ghysen, A. (1999) Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. *Bioessays* 21(4):313-8

Bulow, H.E., Boulin, T., Hobert, O. (2004) Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. *Neuron* 42(3):367-74

Burgess, W. H., Maciag, T. (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 575-606

Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., Arkinstall, S. (1998) Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280(5367):1262-5

Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C., and Guillemot, F. (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Dev.* 124, 1611-21 in Text rein!

Casarosa, S., Fode, C., Guillemot, F. (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Dev.* 126(3):525-34

- Chaudhuri, M. M., Moscatelli, D. and Basilico, C., (1993) Involvement of the conserved acidic amino acid domain of FGF receptor 1 in ligand-receptor interactions. *J. Cell Physiol.* 157, 209-216
- Chellaiah, A. T., McEwen, D. G., Werner, S., Xu, J. and Ornitz, D. M. (1994) Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem.* 269, 11620-11627.
- Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M.W., Fede, J.N., Nelkin, B.D., Baylin, S.B., Ball, D.B. (1997) Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: A hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5355-5360
- Cheon, H.-G., LaRoche, W. J., Bottaro, D. P., et al., (1994) High-affinity binding sites for related fibroblast growth factor ligands reside within different receptor immunoglobulin-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 989-993
- Chi, C. L., Martinez, S., Wurst, W. and Martin, G. R. (2003) The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130, 2633-2644.
- Ciruna, B. G., Schwartz, L., Harpal, K., Yamaguchi, T. P., Rossant, J. (1997) Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (*Fgfr1*) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Dev.* 124, 2829-2841.
- Colvin, J.S., Bohne, B.A., Harding, G.W., McEwen, D.G., Ornitz, D.M. (1996) Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 12, 390-7
- Cool, S.M., Sayer, R.E., van Heumen, W.R., Pickles, J.O., Nurcombe, V. (2002) Temporal and spatial expression of fibroblast growth factor receptor 4 isoforms in murine tissues. *Histochem J.* 34(6-7):291-7
- Crossley, P.H., Martin, G.R. (1995) The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Dev. Suppl.* 121, 439-451
- Crossley, P.H., Martinez, S., Martin, G.R. (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380, 66-68

Davis, C.A., Joyner, A.L. (1988) Expression patterns of the homeo box-containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene int-1 diverge during mouse development. *Genes Dev.* 2, 1736-44

Davis, R.L., Turner, D.L. (2001) Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-57

Dawson, S.R., Turner, D.L., Weintraub, H., Parkhurst, S.M. (1995) Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell Biol.* 15, 6923-31

De Moerloose, L., Spencer-Dene, B., Revest, J., Hajihosseini, M., Rosewell, I., Dickson, C. (2000) An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Dev.* 127, 483-492.

Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A. and Leder, P. (1996) Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911-921

Deng, C.X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M.M., Daugherty, C., Ornitz, D.M. and Leder, P. (1994) Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* 8, 3045-3057

Echevarria, D., Vieira, C., Gimeno, L., Martinez, S. (2003) Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 43(2):179-91

Echevarria, D., Martinez, S., Marques, S., Lucas-Teixeira, V., Belo, J.A. (2005) Mkp3 is a negative feedback modulator of Fgf8 signaling in the mammalian isthmus organizer. *Dev Biol.* 277(1):114-28

Engel, J., Bohn, M.C. (1991) The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *J. Neurosci.* 11(10):3070-8

Esko, J. D. (1991) Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 805-16

Eswarakumar, V.P., Monsonego-Ornan, E., Pines, M., Antonopoulou, I., Morriss-Kay, G.M., Lonai, P. (2002) The IIIc alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Dev.* 129, 3783-93

Farah, M.H., Olson, J.M., Sucic, H.B., Hume, R.I., Tapscott, S.J., Turner, D.L. (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Dev.* 127(4):693-702

Farkas, L.M., Dunker, N., Roussa, E., Unsicker, K., Kriegstein, K. (2003) Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J.Neurosci.* 23(12):5178-86

Fields, S., Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6

Firulli, B.A., Hadzic, D.B., McDaid, J.R., Firulli, A.B. (2000) The basic helix-loop-helix transcription factors dHAND and eHAND exhibit dimerization characteristics that suggest complex regulation of function. *J Biol Chem.* 275(43):33567-73

Fisher, A.L., Ohsako, S., Caudy, M. (1996) The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol. Cell Biol.* 16, 2670-7

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.L., Anderson, D.J., Guillemot, F. (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* 14, 67-80

Fortin, D., Rom, E., Sun, H., Yayon, A., Bansa, I R. (2005) Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci.* 25(32):7470-9

Fürthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B. and Thisse, C. (2002) Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat. Cell. Biol.* 4, 170-174.

