

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Wnt1 Signaltransduktion durch Frizzled Rezeptoren in der Entwicklung
mittelhirn-dopaminerges Neurone

Sebastian Stübner

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. S. Scherer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. W. Wurst
2. Privat-Doz. Dr. J. Beckers

Die Dissertation wurde am 07.09.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.11.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Einleitung.....	6
2.1. Dopaminerge Neuronen	6
2.2. Neurodegenerative Erkrankung: Parkinson	7
2.3. Entwicklung der mDA Neuronen.....	9
2.4. Kanonischer Wnt Signalweg	13
2.4.1. Frizzled Rezeptoren.....	14
2.4.2. Intrazelluläre Komponenten im kanonischen Wnt Signalweg.....	17
2.5. Zielsetzung der Arbeit	18
3. Ergebnisse.....	20
3.1. mDA Neuronen werden in Abwesenheit von Fzd6 induziert	20
3.1.1. Analyse von mDA Neuronen in der Spezifikationsphase E10.5 im <i>Fzd6 ko</i>	20
3.1.2. Analyse der mDA Neuronen in der Differenzierungsphase E12.5 im <i>Fzd6 ko</i>	23
3.1.3. Analyse der mDA Neuronen in der Erhaltungsphase E17.5 im <i>Fzd6 ko</i>	24
3.2. mDA Neuronen werden in Abwesenheit von Fzd3 induziert	26
3.2.1. Analyse der mDA Neuronen in der Spezifikationsphase E10.5 im <i>Fzd3 ko</i>	26
3.2.2. Leichte Verbreiterung der mDA Neuronen Domäne im Stadium E12.5 im <i>Fzd3 ko</i> nur coronal sichtbar	27
3.2.3. Leichte Verbreiterung der mDA Neuronen Domäne ist persistent im <i>Fzd3 ko</i> im Stadium E13.5	29
3.2.4. Normale Entwicklung der mDA Neuronen im Stadium E15.5 im <i>Fzd3 ko</i>	30
3.2.5. Analyse der mDA Neuronen in der Erhaltungsphase E17.5 im <i>Fzd3 ko</i>	31
3.3. Normale mDA Neuronen Entwicklung im <i>Fzd3/Fzd6 Doppel ko</i>	33
3.3.1. Analyse der mDA Neuronen im Stadium E12.5 im <i>Fzd3/Fzd6 Doppel ko</i>	34
3.3.2. Dorsaler Phänotyp im <i>Fzd3/Fzd6 Doppel ko</i> im Stadium E12.5	36
3.4. Funktion von Lef1 im kanonischen Wnt Signalweg in der Entstehung von mDA Neuronen	39
3.4.1. Expressionsanalyse von <i>Lef1</i> in CD1 <i>wt</i> Mäusen	40
3.4.2. Lef1 in der Entstehung von mDA Neuronen	41
3.4.2.1. Analyse der mDA Neuronen in der Spezifikationsphase E10.5 im <i>Lef1 ko</i>	41
3.4.2.2. Analyse der mDA Neuronen in der Differenzierungsphase E12.5 im <i>Lef1 ko</i> ...	42
3.4.2.3. Leichte Reduktion der mDA Neuronen in der Erhaltungsphase E17.5 im <i>Lef1 ko</i>	44
3.4.3. <i>In vivo</i> Chromatin Immunpräzipitation mit Lef1 Antikörper.....	47
3.4.4. Funktionale Analyse des Pitx3 Promoters	51
3.4.4.1. Luciferaseassay in HCN, HEK-293 und COS7 Zellen	51
3.4.4.2. Transfektionseffizienz und Test der Konstrukte	52
3.4.5. Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der <i>Pitx3^{+Gfp}</i> Maus.....	54

4. Diskussion	56
4.1. Redundante Funktionen der Frizzled Rezeptoren in mDA Neuronenentwicklung.....	58
4.1.1. mDA Neuronen werden ohne Frizzled 6 Rezeptor entwickelt.....	58
4.1.2. Auch die <i>Fzd3</i> ^{-/-} Maus weist keinen veränderten mDA Phänotyp auf.....	59
4.1.3. Massiver dorsaler Neuralrohrdefekt - jedoch normale Entwicklung der mDA Neuronendomäne im <i>Fzd3/Fzd6 Doppel ko</i>	59
4.2. <i>Lef1</i> ist sowohl in der Spezifikationsphase als auch in der frühen Differenzierungsphase im ventralen MH exprimiert.....	62
4.2.2. Im <i>Lef1 ko</i> sind 10% weniger Th ⁺ Neuronen im Stadium E17.5 detektierbar	63
4.2.3. <i>Lef1</i> bindet in der Promoterregion des <i>Pitx3</i> Gens <i>in vivo</i>	64
4.2.4. Luciferaseassay - Funktionsanalyse des <i>Pitx3</i> Promoters.....	65
4.2.5. Ausblick zum LiCl induzierten kanonischen Wnt Signal in der <i>Pitx3</i> ^{+/<i>Gfp</i>} <i>ko</i> Maus.....	66
5. Material.....	67
5.1. Technische Geräte	67
5.2. Verbrauchsartikel	67
5.3. Biologisches Material.....	68
5.3.1. Zelllinien	68
5.3.2. Mauslinien.....	68
6. Methoden.....	69
6.1. Isolation von DNA	69
6.1.1. Isolation von DNA aus PCR Reaktionen und Gelen.....	69
6.1.2. Isopropanol Präzipitation	69
6.1.3. Isolation von DNA aus Mausschwänzen	69
6.1.3.1. Isolation der DNA mit Aufreinigung	69
6.1.3.2. Isolation der DNA ohne Aufreinigung.....	70
6.2. Bestimmung der Konzentration von DNA.....	71
6.3. RNA Präparation aus Zellen	71
6.4. cDNA Synthese durch RT - PCR.....	71
6.5. Klonierung.....	72
6.6. Transformation von chemisch kompetenten Bakterienzellen	72
6.7. Plasmid DNA	72
6.7.1. Aufspaltung von Plasmid DNA.....	72
6.7.2. Plasmid DNA Aufreinigung.....	73
6.8. DNA Sequenzierung	73
6.9. Herstellung von Glycerolstocks	73
6.10. Gelelektrophorese.....	73
6.11. Primer Erstellung.....	73
6.12. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	74
6.12.1. Standardprotokoll der PCR	74
6.12.2. Primer für die PCR.....	74
6.13. Maushaltung	75
6.13.1. Entnahme von Embryonen	77
6.14. Einbetten der Objekte.....	77
6.14.1. Einbettung von Embryonen.....	77
6.14.1.1. Einbettung in Paraffin für Immunhistochemie.....	77
6.14.1.2. Einbettung in Paraffin für <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	78
6.15. Schneiden von Mausegewebe	78

6.16. <i>In situ</i> Hybridisierung (ISH)	79
6.17. Immunhistochemie (IHC)	82
6.18. Kresylviolett Färbung.....	83
6.19. Fotografieren von Präparaten	83
6.20. Zellzählung.....	84
6.21. LiCl Test.....	85
6.22. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	85
6.23. Zellkultur	86
6.23.1. Neuronale Zellen	86
6.23.1.1. Beschichtung der Platten für HCN Zellen.....	86
6.23.1.2. Passage der HCN Zellen	86
6.23.1.3. Mediumwechsel bei HCN Zellen	87
6.23.1.4. Elektroporation in HCN Zellen	87
6.23.2. Nicht neuronale Zellen	88
6.23.2.3. Passage der COS7 und HEK-293 Zellen.....	88
6.23.2.4. Mediumwechsel bei COS7 und HEK-293 Zellen	88
6.23.2.5. Transfektion in COS7 und HEK-293 Zellen.....	88
6.23.3. Standardbedingungen	89
6.23.4. Messung der Luciferase Aktivität	89
6.23.5. Einfrieren von Zellen	89
6.23.6. Auftauen von Zellen.....	89
7. Literatur	90
8. Danksagung	101
9. Anhang	102
9.1. Umrechnung Schwerkraft/ Drehzahl.....	102
9.2. <i>Lef1</i> ko Maus: Einzelergebnisse der Zellzählung.....	102
9.3. Antikörperverzeichnis	103
9.4. Vektorkarte pCRII- TOPO	103
9.5. Abkürzungen	104

1. Zusammenfassung

Dopaminerge (DA) Neuronen des Mittelhirns stellen die größte Dopamin produzierende Zellpopulation im Gehirn der höheren Wirbeltiere dar. Ihre Projektionen in das Striatum und den präfrontalen Cortex spielen eine außerordentlich bedeutende Rolle in der Kontrolle motorischer, affektiver und kognitiver Hirnfunktionen. Ihre Degeneration im menschlichen Mittelhirn führt zu Morbus Parkinson und ihre Dysfunktion ist vermutlich an der Pathogenese von psychotischen und affektiven Störungen bzw. an der Ausbildung von Abhängigkeitssyndromen beteiligt. Zur Entwicklung geeigneter Therapien für diese Erkrankungen ist unter anderem eine genaue Kenntnis der Entstehung dieser Neuronen während der Embryogenese notwendig.

Nach aktuellem Kenntnisstand sind mehrere sezernierte- und Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Wnt1 und Pitx3 für die Entwicklung von mittelhirn- dopaminergen (mDA) Neuronen entscheidend. In früheren Studien konnte zum Einen gezeigt werden, dass Wnt1 notwendig und ausreichend ist, um mDA Neuronen zu erzeugen.

Zum Anderen wurden Expressionsanalysen der Frizzled Rezeptoren, die das Wnt-Signal weiterleiten, durchgeführt. Diese Studie ergab für *Fzd6* eine im Neuralrohr rostral der Mittel- Hinterhirn Grenze starke Expression sowie für *Fzd3* eine eher ubiquitäre und für *Fzd9* eine schwache Expression in der Region, in der mDA Neuronen entstehen.

Eine extrazelluläre Aktivierung des Wnt Signalwegs in Patienten mit oben angegebenen neurodegenerativen Erkrankungen wäre durch sogenannte small compound Therapien denkbar, wenn *Fzd6* oder *Fzd3* essentiell für die Entwicklung von mDA Neuronen ist. Um herauszufinden inwieweit diese Rezeptoren an der Entstehung der mDA Neuronen beteiligt sind, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sowohl die *Fzd6*^{-/-} als auch die *Fzd3*^{-/-} Einzelmutante am Modellorganismus der Maus untersucht. Zudem wurde aufgrund von möglichen redundanten Funktionen die *Fzd3*^{-/-}/*Fzd6*^{-/-} Doppelmutante analysiert. Die Ergebnisse zeigen bei der *Fzd6 ko* Maus keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zum *wt* bezüglich der mDA Neuronen, d.h. mDA Neuronen entstehen erfolgreich auch ohne den *Fzd6* Rezeptor. Bei der *Fzd3 ko* Maus ist eine Verbreiterung der Expressionsdomäne von mDA Neuronen in den Stadien E12.5 bis E13.5 - insgesamt jedoch kein veränderter Phänotyp zu verzeichnen. Die *Fzd3*^{-/-}/*Fzd6*^{-/-} Doppelmutante entwickelt ebenfalls die

mDA Neuronen zur richtigen Zeit am richtigen Ort. Hier ist jedoch ein Defekt in der Entwicklung des Neuralrohrs festzustellen bei dem dorsales Gewebe wahrscheinlich unkontrolliert in den Ventrikel einwächst.

Innerhalb der Frizzled Rezeptoren ist von einer hohen Redundanz auszugehen, da selbst der *Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-} Doppel ko* keinen zum *wt* veränderten Phänotyp in Bezug auf die Entwicklung von mDA Neuronen aufwies. Die Erkenntnisse aus diesen Mutanten, wie z.B. der eingedrehte Schwanz, Fertilitätsprobleme und die fehlerhafte Neuralrohrbildung lassen eine Beteiligung dieser Rezeptoren am planaren Zellpolarität Wnt- Signalweg vermuten.

Von den drei Wnt- Signalwegen ist der Kanonische der am besten untersucht. Es gibt Hinweise *in vitro* und *in vivo*, dass die kanonische Wnt- Signaltransduktion ausschlaggebend für die Entwicklung von mDA Neuronen ist.

Neben den Fzd Rezeptoren ist noch eine Vielzahl von Faktoren an diesem kanonischen Wnt- Signalweg beteiligt. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche intrazelluläre Aktivierung dieses Signalwegs untersucht. Am Ende der Signalkaskade befinden sich unter anderem Tcf/Lef Transkriptionsfaktoren. Von diesen insgesamt vier Transkriptionsfaktoren ist *Lef1* in der Region exprimiert, in der mDA Neuronen entstehen. In der hier durchgeführten Expressionsstudie wurde dies bestätigt. Die Hypothese ist, dass das Lef1 Protein in der Promoterregion des *Pitx3* Gens bindet, einem Faktor der wahrscheinlich direkt von Wnt angesteuert wird. Hinweise dazu lieferte eine vorhandene *in silico* Analyse, die Lef1 Bindestellen im *Pitx3* Promoter aufzeigte. Dass Lef1 an diese Bindestellen binden kann, konnte hier erstmals *in vivo* mit einem Chromatin Immun Präzipitations (ChIP) assay nachgewiesen werden. In der *Lef1 ko* Maus wurde dann die Entwicklung von mDA Neuronen *in vivo* untersucht. Eine leichte, dennoch signifikante Verminderung der Tyrosin Hydroxylase (Th) positiven Zellen im Stadium E17.5 konnte festgestellt werden. Die Ergebnisse der Lef1 Analyse lassen auch eine mögliche Redundanz der Tcf/Lef Transkriptionsfaktoren zu.

2. Einleitung

Ein Großteil unserer Hirnfunktionen wird durch Nervenzellen gesteuert, die einen bestimmten Neurotransmitter produzieren. Die meisten dieser Neurotransmitter können in drei Gruppen eingeteilt werden. Zum Typ 1 gehören die Aminosäuren (z.B.: Glutamat, Aspartat, Gamma Amino Buttersäure (GABA) und Glycin). Zum Typ 2 werden die biogenen Amine (beispielsweise Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin und Histamin), Acetylcholin und Purine gezählt. Zum Typ 3 schließlich rechnet man die Neuropeptide wie z.B. Somatostatin und Vasopressin.

Die biogenen Amine (Typ 2) entstehen durch enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren. Hier wird auf einen relativ seltenen (5%), jedoch bedeutenden Nervenzelltyp - jenen der Dopamin produziert - eingegangen.

2.1. Dopaminerge Neuronen

Dopaminerge Neuronen leiten ein Signal mit Hilfe des Neurotransmitters Dopamin weiter. Dabei wird der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt abgegeben und u.a. von Dopamin Rezeptoren der nachgeschalteten Synapse aufgenommen und damit das Signal weitergeleitet (Schmitz, Benoit-Marand et al., 2003).

Die große Mehrheit dieser Neuronen befindet sich bei Säugetieren im Mittelhirn (Abb. 1), sowohl in der Substantia nigra (SN bzw. A9) als auch im ventralen tegmentalen Areal (VTA bzw. A10) sowie eine kleinere Population im retrorubalen Feld (RrF bzw. A8). Wesentlich kleinere Neuronengruppen befinden sich in den Regionen A11 bis A17 (Prakash & Wurst, 2006; Smidt & Burbach, 2007).

Die Neuronen der SN projizieren hauptsächlich in das Striatum und bilden damit den sogenannten nigrostriatalen Signalweg, wogegen die Neuronen der VTA und des RrF hauptsächlich in zwei Gehirnregionen projizieren: Erstens über den mesolimbischen Signalweg zur Amygdala, zum Nucleus accumbens und zum olfaktorischen Tuberkel; und Zweitens über den mesocorticalen Signalweg in den präfrontalen Cortex (Abb. 1).

Die nigrostriatalen Projektionen kontrollieren motorische Zentren, dem mesolimbischen System werden Funktionen im Belohnungssystem zugeschrieben.

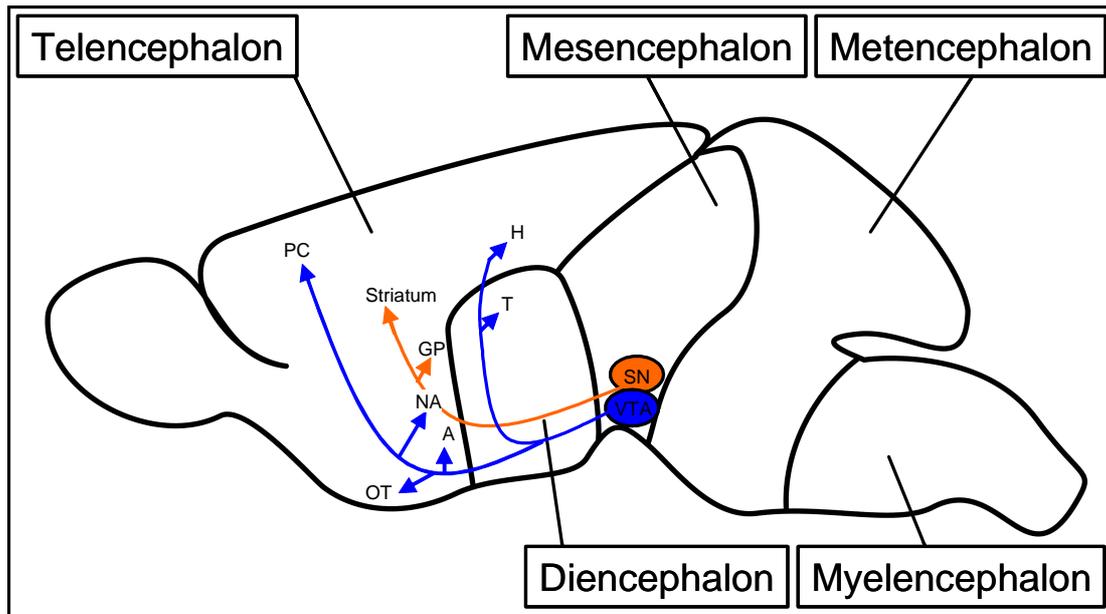


Abb. 1: Gehirn eines adulten Nagers, rostral nach links. Lokalisierung der größten Areale in denen mDA Neuronen zu finden sind. Neuronen der SN (A9, orange) projizieren in den Globus Pallidus und ins Striatum, die der VTA (A10, blau) unter anderem ins ventrale Striatum und in den präfrontalen Cortex. A - Amygdala, GP - Globus Pallidus, H - Hippocampus, NA - Nucleus accumbens, OT - Olfaktorischer Tuberkel, PC - Präfrontaler Cortex, T - Thalamus. Abbildung modifiziert aus Prakash & Wurst, 2006.

Kognitive Funktionen werden mit dem mesocorticalen System gesteuert (Kimura, Satoh et al., 2007; Prakash & Wurst, 2006).

Dysfunktionen von DA Neuronen haben unterschiedliche Auswirkungen, einerseits können Hormonlevel (Prolactin) verändert sein, welche die Fertilität beeinträchtigen können und andererseits kann durch die Dysfunktion der DA Neuronen der VTA das Belohnungssystem gestört sein (Blackwell, 1992; Fitzgerald & Dinan, 2008; Salamone, 1996; Spanagel & Weiss, 1999). Eine weitere Folge sind Schizophrenie sowie Psychosen und Gedächtnisverlust (Singh, 2005).

Der Verlust der dopaminergen Neuronen der SN hat, in Bezug auf die Motorik, für den Patienten schwerwiegende Folgen: er wird unter gravierenden Parkinson Symptomen leiden (Fahn, 2003; Klockgether, 2004).

2.2. Neurodegenerative Erkrankung: Parkinson

Die Hoffnung älter werdender Menschen besteht nicht nur darin, noch mehr Jahre dem Leben hinzuzufügen, sondern mehr Leben den Jahren.

Im Gegensatz zu den relativ guten Behandlungsmethoden der klassischen Todesursachen (Herz- Kreislaufkrankheiten, Unfälle) gibt es vergleichsweise geringe Möglichkeiten, Menschen, die an Krankheiten des Nervensystems leiden, zu helfen. Als Todesursache kommen Krankheiten des Nervensystems in Deutschland selten (2,21%) vor (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007). Wie hoch der Prozentsatz der an Parkinson, Schizophrenie oder Depression leidenden Menschen ist, wird nicht genau erfasst. Parkinson ist dennoch heute eine der am weitesten verbreiteten neurodegenerativen Erkrankungen älterer Menschen (ca. 300.000 Betroffene in Deutschland) die nicht zu unterschätzende Kosten verursacht: ca. 15.000 € p.P./Jahr (Findley, Aujla et al., 2003). Die Summe von 4,5 Mrd. € entspricht in etwa der Hälfte des deutschen Bundeshaushaltes 2008 für Wissenschaft und Forschung (Bundesfinanzministerium, 2008).

Der Krankheitsverlauf beginnt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (Fahn, 2003; Fearnley & Lees, 1991). Die häufigsten motorischen Phänotypen sind beispielsweise verlangsamte Bewegungen (Bradykinese), Muskelstarre (Rigor), Muskelzittern (Tremor) und Haltungsinstabilität (posturale Instabilität) (Klockgether, 2004). Bevor diese bei den Patienten beobachtet werden können, kommt es bereits viel früher zu einem Verlust der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns. Erst nach einem Verlust von ca. 60% der Neuronen der Substantia nigra kommt es zu den erwähnten motorischen Problemen (Dauer & Przedborski, 2003). Die zumeist, erst aufgrund von Fehleinschätzungen von Symptomen, sehr spät gestellte Diagnose kann so nur zu einer Therapie führen, die lediglich auf die Symptome des Patienten eingeht und versucht diese zu lindern (Lang & Lozano, 1998; Langston, 2006).

Um für spätere Behandlungsmethoden von Parkinson regenerative Therapien, z.B. die Einpflanzung gesunder Neuronen oder Stammzellen (Freed, Greene et al., 2001; Mendez, Vinuela et al., 2008; Winkler, Kirik et al., 2005), das nötige Wissen zu haben, wird die natürliche Entwicklung dieser Neuronen erforscht. Dabei wird auf den Modellorganismus Maus zurückgegriffen. Die Maus als Säugetier hat, die Sequenz der Genome betreffend, mit dem Menschen eine sehr hohe Übereinstimmung und ist dennoch relativ einfach zu untersuchen. Daher stellt sie ein gutes Forschungsobjekt dar (Bradley, 2002; Graw, 2004; Knight & Abbott, 2002). Die Vermutung liegt nahe, dass die Entwicklung mittelhirn-dopaminergener Neuronen bei Maus und Mensch nahezu gleich ablaufen.

2.3. Entwicklung der mDA Neuronen

Mittelhirn-dopaminerge (mDA) Neuronen der SN bzw. VTA werden in der Nachbarschaft zweier wichtiger sog. Organisationszentren des Wirbeltier-Embryos spezifiziert: Erstens der ventralen Mittellinie des Neuralrohrs, auch als Bodenplatte (BP) bezeichnet. Diese sezerniert das Protein Sonic Hedgehog (Shh) (Echelard, Epstein et al., 1993). Und Zweitens an der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (MHG), auch als isthmischer Organizer (IsO) bezeichnet. An diesem werden eine ganze Reihe verschiedener sezernierter Faktoren und Transkriptionsfaktoren exprimiert (Hynes & Rosenthal, 1999; Martinez, Wassef et al., 1991; Wurst & Bally-Cuif, 2001). Zu diesen, in „gain-“ und „loss of funktion“ (GOF resp. LOF), untersuchten Faktoren gehört auch das sezernierte Glykoprotein wingless-related integration site 1 (Wnt1) (Prakash, Brodski et al., 2006; Wilkinson, Bailes et al., 1987), welches im Stadium E10.5 (Embryonaler Tag 10.5) in der mesencephalen Flexur, ringförmig an der MHG und im dorsalen Bereich des Mittelhirns exprimiert wird (Abb. 2).