Garda, A.L., Echevarria, D., Martinez, S. (2001) Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmus organizer. *Mech. Dev.* 101, 111-8

Gimeno, L., Hashemi, R., Brulet, P. and Martinez, S. (2002) Analysis of Fgf15 expression pattern in the mouse neural tube. *Brain Res. Bull.* 57, 297-299

Gradwohl, G., Fode, C., Guillemot, F. (1996) Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev. Biol.* 180, 227-241

Grothe, C., Schulze, A., Semkova, I., Muller-Ostermeyer, F., Rege, A., Wewetzer, K. (2000) The high molecular weight fibroblast growth factor-2 isoforms (21,000 mol. wt and 23,000 mol. wt)

mediate neurotrophic activity on rat embryonic mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Neuroscience* 100 (1):73-86

Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., Joyner, A.L. (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75(3):463-76

Guillemot, F. (1999) Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res.* 253(2):357-64

Hamburger, V. (1969) Hans Spemann and the organizer concept. *Experientia* 15, 1121-5

Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., Kageyama, R. (2004) Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Dev.* 131, 5539-50

Hebert, J.M., Lin, M., Partanen, J., Rossant, J., McConnell, S.K. (2003) FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* 130(6):1101-11

Heldin, C.-H., (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223

Hynes, M., Rosenthal, A. (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(1):26-36

Impagnatiello, M. A., Weitzer, S., Gannon, G., Compagni, A., Cotten, M. and Christofori, G. (2001) Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 152, 1087-1098.

Irving, C., Malhas, A., Guthrie, S., Mason, I. (2002) Establishing the trochlear motor axon trajectory: role of the isthmic organiser and Fgf8. *Development.* 129(23):5389-98

Ishibashi, M., Ang, S.L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., Guillemot, F.. (1995) Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* 9,3136-48

Ishibashi, M., McMahon, A.P. (2002) A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Dev.* 129, 4807-19

Johnson, D. E., Lee, P. L., Lu, J. and Williams, L. T. (1990) Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4728-4736

Johnson, J.E., Birren, S.J., Anderson, D.J. (1990) Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 356, 858-61

Johnson, D.E., Williams, L.T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res.* 60:1-41

Joyner, A.L. (1996) Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain--hindbrain development. *Trends Genet.* 12, 15-20

Joyner, A. L., Liu, A. and Millet, S. (2000) Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12, 736-741

Kageyama, R., Ishibashi, M., Takebayashi, K., Tomita, K.. (1997) bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 1389-99

Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., Koth, C. M., Buscher, D., Itoh, T., Raya, A., Ng, J. K., Esteban, C. R., Takahashi, S., Henrique, D., Schwarz, M. F., Asahara, H., Izpisua, B. J. (2003) MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat. Cell. Biol.* 5, 513-519.

Kiecker, C., Lumsden, A. (2004) Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nat Neurosci.* 7(11):1242-9

Kimmel, R. A., Turnbull, D. H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C. A. and Joyner, A. L. (2000) Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev* 14, 1377-1389

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252

Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I. and Schlessinger, J. (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693-702.

Lee, S.M., Danielian, P.S., Fritsch, B., McMahon, A.P. (1997) Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Dev.* 124, 959-969.