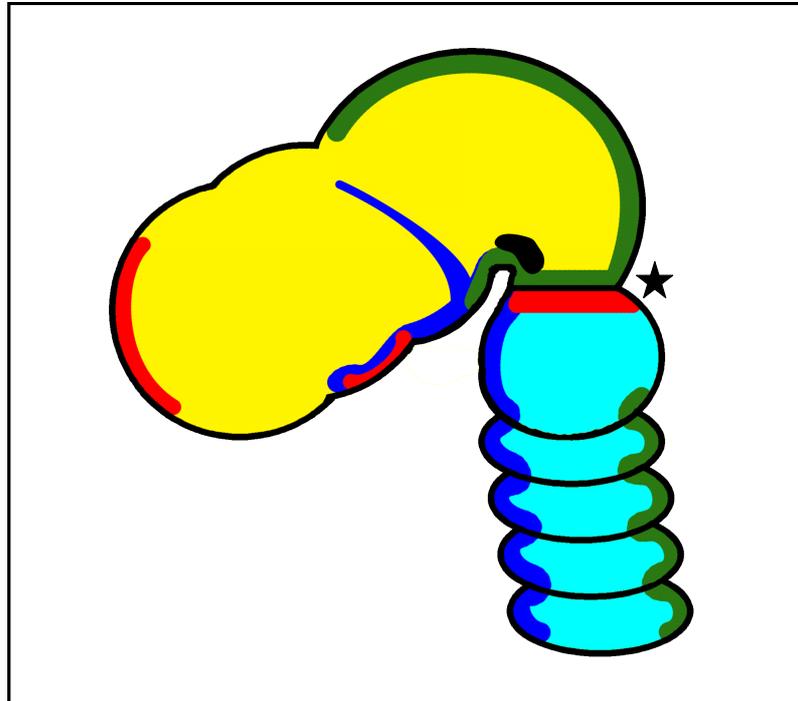


Abb. 2: Skizze mit sagittaler Ansicht des vorderen Neuralrohrs eines E10.5 Mausembryos, rostral nach links. Die mDA Vorläuferzellen (schwarz) sind in der Nähe von zwei Organisationszentren lokalisiert: 1. Shh (blau) ist in der Bodenplatte exprimiert und signalisiert einen dorso-ventralen Gradienten. 2. Die Position der MHG (Stern) ist definiert mit den Expressionen von Otx2 (gelb) im rostralen Bereich sowie Gbx2 (türkis) im Caudalen. Wobei direkt caudal der MHG Fgf8 (rot) und rostral davon Wnt1 (grün) exprimiert sind. Wnt1 ist zudem in der mesencephalen Flexur, im dorsalen Mittelhirn sowie im dorsalen Hinterhirn/ Rückenmark zu finden. Abb. nach Prakash & Wurst, 2006.

Weiterhin wird direkt caudal der MHG der Fibroblast growth factor 8 (Fgf8) exprimiert (Crossley & Martin, 1995; Echevarria, Vieira et al., 2003; Liu & Joyner, 2001). Die MHG wird definiert durch den rostralen Otx2 (orthodenticle homolog 2) positiven und den caudalen Gbx2 (gastrulation brain homeobox 2) positiven Bereich (Prakash & Wurst, 2004; Simeone, Acampora et al., 1992; Wassef & Joyner, 1997). Ebenso sind die Expressionen von En1/2 sowie Pax2/5 über der MHG lokalisiert (Favor, Sandulache et al., 1996; Joyner, Liu et al., 2000; Millen, Wurst et al., 1994; Schwarz, Alvarez-Bolado et al., 1997; Wurst, Auerbach et al., 1994).

Zellen aus denen DA Neuronen entstehen, kann man bereits im Stadium E10.5 konstatieren. Dieser Nachweis kann mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung (ISH) oder Immunohistochemie (IHC) erfolgen (siehe 6.16. resp. 6.17.). Dabei werden verschiedene Marker verwendet. So ist beispielsweise bekannt, dass Aldh1a1 (früher Raldh1) - aldehyde dehydrogenase family 1 subfamily A1 - und Nr4a2 (früher Nurr1) – nuclear receptor subfamily 4 group A member 2 - als Transkriptionsfaktoren unter anderem in den Vorläuferzellen der DA Neuronen zu finden sind (Perlmann & Wallen-Mackenzie, 2004; Wallen, Zetterstrom et al., 1999; Zetterstrom, Solomin et al., 1997).

Für eine sichere Zuordnung dieser Populationen zu den mDA Neuronen ist es notwendig weitere Markergene auf m-RNA- und Proteinebene nachzuweisen. Bereits ab dem Stadium E12.5 können Slc6a3 (solute carrier family 6, member 3), ab E11.0 - E11.5 Th (Tyrosine Hydroxylase) und Pitx3 (paired-like homeodomain transcription factor 3) herangezogen werden.

Slc6a3 - früher unter Dat (Dopamin Transporter) bekannt - ist ein Molekül welches sich an den Synapsen von DA Neuronen befindet und Dopamin, nach der Ausschüttung in den synaptischen Spalt, wieder in die Zelle aufnimmt. Bei dem Fehlen dieser Funktion, wie z.B. unter Kokain Einfluß, würde es zu einer Übererregung und damit zu Psychosen kommen (Nestler, 2005; Schmitz, Benoit-Marand et al., 2003).

Th - spaltet Tyrosin in L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) und ist biochemisch gesehen das ratenlimitierende Enzym für die Synthese von Dopamin aus L-DOPA. Da aber Noradrenalin und Adrenalin auf demselben biochemischen Weg (über Dopamin) hergestellt werden, ist Th kein absoluter und sicherer Marker für DA Neuronen (Goridis & Rohrer, 2002). Im Locus coeruleus ist Th beispielsweise ein Marker für noradrenerge Neuronen. Der Nachweis von Th allein reicht demnach nicht

aus, um mDA Neuronen zu markieren. Die Zellen müssen zusätzlich Dopamin-beta-Hydroxylase (Dbh) negativ sein oder andere DA Marker (wie z.B. Pitx3) exprimieren. Pitx3 - ein Transkriptionsfaktor der ausschließlich im ventralen Mittelhirn (vMH) mDA Neuronen markiert (Korotkova, Ponomarenko et al., 2005).

In vitro wurde gezeigt, dass Wnt1 - aber auch Wnt3a und Wnt5a – Nr4a2⁺ (Nr4a2 positive) Vorläuferzellen erhalten, aber nur Wnt1 und Wnt5a die Ausdifferenzierung dieser Zellen in Th⁺ Neuronen unterstützen, während Wnt3a dies eher inhibiert (Castelo-Branco, Wagner et al., 2003). Weiterhin war bekannt, dass Shh und Fgf8 mDA Neuronen in *in vitro* kultivierten embryonalen Explantatkulturen ektopisch induzieren können (Smidt & Burbach, 2007; Ye, Shimamura et al., 1998). Ergebnisse von Prakash (Prakash, Brodski et al., 2006) machen aber deutlich, dass dies in Abwesenheit von Wnt1 nicht möglich ist.

Ein grundlegendes Experiment für die vorliegende Arbeit war die *En1*^{+Wnt1} Mutante (*knock-in* von *Wnt1* cDNA in den *En1* lokus), an der gezeigt werden konnte, dass Wnt1 ausreichend ist, um DA Neuronen im ventralen Hinterhirn im Bereich der Engrailed1 exprimierenden Region zu entwickeln. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Wnt1 notwendig ist, um mDA Neuronen im Mittelhirn zu generieren (Prakash, Brodski et al., 2006), vermutlich indem es im vMH Shh reprimiert (Joksimovic, Yun et al., 2009).

Es wird angenommen, dass Wnt1 *in vivo* zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung der mDA Neuronen eine essentielle Rolle spielt.

Zum Einen wird Wnt1 in frühen Stadien zur Aufrechterhaltung eines genetischen Netzwerks (Abb. 3) gebraucht, das für die Etablierung der mDA Domäne im Neuralrohr verantwortlich ist. Diese erste frühe Phase von E9.5 bis E10.5 kann auch als Induktionsphase für mDA Neuronen bezeichnet werden. Dabei erhalten sich Wnt1 und Otx2 gegenseitig in der ventralen Region (Bodenplatte). Otx2 reprimiert zudem die Nkx2.2 Expression im dorsalen Bereich der Basalplatte (McMahon, Joyner et al., 1992; Prakash, Brodski et al., 2006; Prakash & Wurst, 2007; Puelles, Annino et al., 2004).

Zum Anderen könnte Wnt1 für die korrekte Ausdifferenzierung (ab E12.5) von mDA Neuronen notwendig sein, indem es den Transkriptionsfaktor Pitx3 möglicherweise direkt reguliert (Prakash, Brodski et al., 2006). Pitx3 wiederum kontrolliert die Entstehung einer Subpopulation der mDA Neuronen, nämlich der SNc (Maxwell, Ho et al., 2005), die auch bei Parkinson-Patienten zuerst degeneriert.

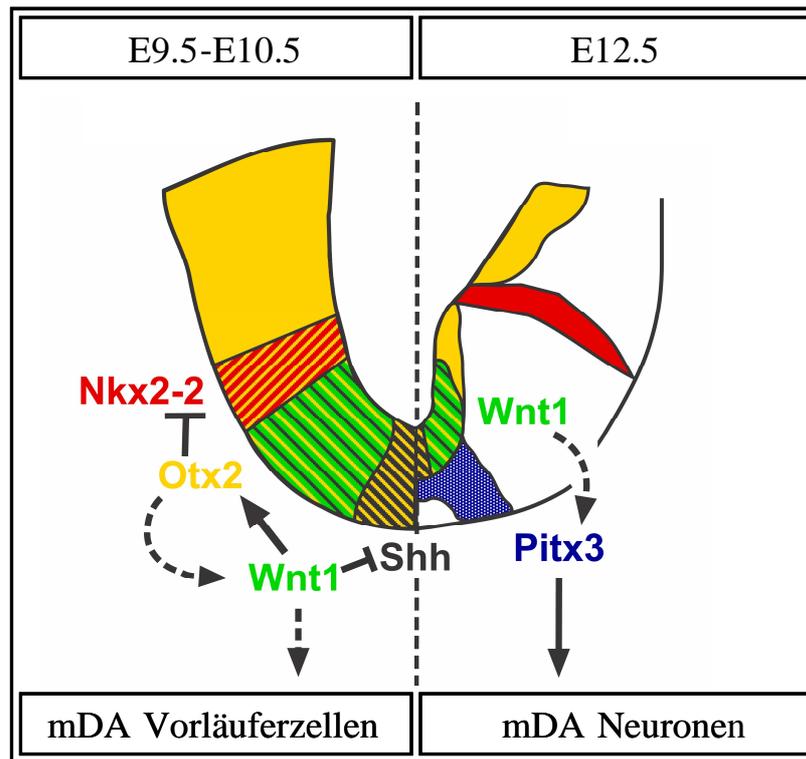


Abb. 3: Coronalchnitt (nur ventraler Teil) im caudalen Mittelhirn (MH). Links (E9.5-E10.5): Wnt 1 (grün) und Shh (schwarz) sind im ventralen Bereich exprimiert, jedoch ist in der Mittellinie der Bodenplatte nur Shh zu finden. Otx2 (gelb) ist ubiquitär vorhanden, an der Alar-Basalplattengrenze überlappt es mit Nkx2.2 (rot). Während Otx2 und Wnt1 sich gegenseitig erhalten, hemmt Otx2 zudem Nkx2.2. Rechts (E12.5): Shh (schwarz) und Wnt1 (grün) überlappen mit Otx2 (gelb) in der Ventrikulär- und Subventrikulärzone der Bodenplatte und ventralen Basalplatte. Nkx2.2 (rot) ist an der Grenze zwischen Basalplatte und Alarplatte, an der Stelle an der wenig Otx2 Protein festgestellt werden konnte, exprimiert. Möglicherweise (gestrichelte Linie) reguliert Wnt1 Pitx3 direkt. Abb. modifiziert aus Prakash, Brodski et al., 2006.

Diese Differenzierungsphase hält bis zur Geburt und auch darüber hinaus an. Die Geburt erfolgt je nach Mauslinie in der Regel um E18.5. Nach der Geburt erfolgt eine Selektion der Neuronen durch aktivitätsabhängiges Überleben, selten verwendete Signalpfade degenerieren (Synapsenrückbildung), während viel genutzte ausgebaut werden. Im adulten Stadium wird davon ausgegangen, dass die Neuronenzahl in der ersten Lebenshälfte in etwa gleich bleibt und es erst in der zweiten Lebenshälfte zu einer Verringerung der Neuronenzahl kommt (Vernier, Moret et al., 2004).

Im Folgenden wird zunächst auf den, bei der Entstehung der mDA Neuronen beteiligten, kanonischen Wnt Signalweg eingegangen.

2.4. Kanonischer Wnt Signalweg

Wnt1 spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von mDA Neuronen, deshalb wird nun näher auf diesen Liganden eingegangen. Wnt Signalmoleküle lassen sich im gesamten Tierreich finden. Im Taxon der Säuger gibt es 19 Wnt Liganden. Die Wnt Proteine können an verschiedene Rezeptoren wie Fzd (frizzled), Lrp5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein), Ryk (receptor-like tyrosine kinase) und Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2), binden und somit mindestens drei verschiedene Signalwege ansteuern (Moon, Kohn et al., 2004; van Amerongen, Mikels et al., 2008). Diese sind der kanonische β -Catenin Signalweg, der nichtkanonische Ca^{2+} Signalweg und der nichtkanonische planare Zellpolarität (engl.: planar cell polarity, PCP) Signalweg. Wobei die Spezifität des Signalwegs nicht unbedingt durch den Rezeptor gegeben ist. Einige Rezeptoren und Liganden können also bestimmten Wegen zugeordnet werden, vieles ist aber noch unklar. So werden einige Wnt-Liganden als kanonisch bezeichnet (z.B. Wnt1, Wnt3a und Wnt8), andere als nichtkanonisch (z.B. Wnt4, Wnt5a, Wnt11) (Andersson, Prakash et al., 2008). Nach aktuellem Stand der Forschung ist es durchaus möglich, dass es Wnt Liganden gibt, die auch über verschiedene Signalwege arbeiten (Andersson, Prakash et al., 2008; van Amerongen, Mikels et al., 2008). Die Bekannteste ist die so genannte kanonische Wnt-Signalkaskade, über die vermutlich auch Wnt1 signalisiert.

Eine genaue Kenntnis der durch Wnt1 regulierten genetischen Signaltransduktionskaskade hat, auf Grund der oben angedeuteten Verbindung zu Parkinson, auch klinische Relevanz.

Im kanonischen Wnt Signalweg (Abb. 4) bindet Wnt1 an den Frizzled sieben-transmembran Rezeptor und Lrp5/6 Co-Receptor. Dies führt zu einer Aktivierung einer Phosphorylierungskaskade (z.B. Lrp5/6) und Rekrutierung des Axin/Gsk3 β /Casein Kinase- Komplexes an die Zellmembran durch Bindung von Lrp5/6. Dadurch wird die Phosphorylierung von β -Catenin verhindert und dies führt somit zu der Stabilisierung des cytosolischen β -Catenins. β -Catenin kann dadurch in den Zellkern transloziert werden, wo es zusammen mit weiteren Faktoren der Lymphoid-enhancer factor (Lef)/ T-cell factor (Tcf)- Familie die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Zielgene bewirkt (Moon, Kohn et al., 2004).

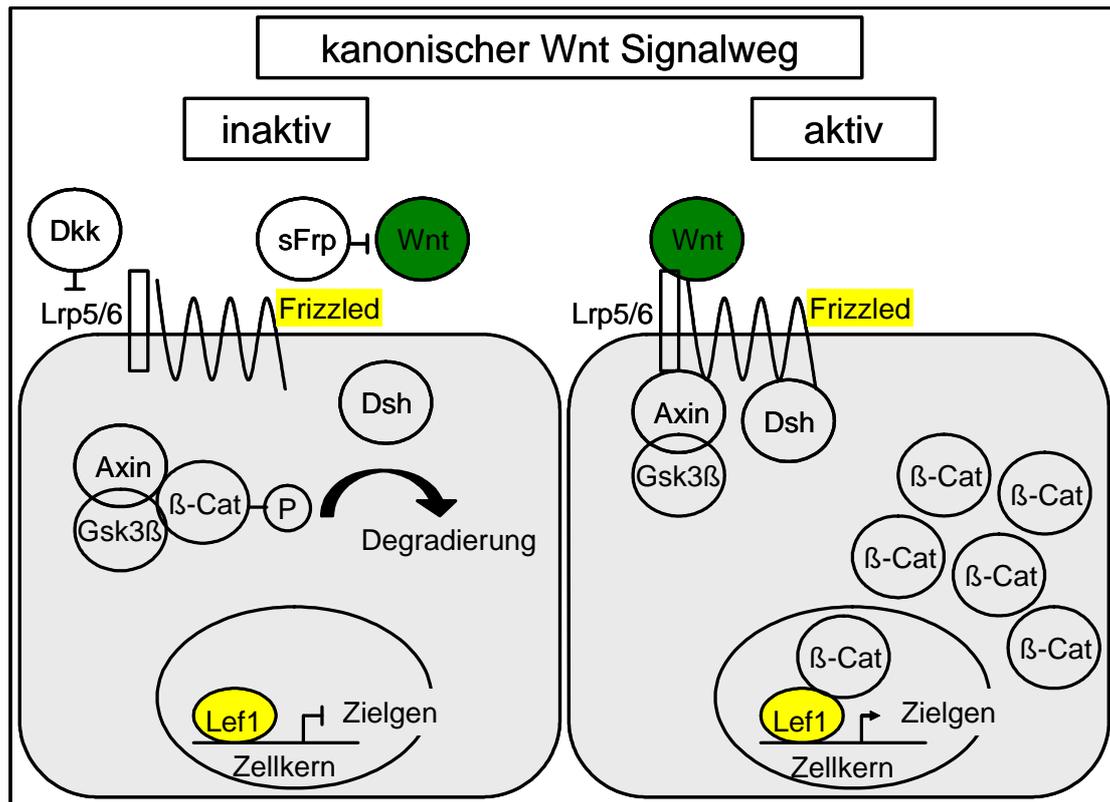


Abb. 4: Kanonischer Wnt Signalweg. Im linken Bild ist Wnt noch nicht an den Fzd Rezeptor gebunden. DKK (Dickkopf) und sFRP (secreted Frizzled-related Protein) wirken als Inhibitoren. β -Catenin wird demnach vom Axin/ Gsk3 β Komplex phosphoryliert und degradiert, es handelt sich dabei um Ubiquitin vermittelten Proteasomabbau. Im rechten Bild bindet Wnt an Fzd, über Dsh wird der gesamte Axin/ Gsk3 β Komplex an die Membran gebunden. Dadurch kann β -Catenin nicht mehr abgebaut werden, akkumuliert im Zytoplasma und gelangt schließlich in den Zellkern. Dort bindet es an Transkriptionsfaktoren (z.B. Lef1, welches sonst als Repressor wirkt) und aktiviert so Zielgene. Abb. nach Moon, Kohn et al., 2004.

2.4.1. Frizzled Rezeptoren

Die Frizzled Rezeptoren bilden eine Familie von sieben-Transmembran-Domänen Proteinen. Wnt bindet an die N-terminale extrazelluläre Cystein reiche Domäne (CRD) der Frizzled Rezeptoren. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Frizzled Rezeptoren besonders im C-terminalen Teil (Huang & Klein, 2004; Wang, Macke et al., 1996).

Einige Fzd Rezeptoren wurden bisher *in vitro* aber auch *in vivo* analysiert. Fzd1 und Fzd2 sind vermutlich am Brustkrebswachstum beteiligt (Milovanovic, Planutis et al., 2004). Zu Fzd3 ist bekannt, dass dieser Rezeptor für das generelle Wachstum und das Richtungswachstum von Axonen zuständig ist (Wang, Thekdi et al., 2002; Wang, Zhang et al., 2006). Zudem wurde der *FZD3* Locus, kontrovers diskutiert, mit

Schizophrenie in Verbindung gebracht (Hashimoto, Suzuki et al., 2005; Katsu, Ujike et al., 2003; Wang, Thekdi et al., 2002; Wang, Zhang et al., 2006; Yang, Si et al., 2003). Fzd4 ist nötig für die Entwicklung der Neuronen des Cerebellum sowie für die Entwicklung des Oesophagus. Außerdem weist die Mutante einen Hörverlust auf (Wang, Huso et al., 2001). Fzd5 ist für die Augenentwicklung sowie die Angiogenese des Dottersacks und der Plazenta notwendig (Ishikawa, Tamai et al., 2001; Liu, Wang et al., 2008). Fzd6 spielt eine Rolle bei der Haarmusterbildung (Guo, Hawkins et al., 2004). Die *Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-}* Doppelmutante weist Defekte während der Schließung des Neuralrohrs auf. *Fzd3^{+/-}/Fzd6^{-/-}* Männchen zeigen eine reduzierte Anzahl an Spermien (Wang, Guo et al., 2006). Während Fzd9 bei der Entwicklung des Hippocampus und der B-Lymphozyten eine Rolle spielt, ist Fzd10 vermutlich über den kanonischen Wnt Signalweg an der Bildung von Darmkrebs beteiligt (Ranheim, Kwan et al., 2005; Terasaki, Saitoh et al., 2002; Zhao, Aviles et al., 2005). Es gibt Hinweise dafür, dass diese Rezeptoren mehrere Signalwege bedienen aber auch dafür, dass sie nur über einen bestimmten Signalweg arbeiten. So können Fzd3, Fzd4 und Fzd5 eventuell sowohl über den kanonischen als auch über den nicht kanonischen Wnt Signalweg weiterleiten (Burns, Zhang et al., 2008). Möglicherweise entscheidet das Zusammenspiel bzw. die Kombination aus Fzd-Rezeptor und Wnt- Ligand welcher Signalweg benutzt wird (Mikels & Nusse, 2006; van Amerongen, Mikels et al., 2008).

In der Maus sind insgesamt zehn Frizzled Rezeptoren bekannt. Um zu erfahren welche davon an der Entwicklung der mDA Neuronen beteiligt sein könnten, wurde eine genaue Kartierung der Expression aller zehn bisher bekannten Fzd-Rezeptoren im Mausembryo während der relevanten Entwicklungsstadien durchgeführt (Fischer, 2006; Fischer, Guimera et al., 2007). Sechs davon sind im ventralen Mittelhirn präsent wenn Vorläuferzellen von DA Neuronen (im Stadium E10.5) entstehen. Aufgrund dieser Analyse wurden drei Fzd-Rezeptoren (Fzd3, Fzd6 und eventuell Fzd9) als Kandidaten für die Transduktion des Wnt1-Signals während der Entwicklung der mDA Neuronen eingegrenzt. *Fzd3* ist ubiquitär im gesamten Neuralrohr vorhanden. Lediglich *Fzd6* zeigt, neben einer leichten Expression im Mesenchym, eine auf die mesencephale Flexur - rostral der MHG - begrenzte Expression (Abb. 5, B).

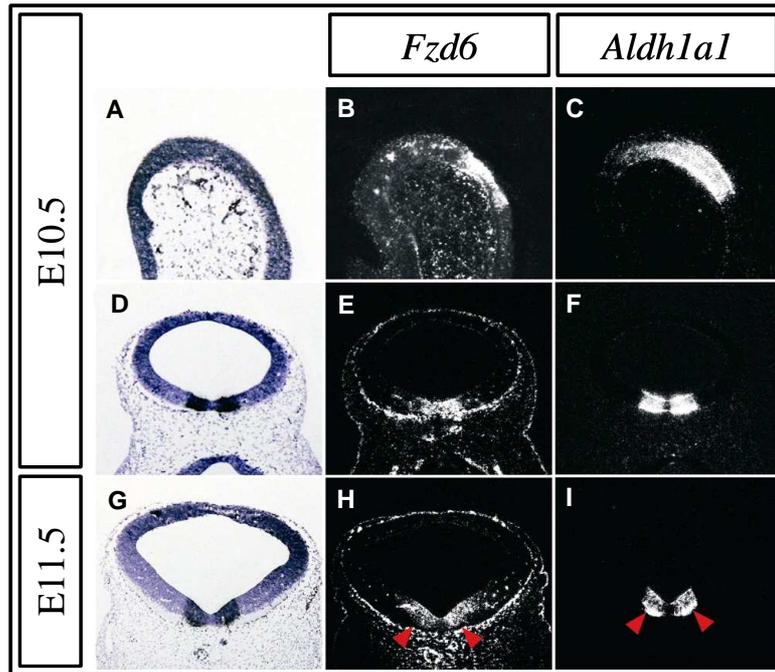


Abb. 5: Überlappende Expressionen von *Fzd6* (B, E und H) und *Aldh1a1* (C, F und I) in der mesencephalen Flexur der Stadien E10.5 und E11.5. Die Hellfeldaufnahmen (A, D und G) entsprechen den Dunkelfeldaufnahmen von *Aldh1a1*. Sagittalschnitte in A, B und C. Coronalschnitte in D-I. Pfeilspitzen in H und I deuten darauf hin, dass *Aldh1a1* nicht nur in der Ventrikulärzone/ Subventrikulärzone (*Fzd6*⁺) sondern auch in der Mantelzone vorhanden ist. Abb. aus Fischer, 2006.

Fzd1, *Fzd2*, *Fzd7* und *Fzd9* zeigen auf Mitsagittalschnitten eine Expressionslücke die sehr spezifisch mit *Fzd6* überlappt (Fischer, Guimera et al., 2007). Im lateralen Bereich zeigt *Fzd9* eine teilweise Überlappung mit *Fzd6*. Dieses legt eine übergeordnete Rolle von *Fzd6* in der Transduktion des Wnt Signals in der caudalen mesencephalen Flexur nahe.