Li, J.Y., Joyner, A.L. (2001) *Otx2* and *Gbx2* are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Dev.* 128, 4979-91

Liu, A., Losos, K. and Joyner, A. L. (1999) FGF8 can activate *Gbx2* and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Dev. Suppl.* 126, 4827-4838

Liu, A., Joyner, A.L. (2001a) Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 869-96

Liu, A. and Joyner, A. L. (2001b) EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Dev. Suppl.* 128, 181-191

Liu, A., Li, J. Y., Bromleigh, C., Lao, Z., Niswander, L. A. and Joyner, A. L. (2003) FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Dev.* 130, 6175-6185

Lutz, B., Kuratani, S., Cooney, A.J., Wawersik, S., Tsai, S.Y., Eichele, G., Tsai, M.J. (1994) Developmental regulation of the orphan receptor COUP-TF II gene in spinal motor neurons. *Development* 120(1):25-36

Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J.L., Anderson, D.J. (1996) *neurogenin1* is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-82

Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P., Anderson, D.J. (1997) *Mash1* and *neurogenin1* Expression Patterns Define Complementary Domains of Neuroepithelium in the Developing CNS and Are Correlated with Regions Expressing Notch Ligands. *J. Neurosci.* 10, 3644-3652

MacArthur, C.A, Lawshe, A., Xu, J., Santos-Ocampo, S., Heikinheimo, M., Chellaiah, A.T., Ornitz, D.M. (1995) FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Dev.* 121, 3603-13

Martinez, S., Wassef, M., Alvarado-Mallart, R.M. (1991) Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron* 6(6):971-81

Martinez, S., Marin, F., Nieto, M.A., Puellas, L. (1995) Induction of ectopic engrailed expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental boundaries as barriers. *Mech. Dev.* 51(2-3):289-303

Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L., and Martin, G.R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmic cerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Dev. Suppl.* 126, 1189-1200

Maruoka, Y., Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Itoh, N., Hogan, B.M., Furuta Y. (1998) Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. *Mech. Dev.* 74, 175-177

Massari, M., Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 429-440

Maxwell, S.L., Ho, H.Y., Kuehner, E., Zhao, S., Li, M. (2005) Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev. Biol.* 282(2):467-79

McMahon, A.P., Joyner, A.L., Bradley, A., McMahon, J.A. (1992) The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69, 581-95

Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A. M., Aaronson, S.A. (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 246-250

Millet, S., Bloch-Gallego, E., Simeone, A., Alvarado-Mallart, R.M. (1996) The caudal limit of Otx2 gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts. *Dev. Suppl.* 122, 3785-3797

Millet, S., Campbell, K., Epstein, D.J., Losos, K., Harris, E., Joyner, A.L. (1999) A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401(6749):161-4

Minowada, G., Jarvis, L.A., Chi, C.L., Neubuser, A., Sun, X., Hacohen, N., Krasnow, M.A., Martin, G.R. (1999) Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Dev. Suppl.* 126, 4465-4475

Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K., Nakafuku, M. (2001) Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31(5):757-71

Mohammadi, M., Dikic, I., Sorokin, A., Burgess, W.H., Jaye, M., Schlessinger, J. (1996) Identification of six new novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and

elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 16, 977-989

Mohammadi, M., Dionne, C. A., Li, W., Li, N., Spivak, T., Honegger, A. M., Jaye, M. and Schlessinger, J. (1992) Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature* 358, 681-684.

Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J. and Wolfman, A. (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260, 1658-1661

Muda, M., Boschert, U., Dickinson, R., Martinou, J.C., Martinou, I., Camps, M., Schlegel, W., Arkinstall, S. (1996) MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J Biol Chem.* 271(8):4319-26

Nagy, A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109

Nakada, Y., Hunsaker, T.L., Henke, R.M., Johnson, J.E. (2003) Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification. *Development* 131(6):1319-30

Nakamura, H., Watanabe, Y. (2005) Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 231-5.

Niehrs, C., Meinhardt, H. (2002) Modular feedback. *Nature* 417(6884):35-6

Novitsch, B.G., Chen, A.I., Jessell, T.M. (2001) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* 31(5):773-89

Niss, K., Leutz, A. (1998) Expression of the homeobox gene GBX2 during chicken development. *Mech Dev.* 76(1-2):151-5

Ohmachi, S., Mikami, T., Konishi, M., Miyake, A., Itoh, N. (2003) Preferential neurotrophic activity of fibroblast growth factor-20 for dopaminergic neurons through fibroblast growth factor receptor-1c. *J. Neurosci. Res.* 72(4):436-43

Ohuchi, H., Kimura, S., Watamoto, M., Itoh, N. (2000) Involvement of fibroblast growth factor (FGF)18-FGF8 signaling in specification of left-right asymmetry and brain and limb development of the chick embryo. *Mech. Dev.* 95, 55-66

Ornitz, D.M., Herr, A.B., Nilsson, M., Westman, J., Svahn, C.M., Waksman, G., 1995. FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. *Science* 268, 432-6

Ornitz, D.M. (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22, 108-112

Parr, B.A., Shea, M.J., Vassileva, G., McMahon, A.P. (1993) Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Dev.* 119(1):247-61

Partanen, J., Schwartz, L. and Rossant, J. (1998) Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev.* 12, 2332-2344.

Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J.H., Goridis, C., Guillemot, F., Brunet, J.F. (2004) *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci.* 7(6):589-95

Peters, K. G., Marie, J., Wilson, E., Ives, H. E., Escobedo, J., Del Rosario, M., Mirda, D., Williams, L. T. (1992) Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca²⁺ flux but not mitogenesis. *Nature* 358, 678-681.

Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Mohammadi, M. (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98, 641-650

Powers, C.J., McLeskey, S.W., Wellstein, A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7(3):165-97

Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S.L., Wurst, W., Simeone, A. (2004) *Otx2* regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Dev.* 131, 2037-48

Qiu, Y., Cooney, A.J., Kuratani, S., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. (1994) Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(10):4451-5

Raible, F., Brand, M. (2001) Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech. Dev.* 107: 105-117

Raible, F., Brand, M. (2004) Divide et Impera--the midbrain-hindbrain boundary and its organizer. *Trends Neurosci.* 27(12):727-34

Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M. (1998) Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrainhindbrain boundary development and somitogenesis. *Dev. Suppl.* 125, 2381-2395

Reuss, B., von Bohlen und Halbach, O. (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 313(2):139-57

Revest, J.M., Suniara, R.K., Kerr, K., Owen, J.J., Dickson, C. (2001) Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J. Immunol.* 167, 1954-61

Rhinn, M., Brand, M. (2001) The midbrain--hindbrain boundary organizer. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 34-42

Roehl, H., Nusslein-Volhard, C. (2001) Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol.* 11(7):503-7.

Roghani, A., Feldman, J., Kohan, S.A., Shirzadi, A., Gundersen, C.B., Brecha, N., Edwards, R.H. (1994) Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. USA* 91, 10620-24

Ross, S.E., Greenberg, M.E., Stiles, C.D. (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39(1):13-25

Rowitch, D.H., McMahon, A.P. (1995) Pax-2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of Wnt-1 and En-1. *Mech. Dev.* 52, 3-8

Saitsu, H., Komada, M., Suzuki, M., Nakayama, R., Motoyama, J., Shiota, K., Ishibashi, M. (2005) Expression of the mouse *Fgf15* gene is directly initiated by Sonic hedgehog signaling in the diencephalon and midbrain. *Dev. Dyn.* 232, 282-92

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T. (1998) *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sato, T., Araki, I., Nakamura, H. (2001) Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Dev.* 128, 2461-9

Scholpp, S.G. (2004) Zebrafish *fgfr1* is a member of the *fgf8* synexpression group and is required for *fgf8* signalling at the midbrain-hindbrain boundary. *Development Genes & Evolution* 214, 285-295

Shamim, H., Mahmood, R., Logan, C., Doherty, P., Lumsden, A., Mason, I. (1999) Sequential roles for *Fgf4*, *En1* and *Fgf8* in specification and regionalisation of the midbrain. *Development*. 126(5):945-59

Shi, E., Kann, M., Xu, J., Wang, F., Hou, J., McKeenan, W.L. (1993) Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerisation of combinatorial splice variants. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3907-18

Shimamura, K., Rubenstein, J. L. (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Dev. Suppl.* 124, 2709-2718

Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., Boncinelli, E. (1993) A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735-2747

Sleptsova-Friedrich, I., Li, Y., Emelyanov, A., Ekker, M., Korzh, V., Ge, R. (2001) *fgfr3* and regionalization of anterior neural tube in zebrafish. *Mech. Dev.* 102, 213-217

Smidt, M.P., Asbreuk, C.H., Cox, J.J., Chen, H., Johnson, R.L., Burbach, J.P. (2000) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nat Neurosci.* 3(4):337-41

Soriano, P. (1999) Generalized *lacZ* expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21, 70-71

Stokoe, D., McCormick, F. (1997) Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *EMBO J.* 16, 2384-2396

Sun, T., Echelard, Y., Lu, R., Yuk, D.I., Kaing, S., Stiles, C.D., Rowitch, D.H. (2001) Olig bHLH proteins interact with homeodomain proteins to regulate cell fate acquisition in progenitors of the ventral neural tube. *Curr Biol.* 11(18):1413-20

Tomita K, Ishibashi M, Nakahara K, Ang SL, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. (1996a) Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron* 16, 723-34

- Trokovic, R., Trokovic, N., Hernesniemi, S., Pirvola, U., Vogt, W. D., Rossant, J., McMahon, A. P., Wurst, W., Partanen, J. (2003) FGFR1 is independently required in both developing mid- and hindbrain for sustained response to isthmic signals. *EMBO J.* 22, 1811-1823
- Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T., Dawid, I. B. (2002) Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat. Cell. Biol.* 4, 165-169
- Tsang, M., Dawid, I.B. (2004) Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* 2004(228):pe17
- van der Geer, P., Hunter, T., Lindberg, R. A. (1994) Receptor protein-tyrosine and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 251-337
- Venkataraman, G., Sasisekharan, V., Herr, A.B., Ornitz, D.M., Waksman, G., Cooney, C.L., Langer, R., Sasisekharan, R. (1996) Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 845-850
- Walshe, J., Mason, I. (2000) Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. *Mech. Dev.* 90, 103-110
- Wang, F., Kann, M., Yan, G., Xu, J., McKeenan, W.L. (1995a) Alternately spliced NH2 terminal immunoglobulin-like loop I in the ectodomain of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *J. Biol. Chem.* 270, 10231-10235
- Wang, F., Kann, M., Xu, J., Yan, G., McKeenan, W.L. (1995b) Ligand-specific structural domains in the fibroblast growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 270, pp. 10222-10230
- Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L., Martinez, S., Martin, G.R. (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Dev. Suppl.* 124, 2923-2934
- Wassef, M., Joyner, A.L. (1997) Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5, 3-16
- Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K. and Deng, C. X. (1998) FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Dev.* 125, 3615-3623
- Wilke, T.A., Gubbels, S., Schwartz, J., Richman, J.M. (1997) Expression of fibroblast growth factor receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3) in the developing head and face. *Dev Dyn.* 210, 41-52

Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S., Doherty, P. (1994) Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13(3):583-94

Wurst, W., Bally-Cuif, L. (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci.* 2(2):99-108

Xian, C.J., Li, L., Deng, Y.S., Zhao, S.P., Zhou, X.F. (2001) Lack of effects of transforming growth factor- α gene knockout on peripheral nerve regeneration may result from compensatory mechanisms. *Exp Neurol.* 172(1):182-8

Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P., Deng, C. (1998) Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Dev.* 125, 753-65

Xu, X., Li, C., Takahashi, K., Slavkin, H.C., Shum, L., Deng, C.X. (1999) Murine fibroblast growth factor receptor 1 α isoforms mediate node regression and are essential for posterior mesoderm development. *Dev. Biol.* 208, 293-306

Xu, J., Liu, Z., Ornitz, D. M. (2000) Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Dev. Suppl.* 127, 1833-1843

Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M., Rossant, J. (1994) fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* 8, 3032- 3044

Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M. (1991) Cell surface, heparinlike molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841-848

Ye, W., Bouchard, M., Stone, D., Liu, X., Vella, F., Lee, J., Nakamura, H., Ang, S.L., Busslinger, M., Rosenthal, A. (2001) Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8. *Nat. Neurosci.* 4, 1175-1181

Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Hynes, M.A., Rosenthal, A. (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755-66.

Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G., Rubenstein, J.L. (2002) Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Dev.* 129(21):5029-40

Zhou, Q., Choi, G., Anderson, D.J. (2001) The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* 31(5):791-807

Zhou, Q., Anderson, D.J. (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109(1):61-73

Zimmer, Y., Givol, D., Yayon, A. (1993) Multiple structural elements determine ligand binding of fibroblast growth factor receptors. Evidence that both Ig domain 2 and 3 define receptor specificity. *J. Biol. Chem.* 268, 7899-7903