Ebenso wurde gezeigt, dass *Fzd6* mit der Expression von *Aldh1a1*, Marker für Vorläuferzellen von DA Neuronen (Wallen, Zetterstrom et al., 1999), in den Stadien E10.5 und E11.5 überlappt (Abb. 5). Weiterhin weist *Fzd6* eine Überlagerung mit der Expression von *Wnt1* im Stadium E10.5 auf (Fischer, Guimera et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass *Fzd6* in dieser Region das Wnt Signal für die Entwicklung von mDA Neuronen weiterleiten könnte.

2.4.2. Intrazelluläre Komponenten im kanonischen Wnt Signalweg

Zurzeit sind mehr als 60 Faktoren bekannt, die im kanonischen Wnt Signalweg eine Rolle spielen. Im Folgenden wird kurz auf einige wesentliche Komponenten eingegangen.

Dsh - Dishevelled - ein Protein, welches an verschiedenen Stellen innerhalb einer Zelle vorkommen kann und auch Funktionen im kanonischen Wnt Signalweg übernimmt. Interaktionen mit Axin sind eventuell über die DIX Domäne möglich (Hsu, Zeng et al., 1999).

Gsk3 β – Glykogen Synthase Kinase 3 β - kann von LiCl geblockt werden (Hedgepeth, Conrad et al., 1997). Dabei blockieren Li-Ionen das katalytische Zentrum von Gsk3 β und verhindern somit die Phosphorylierung von β -Catenin. Dadurch kann β -Catenin im Zytoplasma akkumulieren und so der kanonische Wnt Signalweg induziert werden (Kioussi, Briata et al., 2002; Williams, Ryves et al., 2004).

Axin – ein Gerüstprotein, welches mit β -Catenin und Gsk3 β (sowie vielen anderen Proteinen) einen Komplex bildet, so dass dieses β -Catenin phosphorylieren kann.

Apc - Adenomatous Polyposis coli - ist über den Axin/Gsk3 β Komplex an der β -Catenin Degradierung beteiligt.

β -Catenin – kann im Zellkern an Lef/Tcf binden sowie Cadherine über α -Catenin (Eastman & Grosschedl, 1999).

Bcl-9 - B-cell lymphoma 9 protein - bindet an β -Catenin und transloziert es in den Zellkern. Zusammen mit Pygopus ist es als Aktivator der β -Catenin abhängigen Transkription zu sehen (Kramps, Peter et al., 2002).

Pygopus - ein plant homeodomain (PHD) finger domain Protein, ist an der Aktivierung von Zielgenen durch β -Catenin im Wnt Signalweg beteiligt.

Lef1 - lymphoid enhancer binding factor 1 – ist ein Transkriptionsfaktor, der die Aktivierung von Genen, welche durch den kanonischen Wnt Signalweg angesteuert werden, bewirkt. Es gibt insgesamt 4 verschiedene Tcf/Lef Faktoren in der Maus. Wobei nur *Lef1* und nicht *Tcf1* im ventralen Mittelhirn (Oosterwegel, van de Wetering et al., 1993) und auch *Tcf3* und *Tcf4* vermutlich nur im Vorderhirn (Galceran, Farinas et al., 1999) zu finden sind.

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung von regenerativen Therapien für Parkinson Patienten baut vor allem auf das Wissen der Entstehung von mDA Neuronen der SN und VTA auf. Um die Weiterleitung des dafür nötigen Wnt1 Signals im ventralen Mittelhirn zu analysieren wurde aufgrund der vorliegenden Daten (Fischer, Guimera et al., 2007) zunächst der Fzd6 Rezeptor in den Fokus genommen und die *Fzd6 ko* Maus untersucht (s. 3.1.). Sollte sich dieser Rezeptor als essentiell für die Entstehung von mDA Neuronen herausstellen, so wäre eine „small compound“ Therapie denkbar (Zhang, Smith et al., 2005). Dabei wird ein Aktivator bzw. Ligand für diesen Rezeptor identifiziert und kann dann, vorerst *in vitro*, wenn erfolgreich später auch am Patienten, appliziert werden.

Da die *Fzd6 ko* Maus keinen, im Vergleich zum *wt* veränderten Phänotyp aufwies, wurde anschließend die *Fzd3 ko* Maus (s. 3.2.) und schließlich die *Fzd3/Fzd6 Doppel ko* Maus (s. 3.3.) als erster Schwerpunkt dieser Arbeit analysiert. Im Wesentlichen wurden dabei die Expressionen der oben erwähnten Marker (Nr4a2, Aldh1a1, Pitx3, Th und Slc6a3) in den Stadien E10.5 - E17.5 eruiert.

Eine weitere Möglichkeit für die induzierte Entstehung von mDA Neuronen liegt, wie zuvor beschrieben, in der intrazellulären Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Die Literaturrecherche, sowie die hier durchgeführte *Lef1* Expressionstudie, ergaben einen Hinweis auf die Relevanz von Lef1 im kanonischen Wnt Signalweg. Um dies *in vivo* zu überprüfen, wurde die *Lef1 ko* Maus als zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit näher betrachtet.

Des Weiteren konnten durch bioinformatische Analysen in der Promoterregion des Maus *Pitx3*-Gens mehrere Bindestellen für die Lef/ Tcf-Faktoren festgestellt werden, die z.T. auch zwischen dem *Pitx3*-Gen der Maus, der Ratte und des Menschen konserviert sind. Eine evolutionäre Konservierung solcher Bindestellen weist auch auf eine funktionelle Relevanz hin.

Um die Bindung von Lef1 in der Promoterregion vom *Pitx3* Gen nachzuweisen, wurde ein *in vivo* CHIP assay durchgeführt (siehe 3.4.3.).

Die Funktionalität der Bindung von Lef1 an den *Pitx3* Promoter sollte ein Promoterassay klären. Für andere Zielgene wurde kürzlich in HEK-293 Zellen gezeigt, dass β -Catenin und Lef1 zusammen eine sehr starke Aktivierung des

folgenden Promoters ergeben (Lin, Cui et al., 2007). Dies sollte hier für das *Pitx3* Gen geprüft werden.

Wie oben erwähnt, wird im kanonischen Wnt Signalweg, mit Hilfe von β -Catenin - welches an Tcf/Lef Transkriptionsfaktoren bindet - das Wnt-Signal weitergeleitet. Die Tatsache, dass Wnt1 ausreichend ist, um *Pitx3*/Nr4a2/Th-positive, dopaminerge Neuronen im Hinterhirn zu erzeugen und dass in der *Wnt ko* Maus die Th positiven Neuronen reduziert sowie *Pitx3* nicht mehr exprimiert ist, gibt Hinweise darauf, dass *Pitx3* ein direktes Zielgen von Wnt1 sein kann (Prakash, Brodski et al., 2006; S. Zhao, Maxwell et al., 2004). Dies sollte anhand der *Pitx3^{+/Gfp}* Maus durch die Aktivierung des kanonischen Wnt Signalwegs mit Hilfe von LiCl, und damit der Transkription des *Pitx3* Gens bestätigt werden.

3. Ergebnisse

Das Glykoprotein Wnt1 ist notwendig und ausreichend, um dopaminerge Neuronen zu generieren. Wie oben beschrieben bindet Wnt an Fzd Rezeptoren, um im kanonischen Wnt Signalweg über β -Catenin das Signal weiterzuleiten. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass Fzd6 zur richtigen Zeit (E10.5 – E12.5) am richtigen Ort (mesencephale Flexur, rostral der MHG) exprimiert ist. Damit kann Fzd6 der Rezeptor sein, der in der mesencephalen Flexur das Wnt1 Signal weiterleitet. Aufgrund dieser Expressionsanalyse wurde zuerst die *Fzd6 ko* Maus untersucht.

3.1. mDA Neuronen werden in Abwesenheit von Fzd6 induziert

3.1.1. Analyse von mDA Neuronen in der Spezifikationsphase E10.5 im *Fzd6 ko*

Die Hypothese für die folgenden zwei Experimente im Stadium E10.5 war, dass Fzd6 zu diesem Zeitpunkt aufgrund seiner sehr spezifischen Expression in der mesencephalen Flexur rostral der MHG einseitig Einfluß auf deren Ausbildung hat und andererseits die beginnende Entwicklung von mDA Neuronen gestört oder vollständig verhindert wird. Im Stadium E10.5 beginnt die Entwicklung von mDA Neuronen. Zu diesem Zeitpunkt sind erstmalig Vorläuferzellen sicher mit den Markern *Nr4a2* und *Aldh1a1* detektierbar.

Somit wurden die Expressionen der mRNA der Marker *Nr4a2* und *Aldh1a1* auf konsekutiven Sagittalschnitten (Abb. 6) untersucht. Sie sind beim *ko* (*Fzd6^{-/-}*) im Vergleich zum *wt* (*Fzd6^{+/+}*) unverändert. Die Expression der mRNA von *Nr4a2* in der mesencephalen Flexur von *wt* und *ko* beginnt im Diencephalon und endet etwas rostral der MHG. In diesem Bereich überlappt sie mit der Expression von *Aldh1a1*, diese reicht jedoch caudal bis zur MHG. Beide Marker sind in der Subventrikulärzone (SVZ) und *Aldh1a1* auch in der Ventrikulärzone (VZ) zu finden.

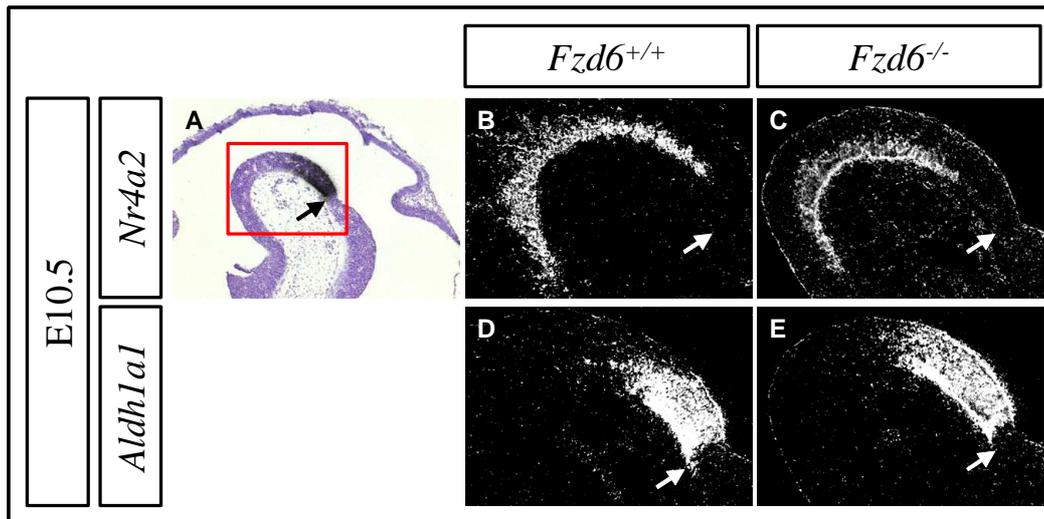


Abb. 6: Sagittalschnitte mit Expression der mRNA von *Nr4a2* (*wt*: B, *ko*: C) und *Aldh1a1* (*wt*: D, *ko*: E) im Embryonalstadium E10.5 (n = 3). *Nr4a2* ist in der SVZ zu finden, *Aldh1a1* dagegen auch in der VZ. Die Expressionen sind unverändert zwischen *ko* und *wt*. A ist die Hellfeldaufnahme der Mesencephalonregion (rostral nach links), die rote Box markiert die mesencephale Flexur, dieser Bereich ist in B – E vergrößert dargestellt. Der Pfeil in diesen Bildern deutet auf die MHG.

Da *Fzd6* nahe der MHG exprimiert wird, wäre es möglich, dass *Fzd6* eine Auswirkung auf die Formation des Isthmus hat. Dieser Frage sollte mit Hilfe der mRNA Expression von *Wnt1*, *Shh*, *Fgf8* und *Gbx2* nachgegangen werden.

Dabei zeigte sich eine unveränderte Ausbildung der MHG im *Fzd6 ko* im Stadium E10.5 (Abb. 7).

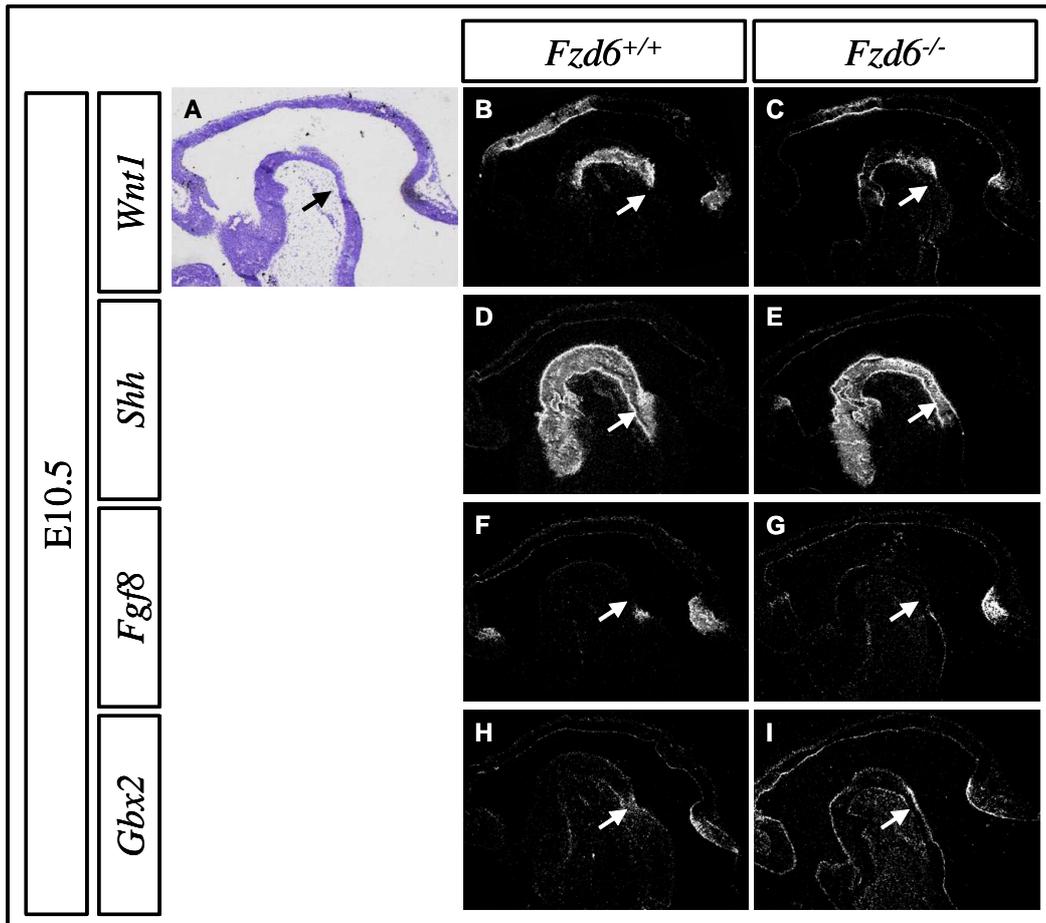


Abb. 7: Expression der mRNA von *Wnt1* (B, C), *Shh* (D, E), *Fgf8* (F, G) und *Gbx2* (H, I) im Embryonalstadium E10.5 auf Sagittalschnitten (n = 4). Kein wesentlicher Unterschied zwischen *wt* und *ko* ersichtlich. *Wnt1* ist im ventralen Bereich der Flexur, bis an die MHG (dort ringförmig) exprimiert, im dorsalen Bereich erscheint die Expression weiter rostral lokalisiert. *Shh* markiert die Bodenplatte in der gesamten Flexur. *Fgf8* ist caudal der MHG zu lokalisieren, ebenso *Gbx2*, welches aber breiter exprimiert ist. In A ist die Hellfeldaufnahme gezeigt, rostral nach links. Der Pfeil deutet jeweils auf die MHG.

Die Expression von *Wnt1* ist sowohl im ventralen Teil der Flexur festzustellen als auch dorsal im Bereich der MHG, sowie weiter rostral bis ins Diencephalon. *Shh* ist in der gesamten mesencephalen Flexur exprimiert, wogegen *Fgf8* und *Gbx2* nur weiter caudal zu detektieren sind.

Somit ist im Stadium E10.5 im *Fzd6 ko* kein veränderter Phänotyp zum *wt*, in Bezug auf die Entwicklung von mDA Neuronen, festzustellen.

3.1.2. Analyse der mDA Neuronen in der Differenzierungsphase E12.5 im *Fzd6 ko*

Da die mDA Neuronen also erfolgreich induziert werden bestand zunächst die Frage, ob diese Vorläuferzellen im *Fzd6 ko* auch ausdifferenzieren. Bereits im Stadium E11.0 ist es möglich ausdifferenzierte dopaminerge Neuronen zu detektieren. Bei dem Vergleich der Expressionen von *Slc6a3*, *Nr4a2*, *Pitx3* und *Th* im Stadium E12.5 (Abb. 8) konnte festgestellt werden, dass sich *wt* und *ko* nicht unterscheiden.

Dieses Ergebnis konnte durch die zusätzliche IHC (Abb. 9) für die Marker *Pitx3* und *Th* bestätigt werden. Die Expression von *Pou4f1*, ein Marker für Neuronen des Nucleus ruber, ist gleichsam im *wt* und *ko* ausgeprägt.

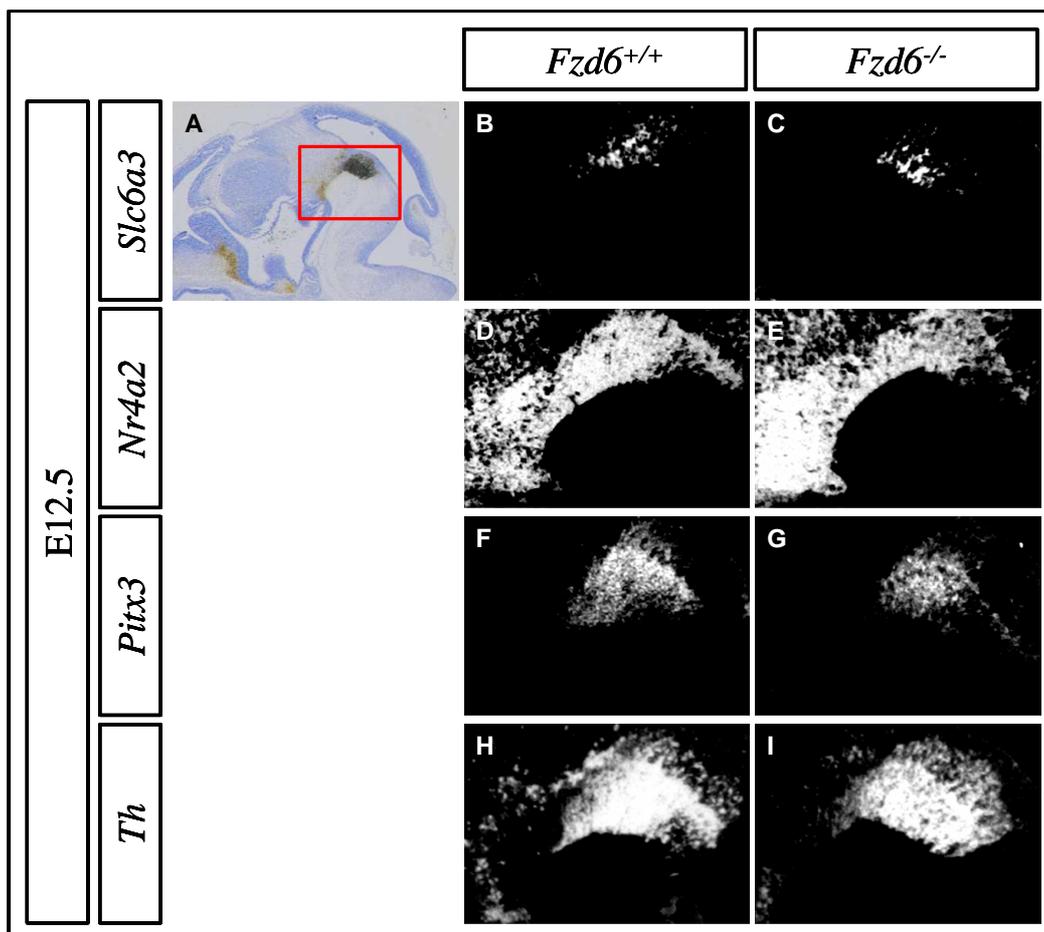


Abb. 8: Expressionen der mRNA von *Slc6a3* (B, C), *Nurr1* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) im Embryonalstadium E12.5 auf Sagittalschnitten (n = 3). In der Übersichtsaufnahme (A) ist mit roter Box der Bereich der Vergrößerungen markiert. Rostral weist nach links. Sowohl *Slc6a3* und *Nr4a2* als auch *Pitx3* und *Th* sind in beiden Genotypen gleich exprimiert.

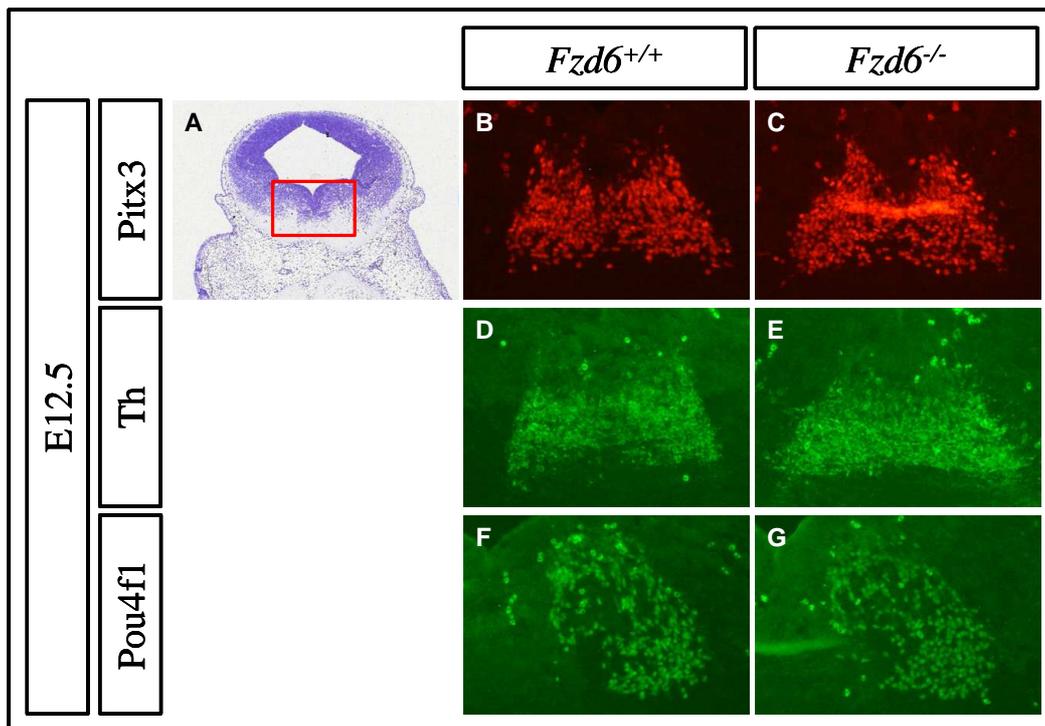


Abb. 9: Coronalschnitte mit Expression der Proteine von Pitx3 (B, C), Th (D, E) und Pou4f1 (F, G) im Embryonalstadium E12.5 (n = 3). In der Übersicht (A) und in den Vergrößerungen (rote Box in A) weist dorsal nach oben. Beide Genotypen zeigen den gleichen Phänotyp. Die Expression von Pitx3 (B, C) und Th (D, E) überlappen im *wt* und im *ko*. F und G zeigen nur die rechte Hälfte der ventralen Region.

3.1.3. Analyse der mDA Neuronen in der Erhaltungsphase E17.5 im *Fzd6 ko*

Nachdem die mDA Vorläuferzellen auch in *Fzd6 ko* Embryonen ausdifferenzieren, geht es nun um die Frage ob die Neuronen in den Mutanten überleben. Deshalb wurde für die Erhaltungsphase das Stadium E17.5 auf mDA Neuronen hin untersucht. Die Ergebnisse der ISH von *Slc6a3* (Abb. 10; B, C), *Nurr1* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) auf Sagittalschnitten im Stadium E17.5 weisen ebenfalls keine Veränderung zwischen *wt* und *ko* auf.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der IHC für Pitx3 (B, C) und Th (D, E) dargestellt. Auf den Schnitten ist kein Unterschied in der Proteinexpression zwischen den verschiedenen Genotypen erkennbar.

Zusammengefasst lässt sich hier feststellen, dass der Fzd6 Rezeptor nicht für die Entwicklung (Spezifizierung, Differenzierung und Erhaltung) von mDA Neuronen notwendig erscheint. In den drei untersuchten Embryonalstadien (E10.5, E12.5 und E17.5) konnten sämtliche Marker für mDA Neuronen oder deren Vorläuferzellen sowohl im *wt* als auch im *Fzd6 ko* detektiert werden.

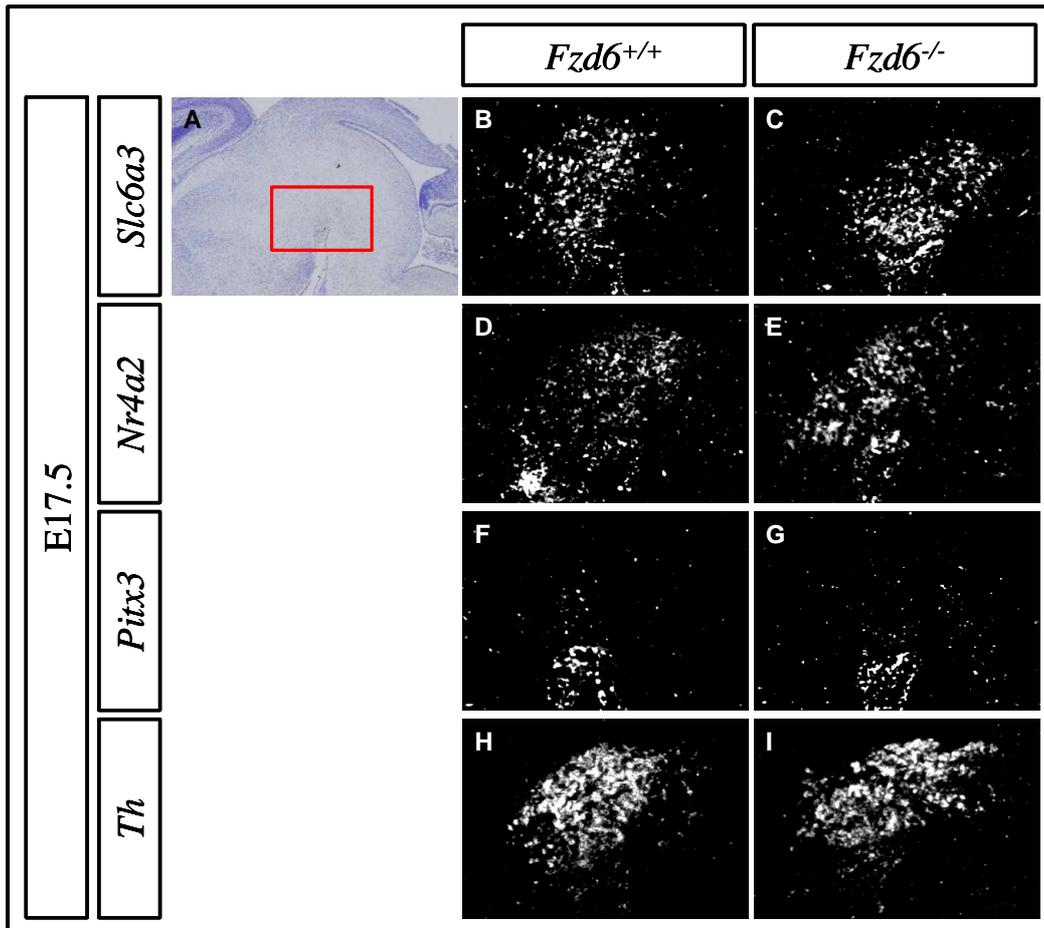


Abb. 10: Expression der mRNA von *Slc6a3* (B, C), *Nurr1* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) im Embryonalstadium E17.5 auf Sagittalschnitten von *wt* und *ko* (n = 3). A zeigt die Hellfeldaufnahme (rostral nach links) mit roter Box der vergrößerten Region in B – I. Die Expressionen aller hier verwendeten Marker sind sowohl von der Lokalisation als auch der Intensität her zwischen den Genotypen gleich.

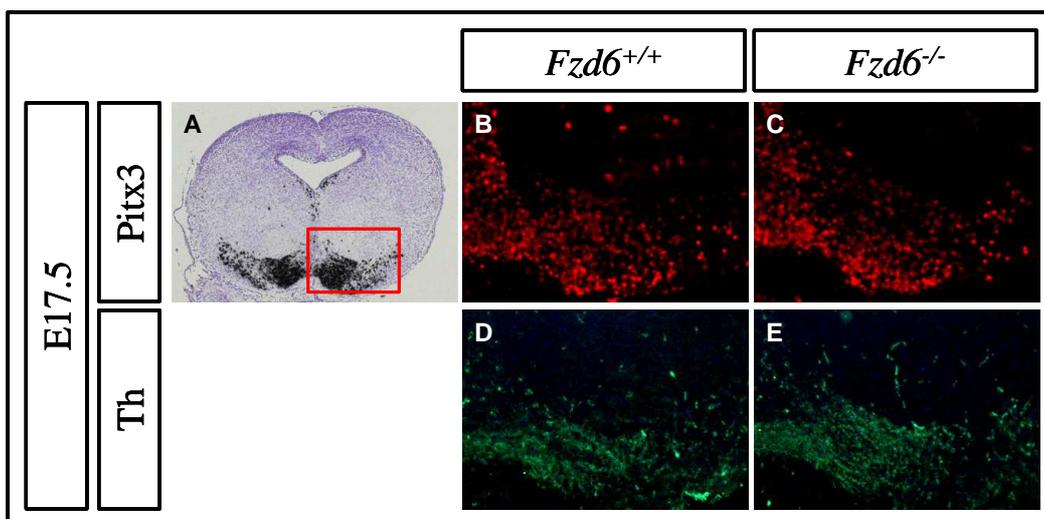


Abb. 11: IHC auf Coronalen Schnitten des Stadiums E17.5 (n = 3). Hellfeldaufnahme (A) zeigt rote Box der Vergrößerungen. Dorsal weist jeweils nach oben. Antikörperfärbung für *Pitx3* (B, C) und *Th* (D, E). *Wt* und *ko* zeigen gleiche Expressionen.

3.2. mDA Neuronen werden in Abwesenheit von Fzd3 induziert

Da in der *Fzd6 ko* Maus die mDA Neuronen sich normal entwickeln, könnte eine Redundanz mit Fzd3 vorliegen. Fischer (Fischer, 2006) zeigte in einer Studie, dass *Fzd3* im gesamten Neuralrohr vorhanden ist. Somit gab es eine Wahrscheinlichkeit das Fzd3 der Rezeptor ist, der das Wnt1 Signal in der zu untersuchenden Region weiterleitet. Deshalb wurde im Folgenden der *Fzd3 ko* in die Analyse einbezogen. Hier sind die Daten der zwischen E10.5 und E17.5 untersuchten Stadien vorgestellt.

3.2.1. Analyse der mDA Neuronen in der Spezifikationsphase E10.5 im *Fzd3 ko*

Zu Beginn der Reifung des Mittelhirns - in der Spezifikationsphase E10.5 - ist es möglich bereits Vorläuferzellen der dopaminergen Neuronen zu erkennen (Abb. 12). Hierzu wurden die Marker *Aldh1a1* und *Nr4a2* verwendet. Beide sind in diesen Vorläuferzellen exprimiert und konnten mit Hilfe von ISH nachgewiesen werden. Im Stadium E10.5 konnte beim Vergleich zwischen *wt* (*Fzd3^{+/+}*) und *ko* (*Fzd3^{-/-}*) kein Unterschied sowohl bei der Expression von *Nr4a2* als auch bei *Aldh1a1* festgestellt werden.

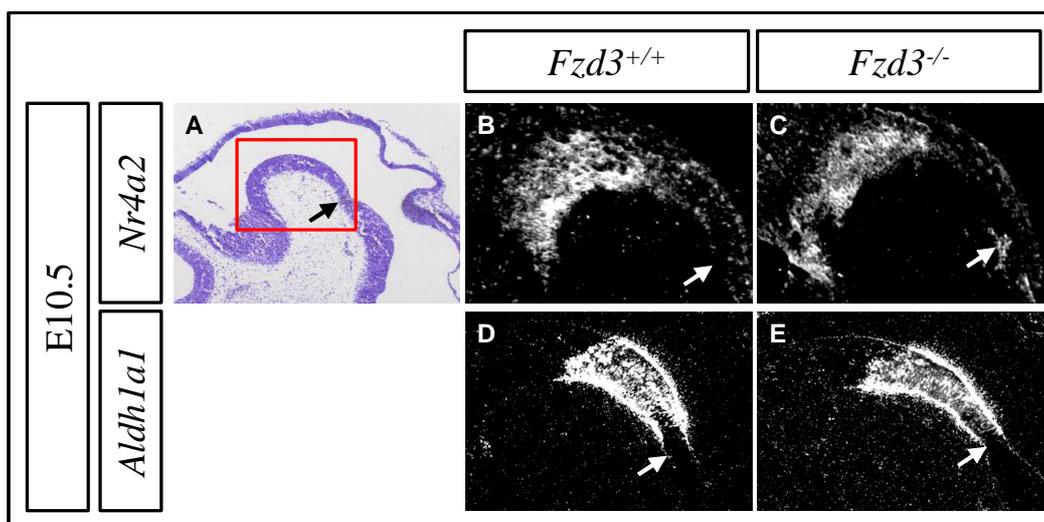


Abb. 12: Sagittalschnitte mit Expression der mRNA von *Aldh1a1* (B, C) und *Nr4a2* (D, E) im Embryonalstadium E10.5 (n = 3). A zeigt die Übersichtsaufnahme, die rote Box markiert den Bereich der Vergrößerungen. Rostral weist nach links. Die Expressionen waren unverändert zwischen *wt* und *ko*. Der Pfeil in B – E weist auf die MHG.

3.2.2. Leichte Verbreiterung der mDA Neuronen Domäne im Stadium E12.5 im *Fzd3 ko* nur coronal sichtbar

Im Stadium E12.5 wurden mit Hilfe von ISH die Expression der mRNA von *Slc6a3*, *Nr4a2*, *Pitx3* und *Th* nachgewiesen. Dabei zeigte sich wiederum, dass sich die Expressionsmuster auf Sagittalschnitten zwischen *wt* und *ko* nicht unterscheiden (Abb. 13).

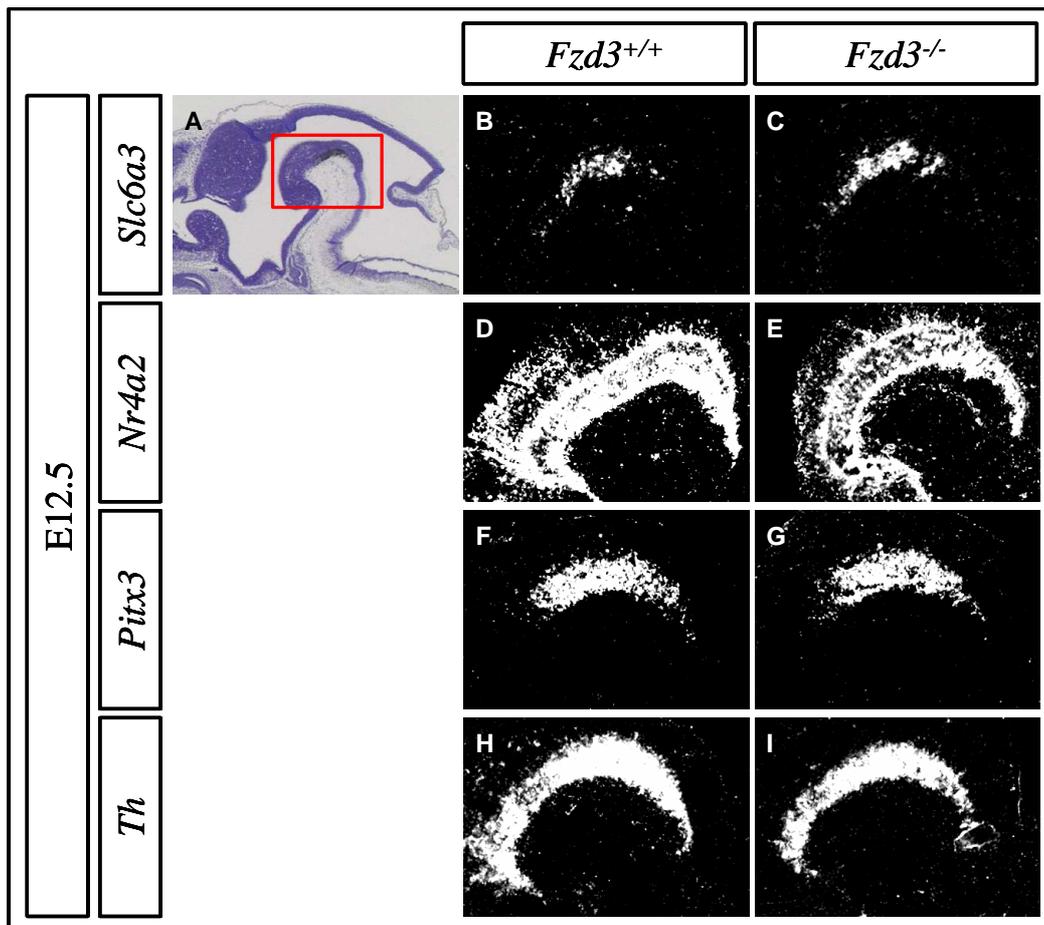


Abb. 13: Sagittalschnitte mit Expression der mRNA von *Slc6a3* (B, C), *Nr4a2* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) im Embryonalstadium E12.5 (n = 5). In A ist die Übersichtsaufnahme gezeigt. Die rote Box markiert den Ausschnitt der Vergrößerungen. Rostral weist nach links. Der *ko* zeigte gegenüber dem *wt* keinen Unterschied in der Expression aller vier Marker.

Im Falle der Coronalschnitte (Abb. 14) jedoch zeigte sich im *ko* (C, E) eine leichte Verbreiterung gegenüber dem *wt* (B, D) in der Region mit Expressionen von *Slc6a3* und *Nr4a2*. Über die IHC wurde deutlich, dass die Menge an *Pitx3* und *Th* Protein beim *ko* unverändert blieb. Lediglich die Form der Proteinexpression ist im *ko* (G, I) weniger kompakt verglichen mit dem *wt* (F, H). Die Expression von *Pou4f1* ist unverändert.

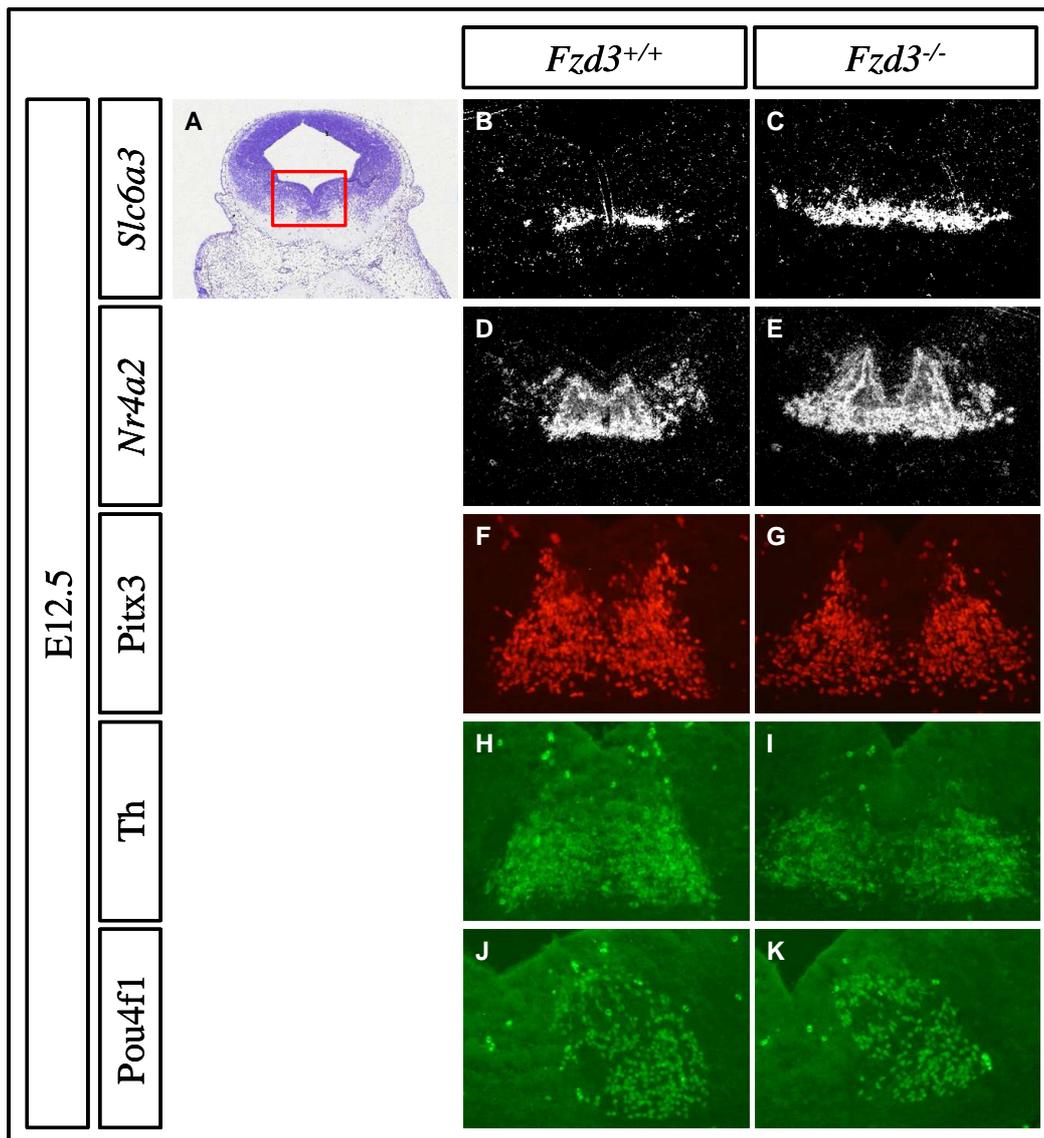


Abb. 14: Coronalschnitte mit Expression der mRNA von *Slc6a3* (B, C) und *Nr4a2* (D, E) im Embryonalstadium E12.5 (n = 3). Die Region der Expression in der Mantelzone scheint für beide Marker verbreitert zu sein. In A ist die Übersicht dargestellt, die rote Box zeigt die Region der Vergrößerung, dorsal weist nach oben. Coronalschnitte mit Expression der Proteine von *Pitx3* (F, G), *Th* (H, I) und *Pou4f1* (J, K) im Embryonalstadium E12.5 zeigen keinen großen Unterschied zwischen *wt* und *ko*. Es ist eine leichte Verbreiterung der Expressionsdomäne im Fall von *Pitx3* festzustellen. Bei *Th* (Vergleich H und I) wird dies noch deutlicher. In J und K ist nur die rechte Seite des ventralen Mittelhirns gezeigt.

3.2.3. Leichte Verbreiterung der mDA Neuronen Domäne ist persistent im *Fzd3 ko* im Stadium E13.5

Im Stadium E12.5 konnte auf coronalen Schnitten eine leicht verbreiterte Domäne der mDA Neuronen festgestellt werden, deshalb wurde der weitere Verlauf der Ausdifferenzierung dieser Neuronen weiter untersucht. Die Analyse auf Sagittalschnitten (E13.5) zeigte, dass der *ko* in der Expression der mRNA von *Slc6a3*, *Nr4a2*, *Pitx3* und *Th* im Vergleich zum *wt* unverändert blieb (Abb. 15).

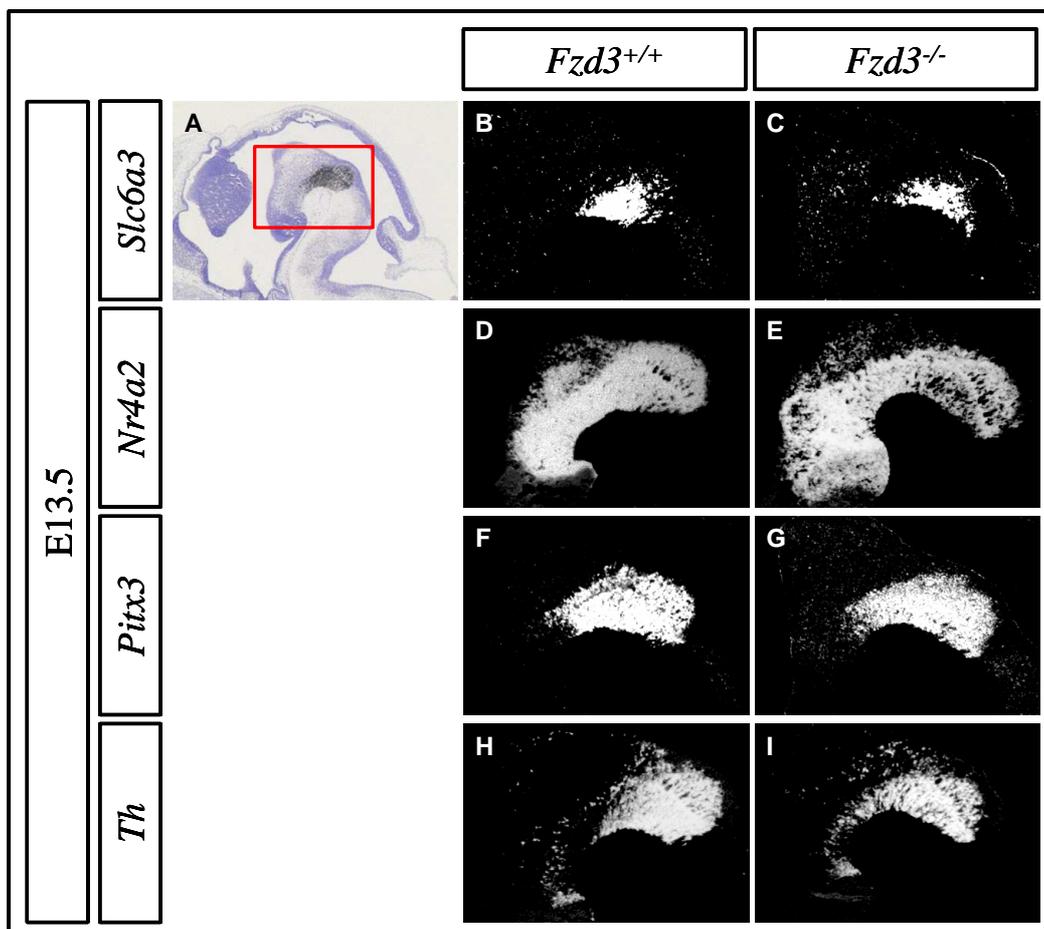


Abb. 15: Sagittalschnitte mit Expression der mRNA von *Slc6a3* (B, C), *Nr4a2* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) im Embryonalstadium E13.5 (n = 5). In A – I weist rostral nach links. Die rote Box in A markiert die vergrößerten Bereiche in B – I. Die Region in der die Marker exprimiert sind, weist keinen Unterschied zwischen *wt* und *ko* in diesem Stadium auf.

Bei den Coronalschnitten (Abb. 16) war die Expression der mRNA zwischen *wt* und *ko* im Wesentlichen gleich. Es konnte jedoch immer noch wie in Stadium E12.5 eine leicht verbreiterte Expression im *ko* festgestellt werden. Die Expressionen der Marker *Slc6a3* (C), *Nr4a2* (E), *Th* (I) und besonders *Pitx3* (G, Klammer) sind im *ko* im Vergleich zum *wt* gleichen Alters verbreitert.

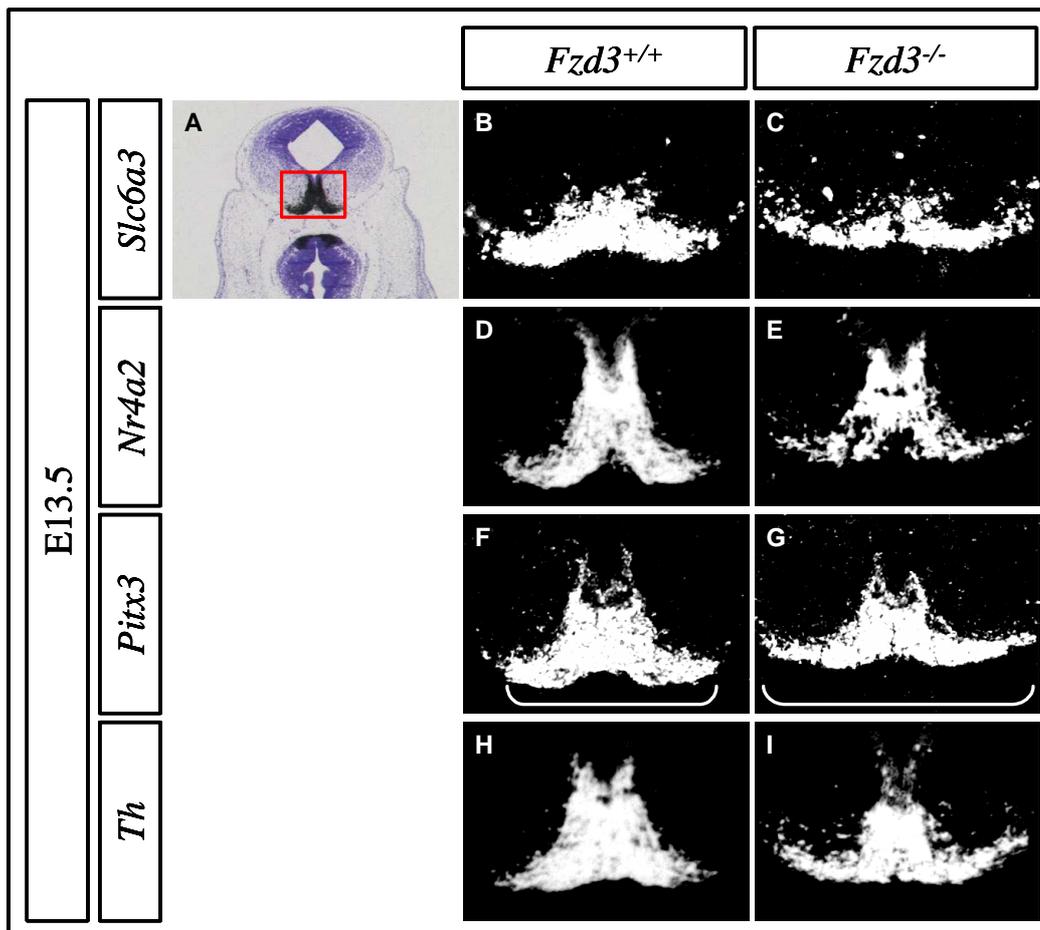


Abb. 16: Coronalschnitte mit Expression der mRNA von *Slc6a3* (B, C), *Nr4a2* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) im Embryonalstadium E13.5 (n = 5). Die rote Box in A (Hellfeldbild) weist auf die Vergrößerungen in B – I hin; dorsal ist jeweils oben. Im *ko* erscheint die Region der DA Neuronen leicht verbreitert. Besonders deutlich ist dies an der Expression von *Pitx3* (Vergleich Klammer in F, G) zu sehen.

3.2.4. Normale Entwicklung der mDA Neuronen im Stadium E15.5 im *Fzd3 ko*

Die Expression der mRNA von *Slc6a3* (Abb. 17, B, C), *Nr4a2* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) auf Coronalschnitten sind in diesem Stadium (E15.5) im *ko* unverändert im Vergleich zum *wt*. Die noch in den Stadien E12.5 und E13.5 auf Coronalschnitten zu beobachtende Verbreiterung wird nun nicht mehr deutlich. Somit ist die Verbreiterung der mDA Neuronen Domäne im *Fzd3 ko* nur eine vorübergehende Entwicklungsphase. Im Stadium E15.5 gleicht der Phänotyp im *ko* dem des *wt*.

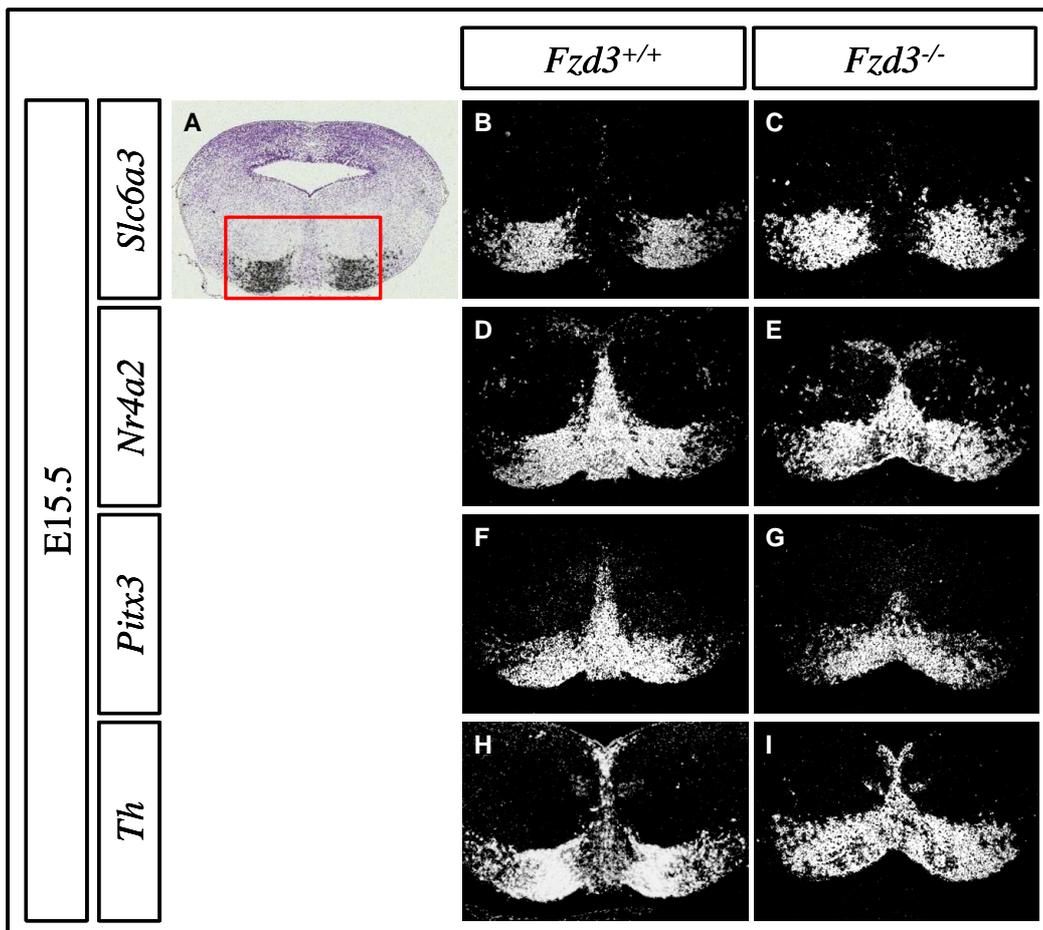


Abb. 17: Coronalschnitte mit Expression der mRNA von *Slc6a3* (B, C), *Nr4a2* (D, E), *Pitx3* (F, G) und *Th* (H, I) im Embryonalstadium E15.5. Es gibt keinen deutlichen Unterschied zwischen *wt* und *ko*. Im Stadium E15.5 ist keine Verbreiterung der Expressionsdomänen mehr zu erkennen. Dorsal weist jeweils nach oben. Rote Box in A markiert den Bereich der Vergrößerungen (B – I).

3.2.5. Analyse der mDA Neuronen in der Erhaltungsphase E17.5 im *Fzd3 ko*

Sehr ähnliche Expressionen (Abb. 18) der Marker *Slc6a3* (B, C), *Nr4a2* (D, E) und *Th* (F, G) konnten im Vergleich der *ko* und *wt* Embryonen (E17.5) auf Sagittalschnitten ermittelt werden. Wie in den anderen Stadien wurden auch hier zusätzlich Coronalschnitte analysiert. Gleichsam dem Stadium E15.5 sind auch im Stadium E17.5 die Marker *Slc6a3* und *Nr4a2* verwendet worden. Dabei lagen beim Marker *Slc6a3* in den *ko* Coronalschnitten (Abb. 19, C) die Expressionsdomänen unwesentlich weiter auseinander im Vergleich zum *wt* Embryo. Die Domäne in ihrer Gesamtgröße war dadurch jedoch nicht wesentlich reduziert. Die IHC auf Coronalschnitten (Abb. 19, F-J) zeigte ein gleich bleibendes Muster beider Genotypen für die Proteine Pitx3 und Th.

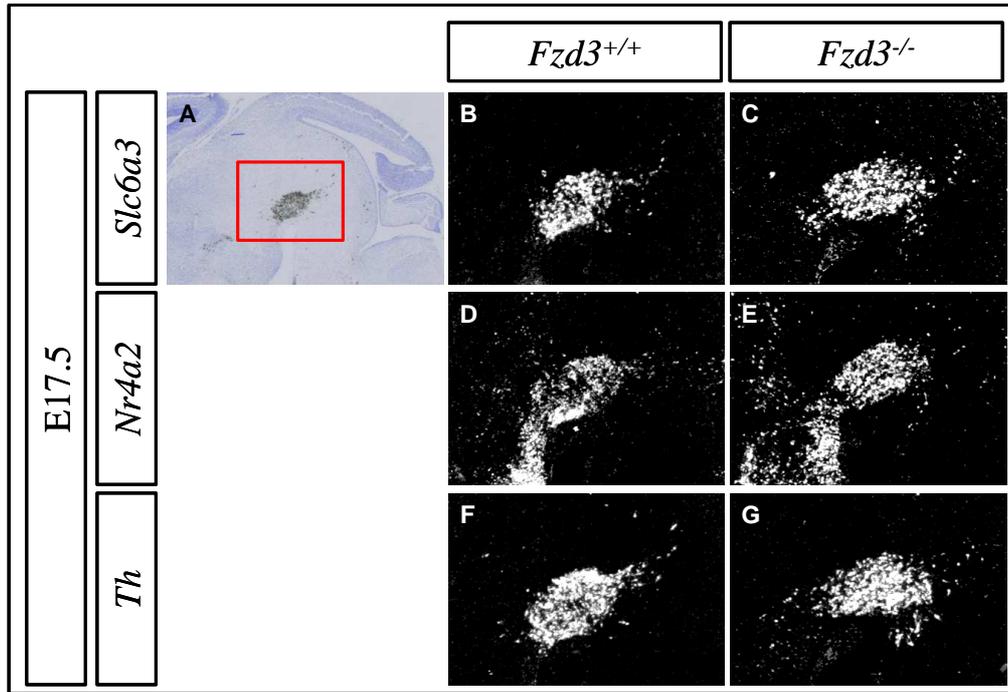


Abb. 18: Expressionen der mRNA von *Slc6a3* (B, C), *Nr4a2* (D, E) und *Th* (F, G) im Embryonalstadium E17.5 auf Sagittalschnitten (n = 5). *Wt* und *ko* haben den gleichen Phänotyp. Rostral weist nach links. Die Übersicht ist in A gezeigt, die rote Box markiert den vergrößerten Bereich in B – I.

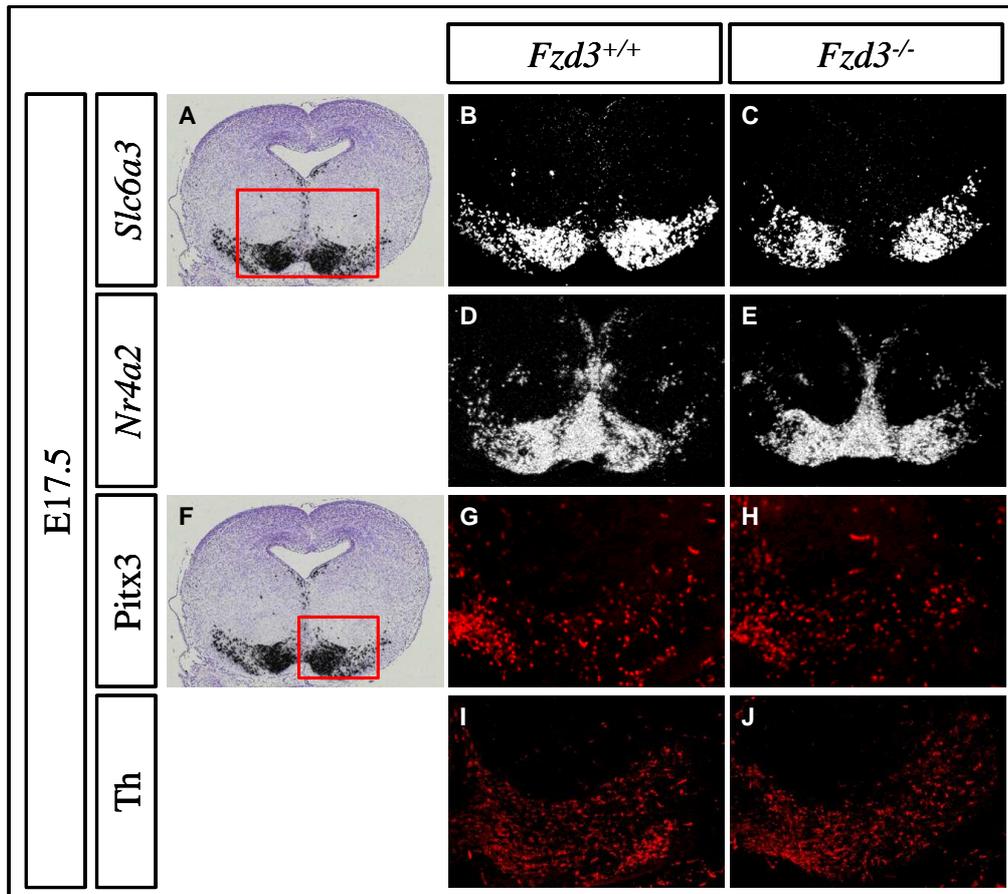


Abb. 19: Expression der mRNA von *Slc6a3* (B, C) und *Nurr1* (D, E) sowie Expression der Proteine von *Pitx3* (G, H) und *Th* (I, J) in E17.5, coronal (n = 3). Die rote Box (in A, F, Hellfeld) entspricht den Vergrößerungen, dorsal ist jeweils oben. Obwohl in der ISH mit *Slc6a3* (C) die Expression im *ko* etwas weiter auseinander liegt, ist kein signifikanter Unterschied zwischen *wt* und *ko* zu konstatieren. Auch in der IHC sind die Expressionen der Proteine in beiden Genotypen gleich.

3.3. Normale mDA Neuronen Entwicklung im *Fzd3/Fzd6 Doppel ko*

Die *Fzd3/Fzd6 ko* Mauslinie wurde durch Verpaarungen von *Fzd6^{-/-}* homozygoten mit *Fzd3^{+/-}* heterozygoten Tieren erzeugt. Die Genotypisierung der daraus entstandenen Nachkommen erfolgte - wie bei den Einzelmutanten - per PCR. Nur die doppelt-heterozygoten Nachkommen (*Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}*) aus dieser Generation wurden für die folgende Zucht verwendet. Dabei konnte der genetische Hintergrund durch Bruder – Schwester Verpaarungen gleich gehalten werden.

Die Genotypen der Embryonen dieser Verpaarungen ($\sigma Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}$ x $\text{♀ } Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}$, bzw. x $\text{♀ } Fzd3^{+/-}/Fzd6^{-/-}$) verteilten sich nach den Mendelschen Regeln (Tab. 1). Es gab keine adulten Tiere die homozygot für das *Fzd3* Gen (*Fzd3^{-/-}*) waren, da diese Tiere kurz nach der Geburt sterben (Wang, Thekdi et al., 2002).

Genotyp		$\text{♀ } Fzd3^{+/-}/Fzd6^{-/-}$		$\text{♀ } Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}$	
		erwartete Verteilung in %	Anzahl im <i>Doppel ko</i> n (%)	erwartete Verteilung in %	Anzahl im <i>Doppel ko</i> n (%)
<i>Fzd6^{+/+}</i>	<i>Fzd3^{+/+}</i>	-	-	6,25	6 (7)
<i>Fzd6^{+/+}</i>	<i>Fzd3^{+/-}</i>	-	-	12,5	12 (14)
<i>Fzd6^{+/+}</i>	<i>Fzd3^{-/-}</i>	-	-	6,25	6 (7)
<i>Fzd6^{+/-}</i>	<i>Fzd3^{+/+}</i>	12,5	1 (5)	12,5	7 (8)
<i>Fzd6^{+/-}</i>	<i>Fzd3^{+/-}</i>	25	4 (18)	25	23 (28)
<i>Fzd6^{+/-}</i>	<i>Fzd3^{-/-}</i>	12,5	5 (23)	12,5	8 (10)
<i>Fzd6^{-/-}</i>	<i>Fzd3^{+/+}</i>	12,5	4 (18)	6,25	7 (8)
<i>Fzd6^{-/-}</i>	<i>Fzd3^{+/-}</i>	25	6 (27)	12,5	10 (12)
<i>Fzd6^{-/-}</i>	<i>Fzd3^{-/-}</i>	12,5	2 (9)	6,25	5 (6)

Tab. 1: Verteilung der Genotypen der Embryonen im *Doppel ko*. Verpaarungen mit $\sigma Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}$ x $\text{♀ } Fzd3^{+/-}/Fzd6^{-/-}$, bzw. $\sigma Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}$ x $\text{♀ } Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}$. In den Spalten der real erhaltenen Embryonen sind jeweils die absolute Anzahl und die Prozentangabe in Klammern angegeben.

Für die Gewinnung von Embryonen wurde die *in vitro* Fertilisation (IVF, durchgeführt in der Abteilung CryoGene am Helmholtz Zentrum München) angewendet, da die Doppelmutanten Fertilitätsprobleme aufwiesen. Es zeigte sich, dass die *Fzd3^{+/-}Fzd6^{-/-}* Männchen kein Spermium produzierten (n=8). Somit wurden für die IVF nur

doppelheterozygote ($Fzd3^{+/-}/Fzd6^{+/-}$) Männchen und Weibchen sowie Weibchen des Genotyps $Fzd3^{+/-}/Fzd6^{-/-}$ verwendet.

In Abbildung 20 sind zwei Wurfgeschwister des Stadiums E12.5 abgebildet. Hierbei wird der Genotyp $Fzd3^{+/+}/Fzd6^{-/-}$ als Kontrolle gesetzt, da die hier vorgestellten Ergebnisse zur $Fzd6$ Einzelmutante (s. 3.1.) zeigen, dass der $Fzd6^{-/-}$ Embryo keinen Phänotyp in Bezug auf die Entwicklung der mDA Neuronen aufweist. Auch Wang (Wang, Guo et al., 2006) nutzte diesen Genotyp als Kontrollembryo. Abbildung 20 (B, C) zeigt den *Doppel ko* Embryo, es sind bereits das defekte Neuralrohr (B) und der eingedrehte Schwanz (C) ersichtlich.

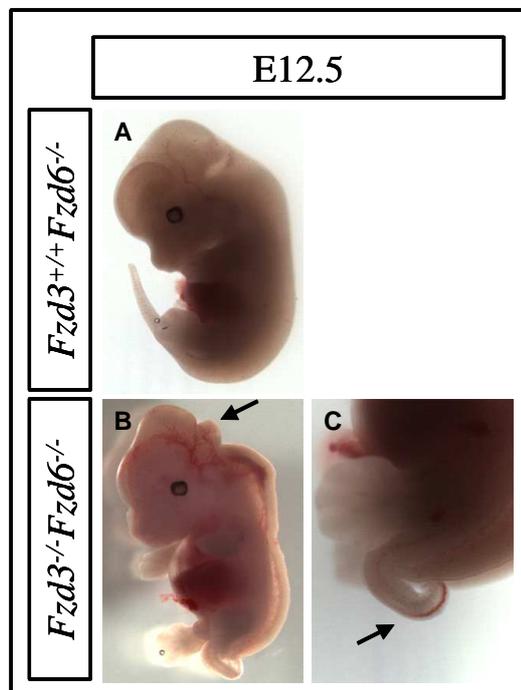


Abb. 20: Wurfgeschwister der $Fzd3/6$ *Doppel ko* Zucht im Stadium E12.5. In A ist ein $Fzd3^{+/+}/Fzd6^{-/-}$ Embryo zu erkennen. Aufgrund der in 3.1. beschriebenen Ergebnisse (die $Fzd6^{-/-}$ Maus zeigt keinen Phänotyp in Bezug auf die Entwicklung von mDA Neuronen) hier als Kontrolle gewertet. B und C zeigen einen $Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-}$ Embryo. Der Pfeil in B weist auf die massive Missbildung des Embryos im dorsalen Bereich, in C auf den eingedrehten Schwanz. Der *ko* Embryo in seiner Gesamtgröße ist nicht reduziert.

3.3.1. Analyse der mDA Neuronen im Stadium E12.5 im $Fzd3/Fzd6$ *Doppel ko*

Von insgesamt sieben per IVF gewonnenen doppelhomozygoten ($Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-}$) Embryonen haben 2/7 ein - morphologisch gesehen - normales Neuralrohr: Der

Ventrikel ist wie im *wt* geformt. Bei den anderen 5/7 Embryonen ist Gewebe in den Ventrikel eingewachsen (Abb. 21 C). Zwei von diesen fünf Embryonen hatten eine laterale Ausdehnung des Neuralrohres, auf coronalen Schnitten im Bereich des Mittelhirns (MH), die der des *wt* entsprach (ohne Abbildung), die anderen drei wiesen ein insgesamt leicht verbreitertes Neuralrohr (Vergleich der lateralen Ausdehnung des Neuralrohres in A und C, Abb. 21) auf. Der in C abgebildete Schnitt zeigt im ventralen Bereich eine dem *wt* ähnliche Morphologie. Der dorsale Bereich des Neuralrohres ist stark verändert.

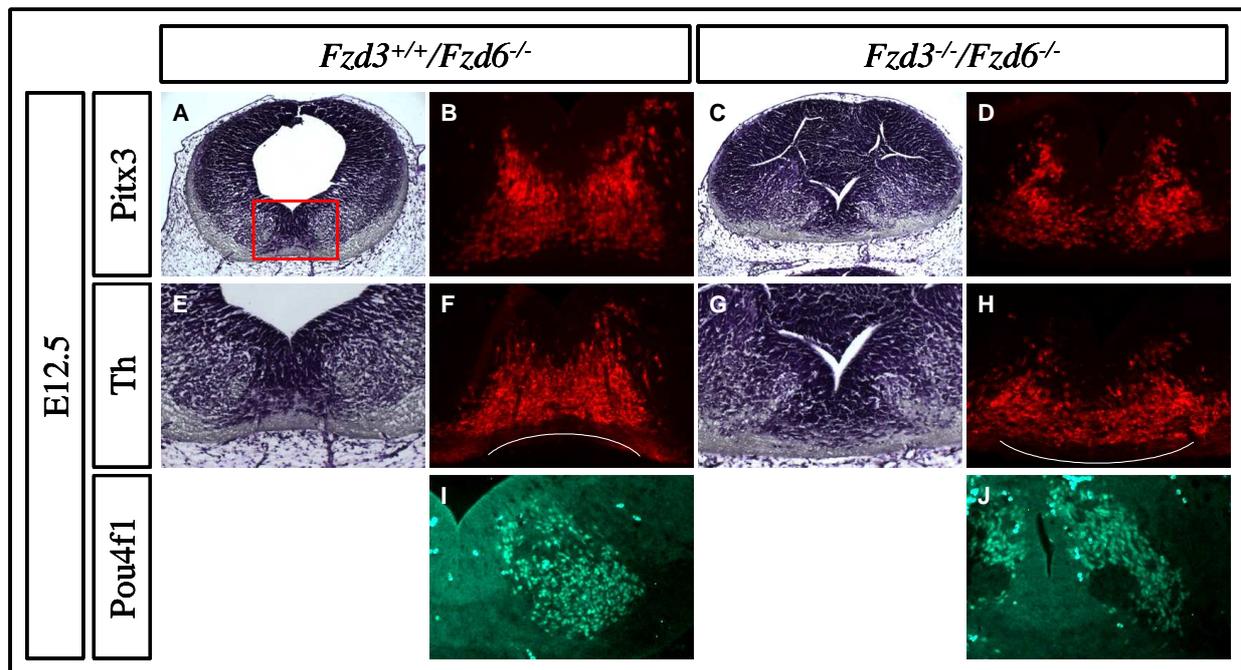


Abb. 21: Coronalschnitte im Stadium E12.5. A, B, E, F und I zeigen den Kontrollembryo. C, D, G, H und J den *Doppel ko* ($n = 3$). In A, C (Übersicht) und E, G (Detailaufnahme) sind Kresylviolett-färbungen der Embryonen zu sehen. Die rote Box in A gibt den Ausschnitt der Vergrößerungen an. IHC für Pitx3 (B, D), für Th (F, H) und für Pou4f1 (I, J). Das Hellfeldbild (C) des *ko* lässt vermuten, dass das Gewebe von dorsal einwächst. Expressionen von Pitx3 und Th sind im *ko* (konvex, siehe weiße Linie in H) vorhanden, jedoch mit unterschiedlicher Form im Vergleich zum *wt* (konkav, siehe weiße Linie in F). Die Region der DA Neuronen scheint im *ko* leicht verbreitert zu sein. Bei der Expression von Pou4f1 im *ko* (J) ist festzustellen, dass im ventralen Bereich ein in etwa kreisrunder Teil von der Pou4f1 Expression ausgespart bleibt. Dorsal weist in allen Abbildungen nach oben.

Die genaue Betrachtung der Schnittserien zeigte, dass das Gewebe im Ventrikel nicht mit dem Gewebe im ventralen Bereich sondern nur mit dem im dorsalen Bereich verbunden war. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es von dorsal einwächst.

Für die Analyse der DA Neuronen im Stadium E12.5 wurden Paraffinschnitte angefertigt, mit Kresylviolett resp. Antikörpern gegen Pitx3, Th und Pou4f1 gefärbt

(Abb. 21, n = 3). Die Proteinexpression von Pitx3 und Th sind im *ko* vorhanden, wenn auch – gegenüber dem *wt* – leicht verbreitert. Es ist kein Verlust der mDA Neuronenpopulation zu verzeichnen. Der im *wt* eher konkav geformte ventrale Bereich der Expressionsdomäne der Proteine (Abb. 21, F, weiße Linie) ist im *ko* (Abb. 21, H, weiße Linie) nicht anzutreffen. Dort ist dieser eher konvex ausgebildet. Dies stimmt mit der Morphologie in E und G überein. Die Pou4f1 positiven Neuronen sind auch im *ko* vorhanden. Auffällig ist hierbei ein in etwa kreisrunder Teil im ventralen Bereich, der von der Expression ausgenommen ist (Abb. 21, J). Dass dieser Bereich mit Gewebe gefüllt ist, lässt sich im dazugehörigen Hellfeldbild (G) sehen.

3.3.2. Dorsaler Phänotyp im *Fzd3/Fzd6 Doppel ko* im Stadium E12.5

Im Anschluss an die oben dargestellten Ergebnisse wurde das Gewebe, welches den Ventrikel füllt, näher untersucht. Die Folgeexperimente stützten sich auf die Marker pH3 (phospho-Histone H3 - Ser10) ein Mitose Marker für proliferierende Vorläuferzellen in der M Phase des Zellzyklus; Sox2 (SRY-box containing gene 2) ein Marker für proliferierende neurale Stammzellen; Ccnd1 (auch Cyclin D1) ein Marker für die späte G1 Phase im Zellzyklus; Cdkn1b (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, auch p27 oder Kip1) markiert Zellen, die den Zellzyklus verlassen – somit ergibt sich eine komplementäre Expression zu Ccnd1; Ascl1 (achaete-scute complex homolog 1, auch Mash1) ein Transkriptionsfaktor, der die Ausdifferenzierung von Neuronen fördert und damit neuronale Vorläuferzellen (teilweise noch proliferierend) markiert, sowie NeuN (Neuronal Nuclei) ein postmitotischer Neuronenmarker. Es sollte somit festgestellt werden, in welcher Entwicklungsphase sich die Zellen des eingewachsenen Gewebes befinden.

Lediglich in der Ventrikulärzone ist pH3 im *wt* (B) und *ko* (D) zu finden (Abb. 22). Diese ist im homozygoten Embryo gefaltet, damit ist die Ventrikulärzone länger und es sind etwa doppelt soviel pH3⁺ (pH3 positive) Zellen im *ko* zu finden.

Die Zellen der Ventrikulärzone sind Sox2⁺ sowie Ascl1⁺ (E – H, M - P). Dabei bilden die Ascl1⁺ Zellen nur eine Subpopulation der Sox2⁺ Zellen (Kele, Simplicio et al., 2006). Beide Antikörper detektieren Vorläuferzellen, jedoch werden mit dem Ascl1 Antikörper auch schon differenzierende Zellen festgestellt. Im Bereich der Basalplatte

ist sowohl im *wt* (M) als auch im *ko* (O) eine schwächere Expression von *Ascl1* im Vergleich zur Bodenplatte erkennbar. In der Dachplatte ist der *Cdkn1b*⁺ Bereich von der *Ascl1* Expression ausgespart (Vergleich N und R sowie P und T). Die Expression von *Ccnd1* in der Ventrikulärzone/Subventrikulärzone des *wt* (J) ist im *ko* (L) ebenso weit exprimiert wie die Expression von *Ascl1* (Vergleich I mit M und K mit O).

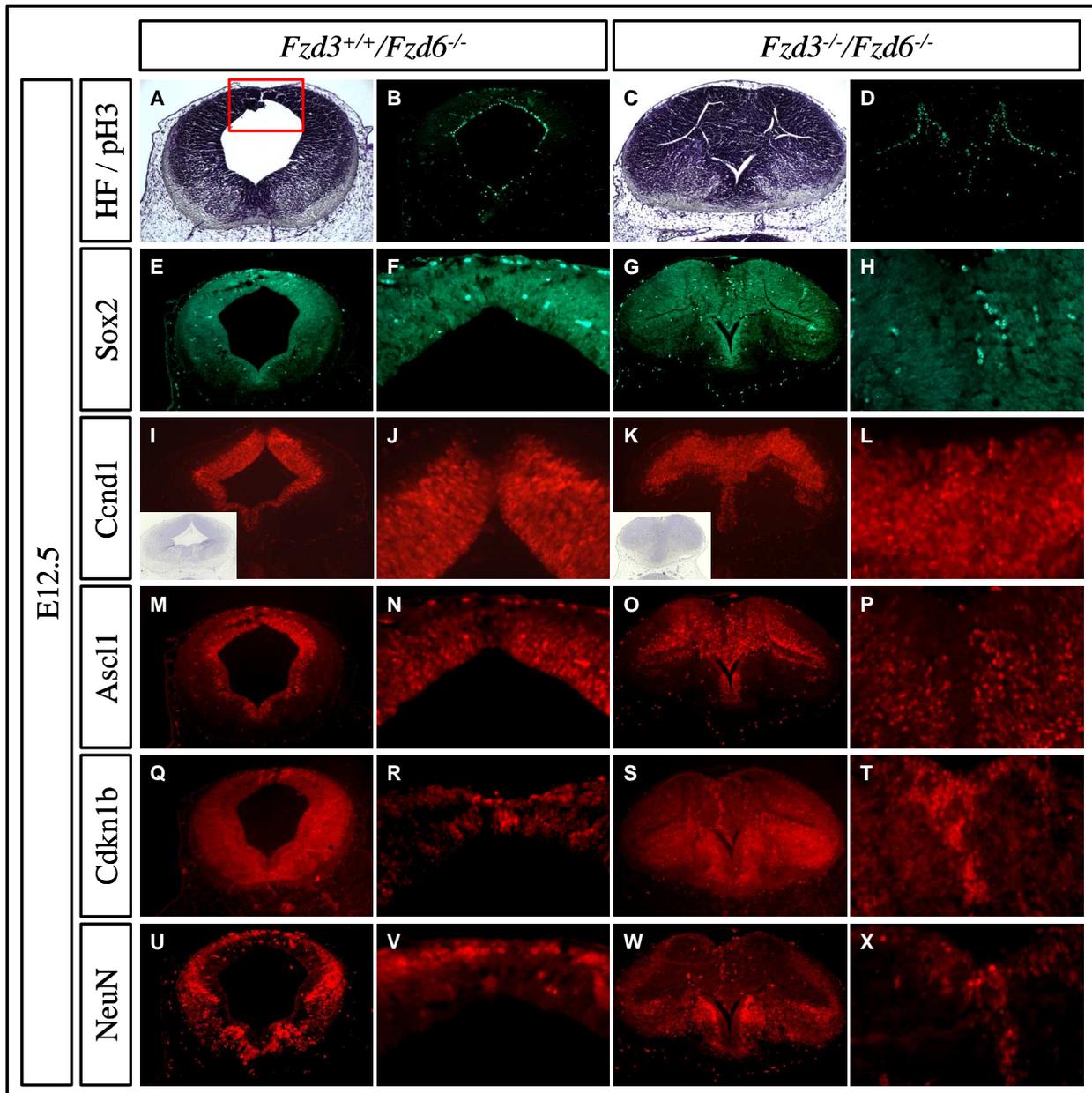


Abb. 22: Dorsaler Phänotyp. A und C sind Hellfeldaufnahmen von E12.5 *Fzd3*^{+/+}/*Fzd6*^{-/-} bzw. *Fzd3*^{-/-}/*Fzd6*^{-/-} Embryonen (n = 2). Rote Box in A markiert den Bereich der Vergrößerungen, dorsal ist jeweils oben. IHC für pH3 (B, D), Sox2 (E - H), Ccnd1 (Cyclin D1, I - L), Ascl1 (Mash1, M - P), Cdkn1b (p27, Q - T) und NeuN (U - X). pH3 ist ausschließlich in der Ventrikulärzone zu finden, im *ko* sind, durch die starke Einfaltung, dabei ca. doppelt so viel Zellen wie im *wt* gezählt worden. Ascl1 (M, O), Sox2 (E, G) und Ccnd1 (I, K) sind in der Ventrikulärzone exprimiert, Cdkn1b (Q, S) und NeuN (U, W) außerhalb davon. Der Vergleich von M und U sowie O und W zeigt deutlich die sich ausschließende Expression der NeuN und Ascl1 Expression. Ebenso fällt auf, dass die Cdkn1b Expression in R und T jeweils mit der Expressionslücke von Ascl1 in N und P übereinstimmt.

Cdkn1b wird als Zellzyklusinhibitor (Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen) verstanden. Erhöhte Level des Cdkn1b Proteins in der Zelle führen zu einem Verbleiben in der G1 Phase, diese Zellen teilen sich demnach nicht weiter (Herrup & Yang, 2007). In Abbildung 22 (Q – T) ist die Expression von Cdkn1b dargestellt. Die Ventrikulärzone ist bei beiden Genotypen ausgespart, dies ist besonders deutlich im Bereich der Bodenplatte (Q, S) zu sehen. In der Dachplatte ist im *wt* eine kleine Gruppe von Zellen medial zu detektieren (R), im *ko* dagegen sind ca. doppelt so viel Zellen vorhanden (T).

Das Verhältnis zwischen Ventrikulärzone und postmitotischer Zone ist in den beiden Genotypen anscheinend unverändert. Dies wird auch in der Expression von NeuN (U - X) ersichtlich. Die Neuronen sind, wie erwartet, nur in der postmitotischen Zone zu sehen. Im dorsalen Bereich (Vergleich T und X) ist ein Teil der Cdkn1b positiven Zellen auch NeuN positiv.

Eine Färbung mit Casp3 (caspase 3), einem Apoptose Marker, ergab keinen vermehrten Zelltod im *Doppel ko* Embryo (ohne Abb.).

Zusammengefasst besteht das eingewachsene Gewebe im dorsalen Bereich ($pH3^-$, $Cdkn1b^-$, $NeuN^-$, $Ccnd1^+$, $Sox2^+$, $Ascl1^+$) aus hauptsächlich neuronalen Vorläuferzellen. Im ventralen Bereich ($pH3^-$, $Ccnd1^-$, $Sox2^-$, $Ascl1^-$, $Cdkn1b^+$, $NeuN^+$) handelt es sich zumeist um postmitotische neuronale Vorläuferzellen und Neuronen. Somit bleibt die generelle räumliche Beziehung zwischen den neuronalen Vorläuferzellen, den postmitotischen neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen vermutlich erhalten.

Eine weitere Hypothese war, dass das in den Ventrikel eingewachsene Gewebe der Dachplatte zugeordnet werden kann. Ergebnisse einer ISH mit Proben für *Lmx1a*, *Lmx1b* und *Wnt1* zeigten jedoch, dass das von dorsal eingewachsene Gewebe in seiner Gesamtheit keinen Dachplatten Charakter hat (Abb. 23). Die Expressionen im *Doppel ko* (C, E und G) haben im Vergleich zum *wt* (B, D und F) eine andere Form aufgrund der Missbildung des Neuralrohres. Die räumlichen Bezüge der Expressionsdomänen zueinander sind jedoch unverändert. Somit muss die Hypothese von einer deutlich vergrößerten Menge an Zellen, die der Dachplatte zugeordnet werden können, verworfen werden.

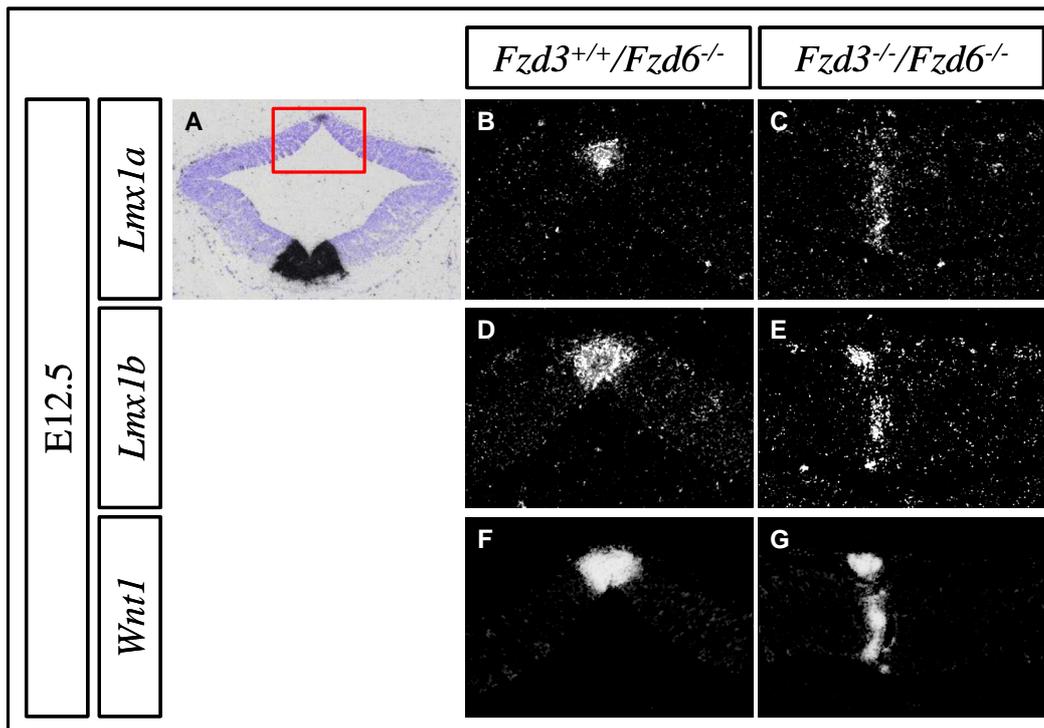


Abb. 23: ISH für *Lmx1a* (B,C), *Lmx1b* (D, E) und *Wnt1* (F, G) auf Coronschnitten von Kontrollembryo und *Doppel ko*. In A ist eine Übersichtsaufnahme gezeigt, die rote Box markiert die Vergrößerungen. *Lmx1a*, *Lmx1b* und *Wnt1* können auch im *Doppel ko* detektiert werden. Dabei ist die Form der Expression (ventraler Ausläufer im *ko*) verändert, die räumlichen Bezüge der Expressionsdomänen zueinander jedoch nicht.

3.4. Funktion von Lef1 im kanonischen Wnt Signalweg in der Entstehung von mDA Neuronen

Um den kanonischen Wnt-Signalweg in Bezug auf die Entwicklung von mDA Neuronen zu analysieren, wurde hier neben den Frizzled Rezeptoren auch der Transkriptionsfaktor Lef1 untersucht. Im Gegensatz zu Fzd ist die Interaktion von Lef1 als Transkriptionsfaktor direkt an dem Zielgen zu finden. Wie bereits oben erwähnt, ist Lef1 ein Transkriptionsfaktor der im kanonischen Wnt Signalweg mit Hilfe von β -Catenin zu einem Aktivator wird. In der Promoterregion von Zielgenen bindet Lef1 an die DNA und reprimiert im inaktiven Zustand somit die Transkribierung von nachgeschalteten Abschnitten. Der Hypothese, dass *Pitx3* ein Zielgen vom kanonischen Wnt Signalweg ist und für die Erhaltung von mDA Neuronen von Bedeutung ist, sollte nun nachgegangen werden.

Weiter oben wurde bereits darauf hingewiesen, dass nach der vorhandenen Literatur nur *Lef1* von insgesamt vier *Tcf/Lef* Transkriptionsfaktoren im ventralen Mittelhirn

vorhanden ist. Um die Wirkung von *Lef1* *in vivo* auf die Entwicklung mittelhirn-dopaminergener Neuronen zu untersuchen sollte zunächst die Expression der *Lef1* mRNA im Mittelhirn von CD1 Mäusen genauer analysiert werden.

3.4.1. Expressionsanalyse von *Lef1* in CD1 *wt* Mäusen

Um zu erfahren ob *Lef1* in der Region exprimiert wird, in der mDA Neuronen entstehen, wurde die Expressionsanalyse von *Lef1* an CD1 *wt* Mäusen durchgeführt. Die Entwicklung der Vorläuferzellen von mDA Neuronen um E10.5 ist hierbei ein maßgebliches Zeitfenster. In der Abbildung 24 wird die Expression von *Lef1* im Mittelhirn in den Stadien E9.5 (B), E10.5 (D) und E12.5 (F) deutlich. Auf den Sagittalschnitten ist die mRNA Expression in der mesencephalen Flexur (Pfeil in B, D und F), an der Stelle an der mDA Neuronen entstehen, in allen drei Stadien intensiv zu erkennen.

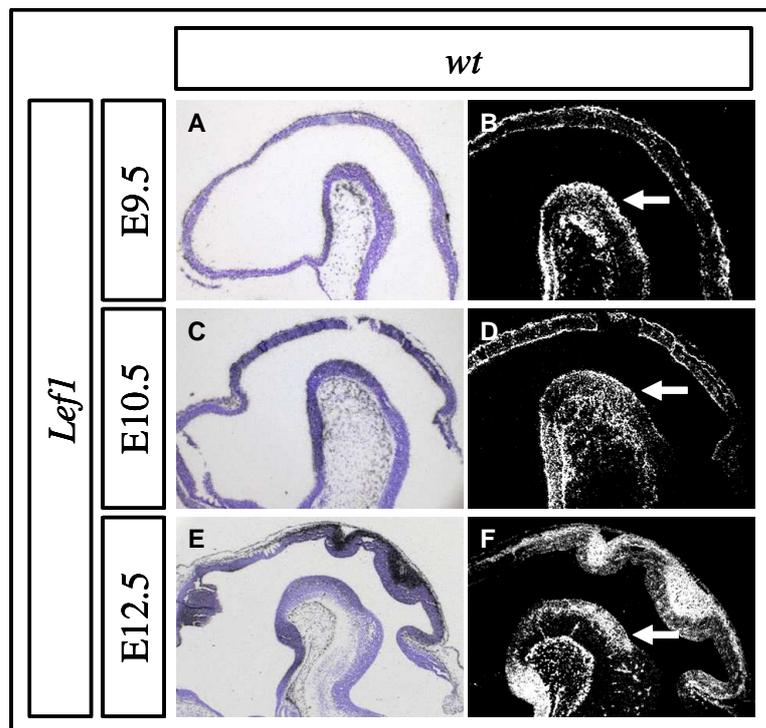


Abb. 24: Expressionen der mRNA von *Lef1* in den Embryonalstadien E9.5 (A, B), E10.5 (C, D) und E12.5 (E, F) auf Sagittalschnitten von CD1 *wt* Mäusen ($n = 3$). Die Dunkelfeldaufnahmen sind leicht vergrößert. Rostral zeigt jeweils nach links. *Lef1* ist in allen drei hier dargestellten Stadien in der mesencephalen Flexur exprimiert (Pfeil in B, D und F).

3.4.2. Lef1 in der Entstehung von mDA Neuronen

Nachdem *Lef1* zur Zeit der Entwicklung der Vorläuferzellen von mDA Neuronen in der mesencephalen Flexur exprimiert ist, ist dies ein erster Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang in der Entwicklung dieser Nervenzellen. Um herauszufinden in wie weit *Lef1* bei der Entstehung von mDA Neuronen benötigt wird, sollte nun die Funktion von *Lef1* *in vivo* näher untersucht werden. *Lef1* *ko* Mäuse wurden in den Stadien E10.5, E12.5 und E17.5 analysiert.

Erste Ergebnisse aus ISH an *Lef1* *ko* Embryonen zeigten eine Reduktion der mRNA im ventralen Mittelhirn. Während sich der Marker *Aldh1a1* im Stadium E10.5 nahezu unverändert darstellte (Abb. 25, D und E; Abb. 26) zeigte *Nr4a2* im *ko* eine leichte Reduktion (Abb. 25, C). Die darauf folgende Analyse ergab eine vermeintliche Reduktion von *Nr4a2*, *Pitx3* und *Th* im Stadium E12.5 beim *ko* (Abb. 27). Dieses Ergebnis diente als Grundlage für Folgeexperimente. Nach der Etablierung der Zucht von *Lef1* Mäusen konnten IHC Färbungen in verschiedenen Stadien durchgeführt werden.

3.4.2.1. Analyse der mDA Neuronen in der Spezifikationsphase E10.5 im *Lef1* *ko*

Die DA Vorläuferzellenmarker *Nurr1* und *Aldh1a1* wurden im Stadium E10.5 verwendet (Abb. 25). Die Expressionen von *Aldh1a1* in *wt* (*Lef1*^{+/-} und *Lef1*^{+/+} werden hier als *wt* gewertet, D) und *ko* (*Lef1*^{-/-}, E) waren unverändert, jedoch von *Nurr1* ist die Intensität des Signals im *ko* (C) weniger stark als im *wt* (B). Ebenfalls wurden Coronschnitte von E10.5 Embryonen angefertigt und mit IHC untersucht. In Abbildung 26 ist die Expression von *Alh1a1* für *wt* und *ko* gezeigt. Somit ist kein Verlust der Vorläuferzellendomäne von mDA Neuronen zu verzeichnen.

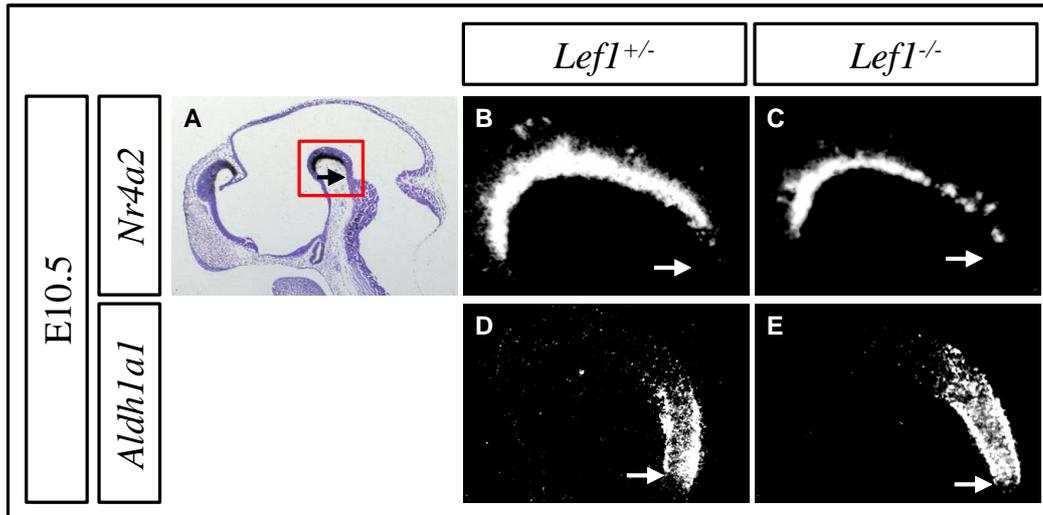


Abb. 25: Sagittalschnitte mit Expression der mRNA von *Aldh1a1* (D, E) und *Nr4a2* (B, C) im Embryonalstadium E10.5 (n=1). A zeigt eine Hellfeldaufnahme, rostral weist nach links. Die rote Box weist auf die Vergrößerungen in B – E hin. Die Stärke der Expression von *Nr4a2* erscheint im *ko* (C) leicht reduziert, verglichen mit dem *wt* (B). Der Pfeil weist auf die MHG.

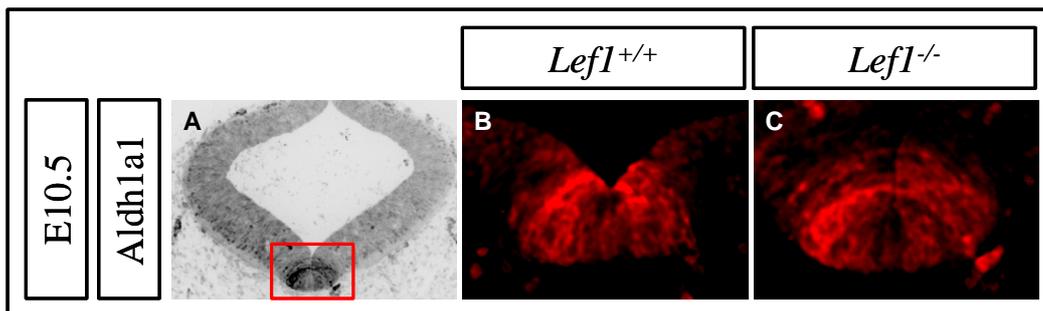


Abb. 26: Coronalschnitte mit Expression der Proteinlevel von *Aldh1a1* im Embryonalstadium E10.5 (n = 3). Dorsal weist nach oben. In A ist eine Übersicht abgebildet, die rote Box bezieht sich auf den Ausschnitt der Vergrößerungen. Die Expressionen waren unverändert zwischen *wt* (B) und *ko* (A, C).

3.4.2.2. Analyse der mDA Neuronen in der Differenzierungsphase E12.5 im *Lef1 ko*

Im Stadium E12.5 suggerierte die ISH eine reduzierte Domäne der mDA Neuronen (Abb. 27). Sowohl die Expressionsdomänen für *Nr4a2* (E) und *Pitx3* (G) als auch die für *Th* (I) waren kleiner als im *wt*. Normalerweise ist die *Slc6a3* Expression ab dem Stadium E12.5 detektierbar (Prakash & Wurst, 2006). Hier ist diese Expression noch relativ schwach ausgeprägt. Diese Ergebnisse stützen sich lediglich auf 2 Embryonen (je einmal coronal, Abb. 27; resp. sagittal, ohne Abb.).

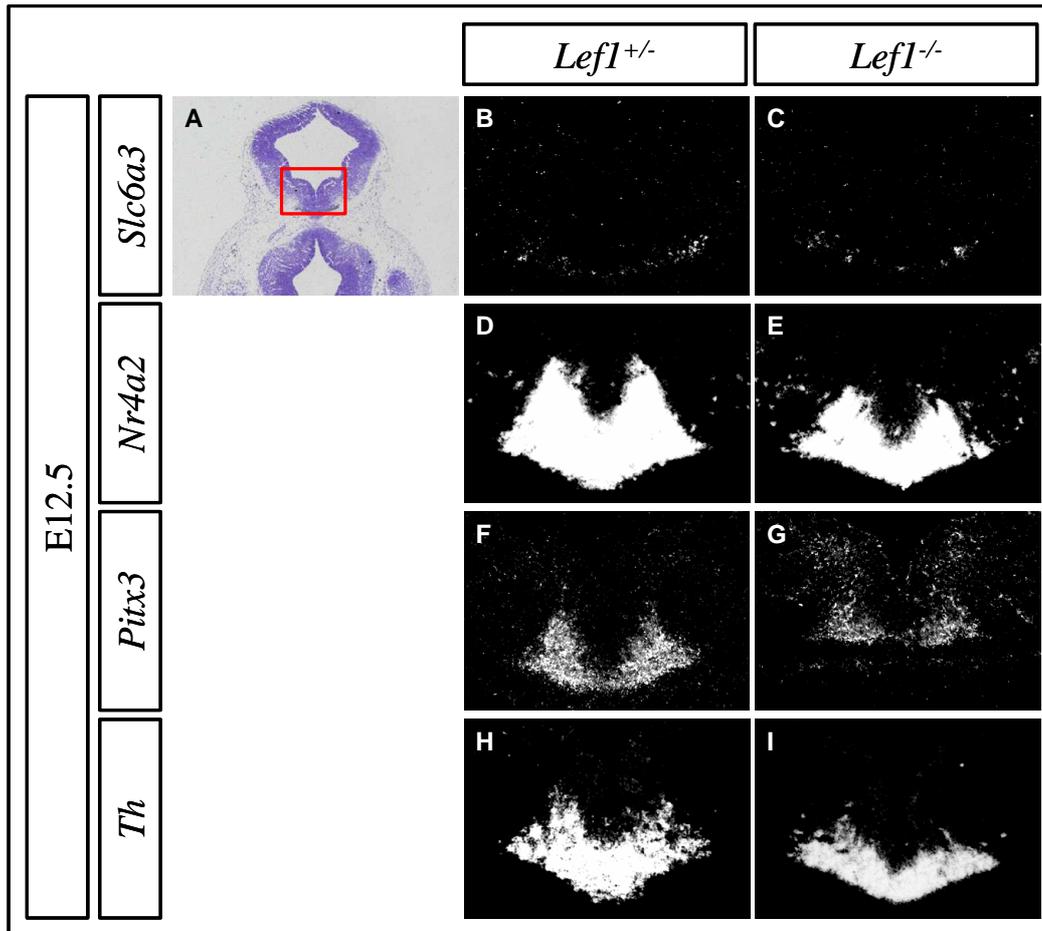


Abb. 27: Coronalanschnitte mit Expression der mRNA von *Slc6a3*, *Nr4a2*, *Pitx3* und *Th* im Embryonalstadium E12.5 der *Lef1 ko* Maus (n = 1). Die *Slc6a3* Expression (B, C) erscheint nicht deutlich. Eine leichte Reduzierung der Expressionsdomäne zeigt *Nr4a2* (Vergleich D und E), *Pitx3* (Vergleich F und G) und *Th* (Vergleich H und I).

Die Wiederholung der Experimente zeigte, dass die vorherigen Daten nicht reproduziert werden konnten. Mit IHC konnten die Proteinlevel von *Pitx3* (Abb. 28; B, C), *Th* (D, E), *Pou4f1* (F, G) und *Isl1* (ein Marker für Motor Neuronen, z.B. *nervus oculomotorius*; H, I) bestimmt werden. Bei keinem dieser Marker jedoch war im *ko* eine Veränderung festzustellen. Dies steht also im Widerspruch zum vorherigen Ergebnis.

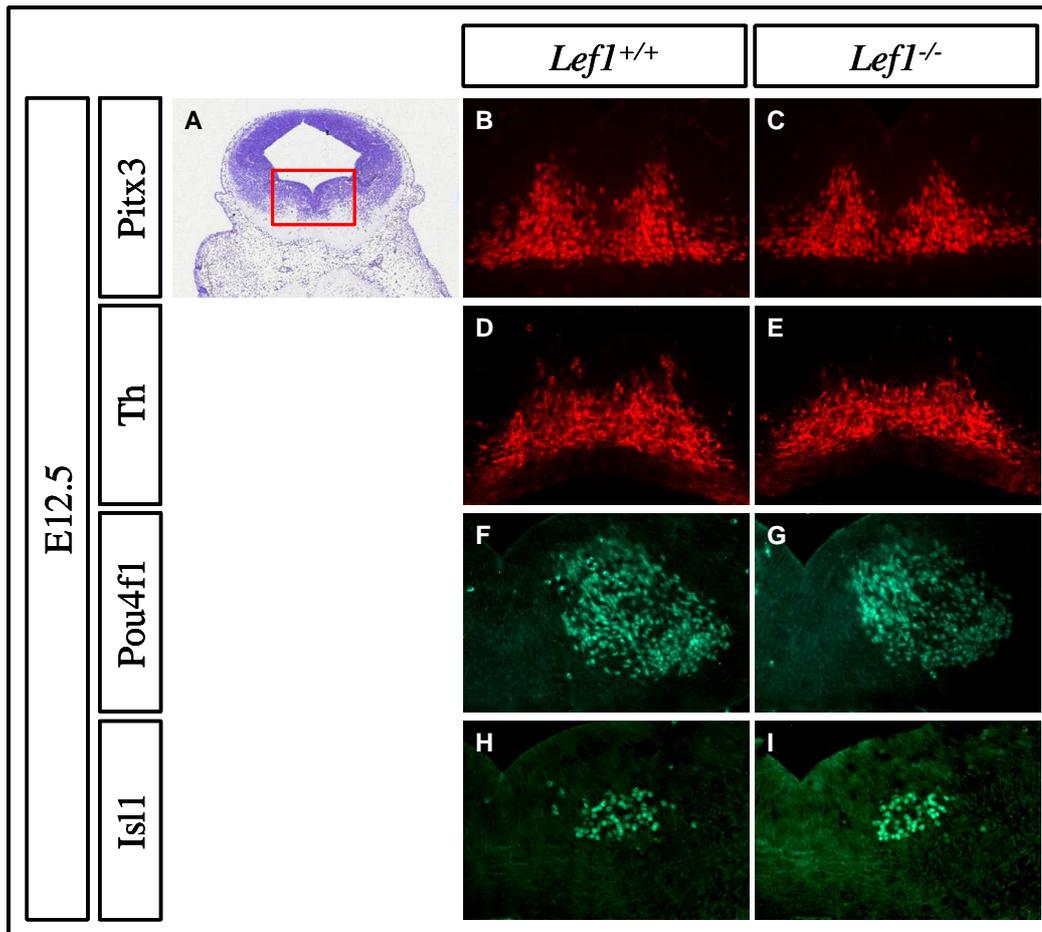


Abb. 28: Coronschnitte mit Expression der Pitx3, Th, Pou4f1 und Isl1 Proteine im Embryonalstadium E12.5 (n = 5). In der Übersicht (A) kennzeichnet die rote Box den Ausschnitt, der in B – I vergrößert wird. Die Proteinlevel aller vier Marker sind im *wt* und *ko* unverändert.

3.4.2.3. Leichte Reduktion der mDA Neuronen in der Erhaltungsphase E17.5 im *Lef1 ko*

Die IHC Wiederholung in E17.5 alten Embryonen diente dem Ziel, die Ausdifferenzierung der Neuronen weiter zu verfolgen. Möglicherweise ist *Lef1* für die Erhaltung von mDA Neuronen zuständig. Auch dabei konnte eine normale mDA Neuronendomäne erkennbar nachgewiesen werden. Die Expression von Pitx3, Th, Pou4f1 und Isl1 (Abb. 29) scheinen im *wt* und *ko* gleich zu sein.

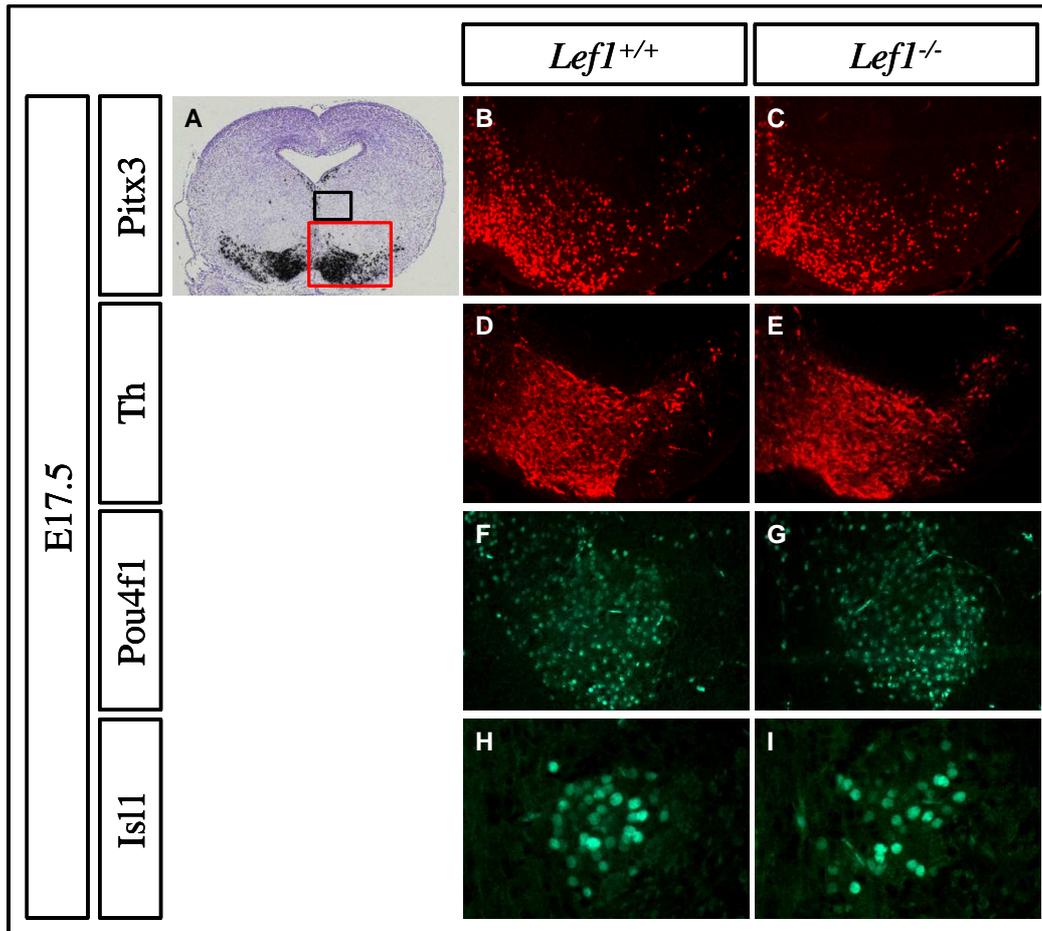


Abb. 29: Coronalschnitte mit Expression der Proteinlevel von Pitx3, Th, Pou4f1 und Is11 im Embryonalstadium E17.5 (n = 5). Die Übersicht ist in A dargestellt, dorsal weist nach oben, die rote Box kennzeichnet den Ort der Vergrößerungen (Islet1 (H, I) ist noch einmal stärker vergrößert, schwarze Box in A). Eine Reduktion der Zellpopulationen im *ko* ist, für alle Marker, nicht erkennbar.

Die Beurteilung der Neuronendomäne war bisher qualitativ, kleine Veränderungen der Zellzahl konnten so nicht erfasst werden, deshalb folgte hier eine quantitative Analyse. Es wurden die Th positiven Neuronen im Stadium E17.5 gezählt (n=5, Einzelergebnisse siehe 9.2.). Im *ko* ist eine Reduktion von gemittelt 4500 Zellen (das entspricht etwa 10%) festgestellt worden. Aufgrund gepaarter Stichproben (Wurfgeschwister) ist hierbei der gepaarte T-Test anzuwenden. Dieser T-Test vergleicht den genauen Unterschied zwischen *wt* und *ko* der einzelnen Paare. Somit ist es möglich alle Paare unabhängig von der gezählten Neuronenanzahl, die ja von *wt* zu *wt*, bzw. *ko* zu *ko* variiert, in die Statistik einzubeziehen (Abb. 30, oben). Dieser Unterschied kann z.B. durch differenziertes Alter der Würfe, geringe Abweichungen in der Prozedur der IHC sowie Varianzen in der Zellzählung auftreten. Mit dem gepaarten T-Test ergab sich ein signifikanter ($p < 0,003$) Unterschied zwischen *wt* und *ko* (Abb. 30, unten).

Damit ergeben sich hier ca. 10% weniger mDA Neuronen (Th^+) im *Lef1*^{-/-} Embryo im Stadium E17.5. Möglicherweise ist hier also nur eine Subpopulation der mDA Neuronen betroffen. Dies ist der Ausgangspunkt für mögliche weitere Analysen an der *Lef1* ko Maus um diesen Phänotyp näher zu untersuchen. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen.

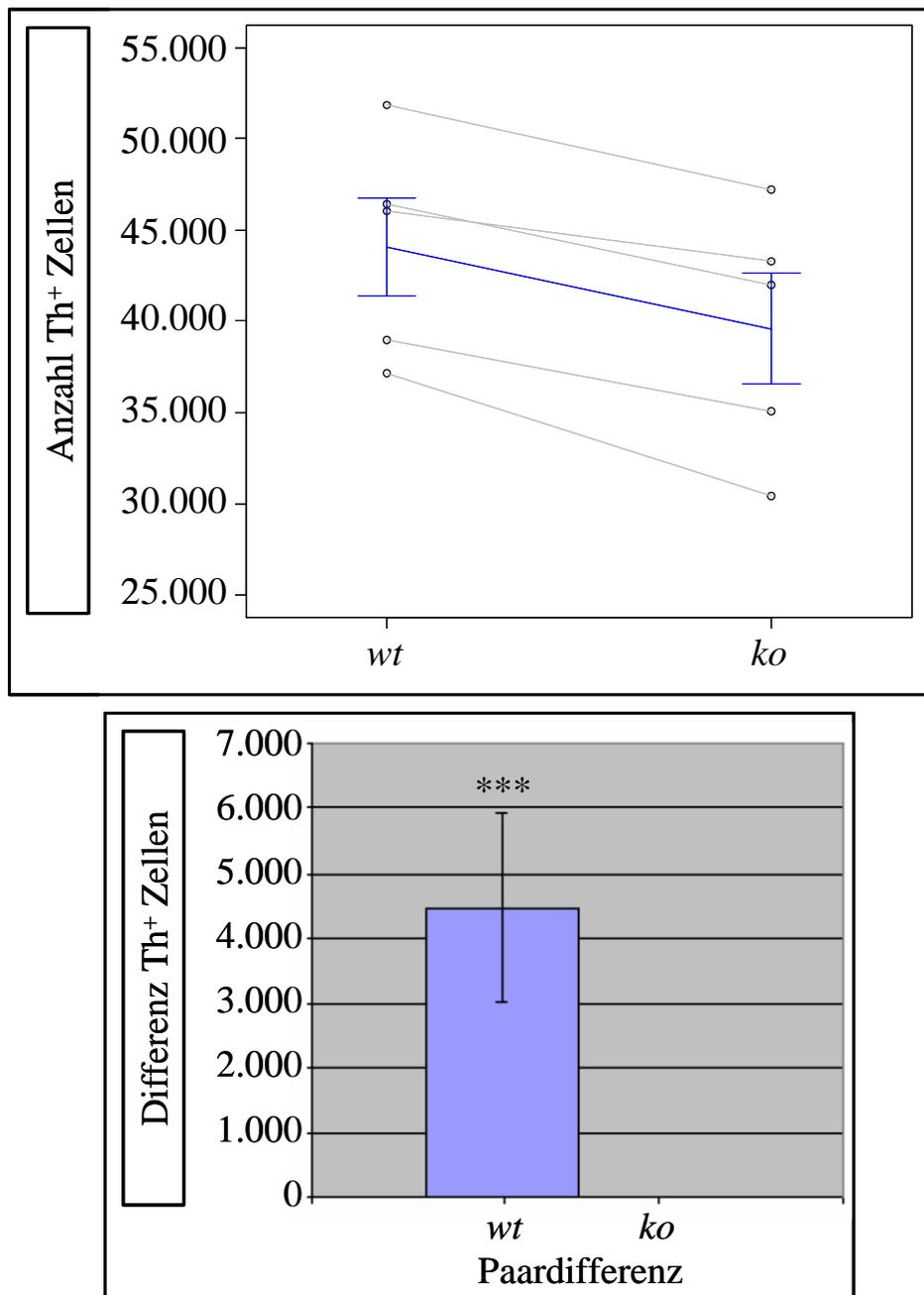


Abb. 30: Oben: die fünf untersuchten *wt/ko* Paare (Wurfgeschwister) sind jeweils durch Linien verbunden ($n = 5$). Diese Linien bzw. Korrelationen verlaufen nahezu parallel zueinander. Deshalb ist das Ergebnis des gepaarten T-Tests signifikant. Unten: Die gemittelte Paardifferenz ist signifikant größer als Null (gepaarter T-Test, $p < 0,003$). Der Unterschied zwischen den Genotypen beträgt ca. 4500 Zellen im Durchschnitt.

3.4.3. *In vivo* Chromatin Immunpräzipitation mit Lef1 Antikörper

Mit Hilfe der *Lef1 ko* Maus konnte gezeigt werden, dass zumindest eine Teilpopulation der mDA Neuronen in den Mutanten im Stadium E17.5 verloren geht. Die hier vermutete Bindung von Lef1 in der Promoterregion von *Pitx3* sollte zunächst untersucht werden. Der Hypothese nach wird *Pitx3* über das kanonische Wnt Signal und β -Catenin, welches an Lef1 (in der Promoterregion vom *Pitx3* Gen gebunden) bindet und damit aktiviert, verstärkt transkribiert.

Mit Hilfe einer *in silico* Analyse konnte unter Verwendung der Software DiAlign TF und MatInspector (Genomatix) (durchgeführt von D. Trümbach, IDG) die *Pitx3* Promoterregion analysiert werden. Dabei war es möglich sowohl im Mausgenom als auch bei der Ratte und dem Menschen Lef1 Bindestellen in der *Pitx3* Promoterregion festzustellen (Abb. 31).

Einige Lef1- Bindestellen (grüne Kreise) erscheinen im Maus- und Ratte-*Pitx3*-Locus hochkonserviert. Andere Lef1- Bindestellen (rote Kreise) sind zwischen den Nagern und dem Menschen hochkonserviert. Die 5' Promoterregion ist hier als gestrichelte Linie abgebildet, wobei ein schwarzer und ein weißer Balken zusammen 100bp darstellen. Die meisten Bindestellen befinden sich in den ersten 1200bp 5' vom Transkriptionsstart (TSS).

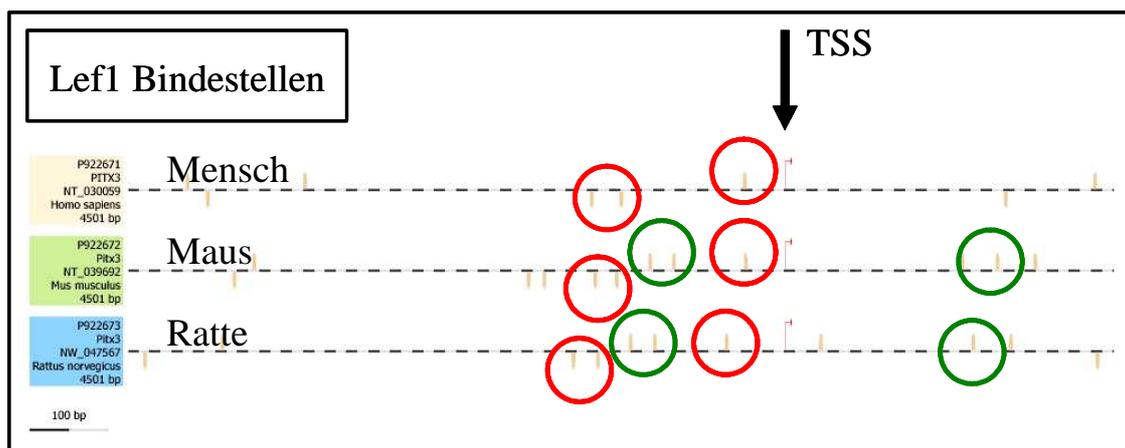


Abb. 31: *In silico* Analyse der Maus *Pitx3* 5'-Promoterregion im Vergleich zu den korrespondierenden *Pitx3* Genabschnitten der Ratte und des Menschen. Konservierte Bindestellen (Sequenz und Position) sind eingekreist. Grüne Kreise stehen für eine Konservierung zwischen Maus und Ratte, rote Kreise für eine Konservierung zwischen Maus, Ratte und Mensch. Der schwarze Pfeil deutet auf den Transkriptionsstart (TSS) des *Pitx3* Gens hin. Einige Bindestellen befinden sich 5' davon, andere befinden sich weiter 3'. Die gestrichelte Linie enthält auch eine Entfernungsinformation der Lef1 Bindestellen: Von einem waagerechten schwarzen Strich bis zum Nächsten sind es 100bp. Sind die Bindestellen nach oben gerichtet, so befinden sie sich auf dem Sinn-, sind sie nach unten gerichtet auf dem Gegen-Sinn-Strang.

Weitere Lef1 Bindestellen lassen sich 5' in einer Entfernung von mehr als 2400 bp vom TSS feststellen, diese sind jedoch nicht konserviert und fließen somit nicht in die weitere Untersuchung ein. 3' vom TSS, im ersten Intron von *Pitx3*, wurden ebenfalls noch einige Lef1- Bindestellen gefunden, von denen eine auch zwischen den Nagern konserviert ist. Die eingezeichneten Bindestellen oberhalb der gestrichelten Linie befinden sich auf dem Sinn- Strang; die unterhalb mithin auf dem Gegen-Sinn-Strang.

Damit konnte gezeigt werden, dass zumindest *in silico* Lef1 in der Promoterregion des *Pitx3* Gens bindet. Eine evolutionäre Konservierung, sowohl die Sequenz als auch die Position im *Pitx3* Locus betreffend, ist ein Hinweis auf die funktionelle Relevanz dieser Verbindung. Um diese vorhergesagten Bindestellen zu überprüfen und *in vivo* die Bindung von Lef1 im *Pitx3* Promoter nachzuweisen wurde eine Chromatin- Immun- Präzipitation (ChIP) durchgeführt.

Im Folgenden wurden für die ChIP Primerpaare designt, die die vorhergesagten Lef1 Bindestellen in der *Pitx3*- Promoterregion abdecken. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass die zu amplifizierende Bande zwischen 400 und 600 bp lag. Bei den vor allem im 5' Bereich dicht beieinanderliegenden Bindestellen war es nicht zu vermeiden, dass es einen gewissen Überlapp der Primer gab. Die Abdeckung des Gesamtbereiches der 11 vorhergesagten Lef1 Bindestellen ist in Abbildung 32 ersichtlich. Primerpaare 1, 2 und 3 lagen vor dem TSS, Primerpaare 5 und 6 dahinter. Das vierte Paar umspannte den TSS.

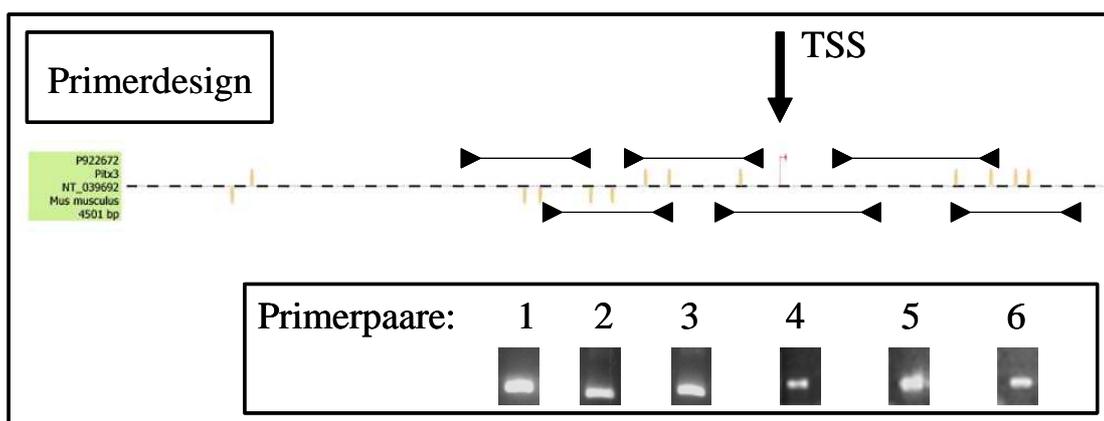


Abb. 32: Primerdesign für Lef1 ChIP. Die Pfeilspitzen umrahmen die zu amplifizierenden Genabschnitte. Das Amplikon ist jeweils als schwarze Linie dargestellt. Ein schwarz-weißer Abschnitt auf der gestrichelten Linie bedeutet 100 bp. Die Primer liegen jeweils zwischen 400 und 600 bp auseinander. Primerpaar 1, 2 und 3 liegen vor dem Transkriptionsstart (TSS), Primerpaar 4 umspannt den TSS und Primerpaar 5 und 6 befinden sich im ersten Intron. Die interessierenden Lef1 Bindestellen 1 bis 11 liegen innerhalb der sechs Primerpaare. Im unteren Teil des Bildes ist für jedes Primerpaar das Ergebnis der Test PCR auf CD1 *wt* DNA dargestellt.

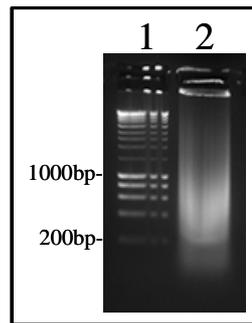


Abb. 33: Sonifikationsergebnis. Bande 1: Smartladder (200, 400, 600, 800, **1000**, 2000, 4000, 6000, 8000 und **10000**), Bande 2: DNA nach Sonifikation. Deutlich erkennbar hat der Grossteil der DNA-Fragmente eine Länge von 400 bis 1000bp.

Die erstellten Primer wurden an CD1 *wt* Maus DNA getestet (Abb. 32) und konnten, nach erfolgreicher Test- PCR, anschließend für die ChIP (durchgeführt mit Unterstützung von C. Peng) verwendet werden. Es sollte hier nachgewiesen werden, dass die vorhergesagten Lef1 Bindestellen *in vivo* genutzt werden. Daher war es notwendig für die ChIP, das ventrale Mittelhirn (hier entstehen die mDA Neuronen) von 18 CD1 Embryonen im Stadium E11.5 (*Pitx3* ist aktiv) zu präparieren. Die Zelllösung wurde entsprechend dem Protokoll (6.22.) sonifiziert. Die dabei erhaltene Fragmentgröße betrug ca. 400 – 1000bp (Abb. 33). Im theoretischen Optimalfall sind die Fragmente etwas größer als die Amplikons der erstellten Primer. Idealerweise werden dann mit Hilfe des Antikörpers DNA-Fragmente mit gebundenem Lef1 isoliert und per PCR vervielfältigt. Wären die meisten DNA Stücke zu kurz, so könnten die Primer nicht binden. Wären sie zu lang könnte nicht zwischen den Lef1 Bindestellen der einzelnen Primerpaare unterschieden werden.

In der Abbildung 34 ist der Input die hellste Bande. Dies ist die fragmentierte genomische DNA von CD1 Mäusen (ventrales Mittelhirn) vor der Immunpräzipitation. In dieser Probe sollten alle Gene der Maus repräsentiert sein und somit auch die verwendeten Primerpaare für die Lef1- ChIP ein Amplikon ergeben.

Die Bande der positiven Kontrolle (RNA Polymerase 2) ist schwächer zu erkennen. Die RNA Polymerase katalysiert die Transkription von DNA in RNA und ist demnach in einer Vielzahl an der DNA gebunden. Daher ist die Präzipitation mit dem Antikörper für dieses Enzym als Positivkontrolle für die Funktionstüchtigkeit der ChIP zu sehen. Im Fall des Primerpaar 6 ist das Signal weniger klar erkennbar.

Sowohl die Wasser- als auch die Negativkontrolle zeigen bei allen Primerpaaren kein Amplifikationsprodukt. Mit der Wasserkontrolle kann eine Verunreinigung der PCR

ausgeschlossen werden. Für die Negativkontrolle wurde der rIgG (rabbit Immunglobulin G) Antikörper verwendet, um eventuell unspezifische Bindungen der verwendeten rLef1 Antikörper (auch rabbit) aufzudecken.

Für die Lef1 Antikörper (AB1 = 2286, AB2 = 2230, Cell Signaling) konnte bei den Primerpaaren 1, 2 und 3 eine Bande detektiert werden, bei den Primerpaaren 4, 5 und 6 dagegen nicht.

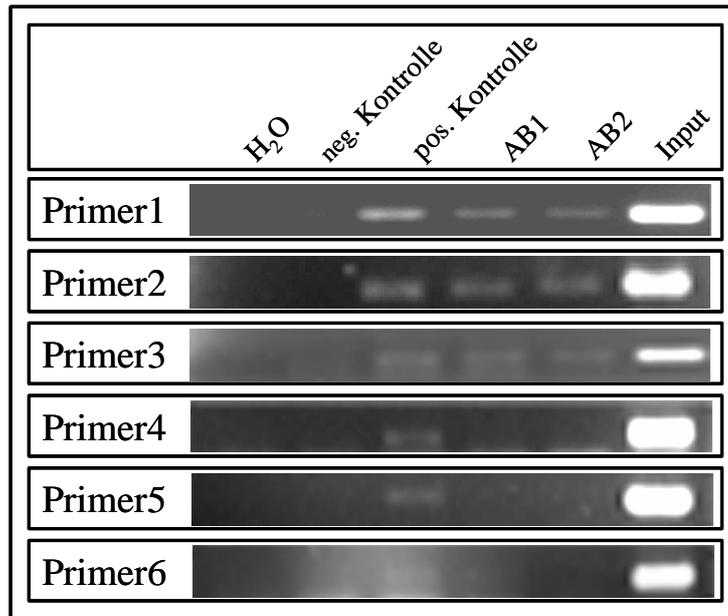


Abb. 34: ChIP Ergebnis. Nach Immunpräzipitation mit den Lef1 Antikörpern konnten nur mit den Primerpaaren 1, 2 und 3 eine Bande amplifiziert werden, was für eine Bindung der entsprechenden Region durch Lef1 spricht. „H₂O“ steht für die Wasserkontrolle der PCR, „neg. Kontrolle“ für die ChIP mit rIgG Antikörper, „pos. Kontrolle“ für die ChIP mit RNA Polymerase 2 Antikörper, „AB1“ (2286, Cell Signaling) und „AB2“ (2230, Cell Signaling) für die zwei verwendeten Lef1 Antikörper und „Input“ für die DNA direkt nach Sonifizierung. Von oben nach unten sind jeweils die Ergebnisse für die einzelnen Primerpaare dargestellt.

Die dargestellten Ergebnisse konnten in fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten reproduziert werden. Dies deutet auf eine Bindung des Lef1 Proteins innerhalb der Regionen, die mit den Primerpaaren 1, 2 und 3 amplifiziert werden können, hin.

3.4.4. Funktionale Analyse des *Pitx3* Promoters

Um die mit der *in silico* Analyse vermuteten und mit der ChIP *in vivo* nachgewiesenen Lef1 Bindestellen auf ihre Funktionalität hin zu untersuchen, wurde ein Reporterassay angestrebt. Mit Hilfe dieser funktionalen Analyse (Reporter/Luciferase Assay) und einer in Zukunft möglichen bindestellengerichteten Mutagenese ist auch eine genaue Aufschlüsselung der weniger als 100bp auseinander liegenden, vorhergesagten Bindestellen möglich.

Dabei sollte der Luciferaseassay in adherenten Zellkulturen durchgeführt werden. Die dargestellten Ergebnisse stehen unter einem Reproduktionsvorbehalt. Eine später erfolgte Resequenzierung der verwendeten Konstrukte ergab verunreinigte Vektorsequenzen in den Reporterkonstrukten.

3.4.4.1. Luciferaseassay in HCN, HEK-293 und COS7 Zellen

Für die funktionale Analyse des *Pitx3* Promoters wurde das Reporter/ Luciferase Assay an HCN, HEK-293 und COS7 Zellen (siehe 5.3.1.) durchgeführt. Dadurch sollte die mögliche Aktivierung des *Pitx3* Promoters durch den kanonischen Wnt-Signalweg bzw. β -Catenin überprüft werden. Das Leuchtkäferluciferase-reportergenkonstrukt enthielt die proximale Promoterregion des *Pitx3* Gens (D. Münster, 2005) und wurde zusammen mit den zu testenden Konstrukten (z.B. Δ N- β -Catenin) transfiziert.

Eine Aktivierung des Reportergens wird mit Hilfe der Leuchtkäferluciferase sichtbar. Der Renillazusatz im Mastermix diente jeweils als Normalisierungsluciferase (verwendete Mengen siehe 6.23.2.5.). Dies diente der Normalisierung der Transfektionseffizienz, d.h. bei Zellen, die in einem Well insgesamt wenig DNA aufgenommen haben, ist automatisch auch die Renilla- Lumineszenz geringer. In Abb. 36 ist also der Quotient aus Leuchtkäfer- und Renillalumineszenz dargestellt.

Bei jedem Experiment wurden drei technische Replikate erstellt, über die dann gemittelt werden konnte. Einzelne Experimente wiesen zum Teil eine hohe Schwankungsbreite (z.B. Abb. 36, C und D) auf, die Ergebnisse waren aber in den verschiedenen Assays nicht konstant. Aus diesem Grund ist hier nur beispielhaft ein Ergebnis gezeigt.

Der pcDNA3 Vektor (leerer Vektor) wurde als negativ Kontrolle transfiziert und für die Auswertung auf Wert 1 gesetzt. Prox1 sollte hierbei eine positiv Kontrolle sein (D. Münster, 2005). Δ N- β -Cat ist die N-Terminus mutierte Version des β -Catenin, welche dadurch nicht von Gsk3 β phosphoryliert werden kann. Die Erwartung, dass eine Transfektion von Δ N- β -Cat oder Lef1 allein (C, D) eine leichte und gemeinsam transfiziert (E) eine große Verstärkung des Luciferase Signals zeigen würde, war nicht signifikant bestätigbar.

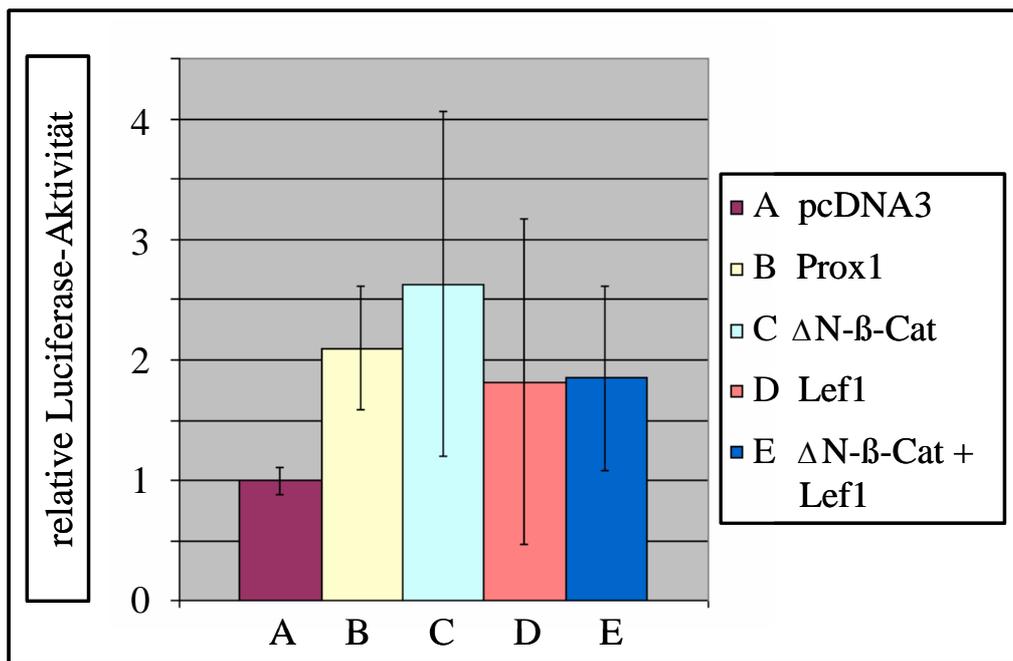


Abb. 36: Luciferaseassay in HEK-293 Zellen. A: Leervektor pcDNA3, B: Prox1 positiv Kontrolle, C: Δ N- β -Cat (es handelt sich hierbei um die n-terminal mutierte Version von β -Catenin), D: Lef1, in E wurden Δ N- β -Cat und Lef1 transfiziert. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität als Quotient aus Leuchtkäfer- und Renillaluciferase. Das Ergebnis der Transfektion mit pcDNA3 wurde auf 1 gesetzt, die anderen entsprechend skaliert. In dieser Abbildung ist nur ein Assay dargestellt. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die jeweils drei technischen Replikate. In diesem Fall sind besonders hohe Unterschiede in C und D gemessen worden.

3.4.4.2. Transfektionseffizienz und Test der Konstrukte

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse musste ausgeschlossen werden, dass die Transfektion oder die aktivierenden Konstrukte fehlerhaft sind.

Um die Transfektion/Elektroporation als Fehlerquelle auszuschließen wurde zu Beginn der Analysen jeweils Gfp, ebenfalls in Triplikaten, transfiziert. Dabei wurde qualitativ festgestellt, dass die Transfektionsrate der Gfp- Kontrolle per Elektroporation rund bei einem Drittel und per Transfektion mit Lipofektamin rund bei

der Hälfte aller Zellen lag. Dies war über mehrere Experimente konstant, so kann davon ausgegangen werden, dass die Transfektion in HEK-293, COS7 und HCN Zellen funktioniert.

Die verwendeten aktivierenden Konstrukte Δ N- β -Catenin und Lef1 hätten defekt sein können, deshalb wurden sie mit einem anderen Reporterkonstrukt (TOPflash) und der entsprechenden Kontrolle (FOPflash) (Korinek, Barker et al., 1997) getestet (Abb.37). TOPflash bedeutet Tcf optimal Promoter. Dieser Vektor besitzt in 5' und 3' Richtung je drei optimierte Tcf/Lef Bindestellen und kann somit als Positivkontrolle dienen, FOPflash ist dabei die negativ Kontrolle, da hier die Tcf/Lef Bindestellen mutiert sind und damit keine Bindung stattfinden kann. Der Zusatz von Δ N- β -Catenin und Lef1 in allen drei Ansätzen (A, B und C in Abb. 37) sollte im Fall von Gfp (A) sowie FOPflash (C) keine Aktivierung zeigen. Im Fall von TOPflash ist eine deutliche Aktivierung zu erwarten.

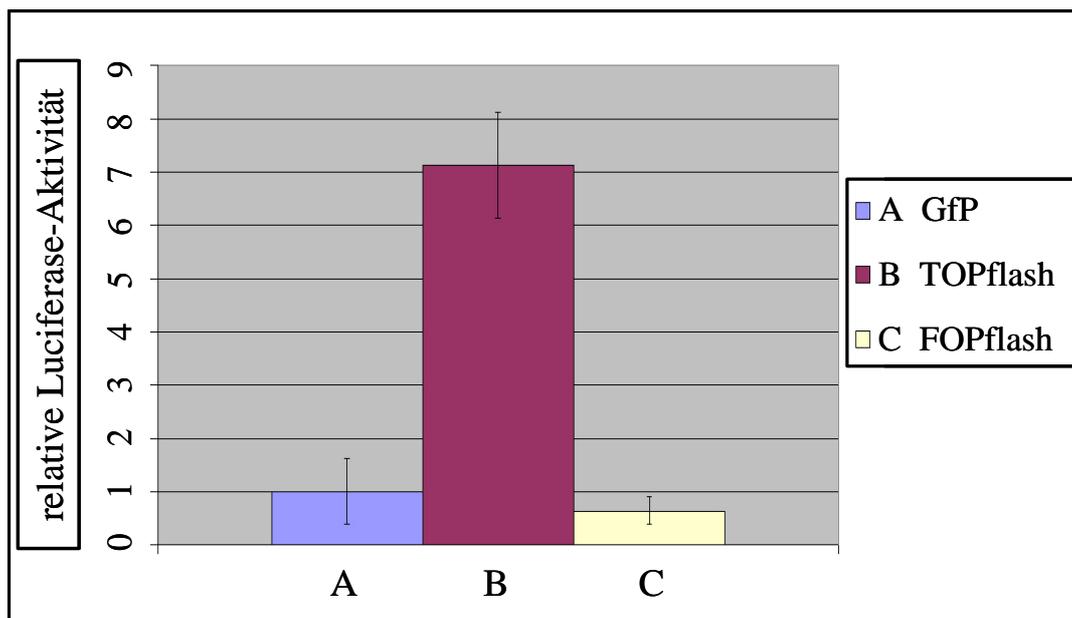


Abb. 37: Test auf Funktionalität der Konstrukte in HEK-293 Zellen. A: Gfp - Transfektionskontrolle, B: TOPflash - positiv Kontrolle, C: FOPflash - negativ Kontrolle. Der Mittelwert der relativen Luciferaseaktivität der Gfp Kontrolle wurde auf eins gesetzt. TOPflash zeigte eine ca. 7-fache Erhöhung, FOPflash eine minimale Reduktion.

In dem Experiment wurde deutlich, dass sowohl die Zellen als auch die Konstrukte für das Luciferaseassay funktionierten. TOPflash zeigte eine mehr als 7-fach erhöhte Luciferaseaktivität, FOPflash dagegen war kaum gegenüber der Gfp Kontrolle verändert.

Letztendlich konnte die Fehlerquelle durch Resequenzierung des Reporterkonstruktes entdeckt werden. Die festgestellten Mutationen (verunreinigte Vektorsequenzen, d.h. ganze Fragmente waren mutiert) erforderten eine Neuklonierung des *Pitx3*- Promoters.

3.4.5. Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der *Pitx3*^{+Gfp} Maus

Bekanntermaßen aktiviert LiCl den kanonischen Wnt-Signalweg indem es die Phosphorylierung von β -Catenin inhibiert (Hedgepeth, Conrad et al., 1997). Genaugenommen blockieren Li-Ionen das katalytische Zentrum von Gsk3 β , dadurch wird die Phosphorylierung von β -Catenin verhindert. Somit kann β -Catenin im Zytoplasma akkumulieren und der kanonische Wnt Signalweg induziert werden (Kioussi, Briata et al., 2002; Williams, Ryves et al., 2004).

Die Hypothese, dass *Pitx3* ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs ist, sollte hiermit überprüft werden. Die *Pitx3* Expression startet in Mausembryonen erst zwischen E11.0 und E11.5 (M.P. Smidt, van Schaick et al., 1997). Die endogene Gfp- Expression der *Pitx3*^{+Gfp} Embryonen kann erst ab E12.5 detektiert werden (S. Zhao, Maxwell et al., 2004).

Somit schien es möglich, durch eine Injektion von LiCl im Stadium E11.5 die sichtbare Gfp Expression schon einen Tag früher (E11.5 statt E12.5) zu detektieren. Der endogene Promoter ist also bereits aktiv und die Expression wird durch den kanonischen Wnt- Signalweg stark stimuliert.

Wenn die Hypothese stimmt, dass *Pitx3* ein direktes Zielgen vom kanonischen Wnt-Signalweg ist, so sollte es also zu einer Induktion von *Pitx3* im den mit LiCl behandelten Embryonen kommen. Durch die Expression von Gfp unter dem *Pitx3*- Promoter sollte diese Induktion bereits 3 Stunden nach Injektion (Kioussi, Briata et al., 2002) von LiCl unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

In Abbildung 35 ist beispielhaft ein Embryo abgebildet, der drei Stunden zuvor mit LiCl injiziert wurde. Deutlich ist die Expression im Auge (B) und im ventralen Mittelhirn (D), nach erfolgter „open Book“ Präparation (siehe 6.21.), zu erkennen.

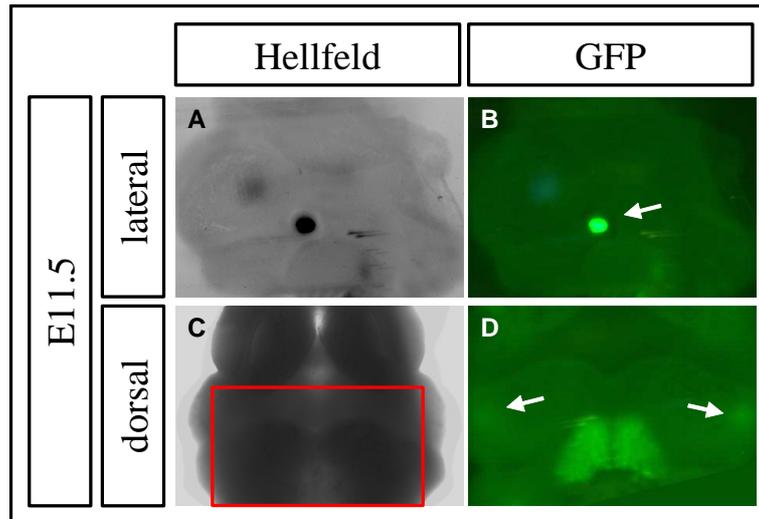


Abb. 35: Mit LiCl injizierter E11.5 Embryo der *Pitx3^{+/Gfp}* Maus. Hellfeld/Fluoreszenz Aufnahmen von sagittal (A/B) und dorsal (C/D). Rote Box in C markiert den Ausschnitt der Vergrößerung in D. Deutlich sichtbar ist die Pitx3 bzw. Gfp Expression im Auge (Pfeile in B, D) und im ventralen Mittelhirn (D).

Mithin konnte bei den mit LiCl behandelten Embryonen die erwartete Gfp Expression beobachtet werden. Jedoch war die mit H₂O injizierte Kontrollgruppe der Weibchen nicht trächtig gewesen und somit fehlt die Kontrolle. Aufgrund von Fertilitätsproblemen konnte dieses Experiment trotz erweiterter Ansatzes (bis zu 20 gleichzeitigen Verpaarungen) nicht statistisch abgesichert werden. Genauere Informationen zum Experiment befinden sich in den Methoden (6.21.).

4. Diskussion

Mittelhirn dopaminerge Neuronen gehören zu der Neuronenpopulation die in Parkinson Patienten zuerst degeneriert (Fahn, 2003; Fuchs, Mueller et al., 2007). Die Entstehung dieser Neuronen zu untersuchen und zu verstehen ist eine Notwendigkeit, um unter anderem zukünftig erfolgreiche Strategien für Therapien wie z.B. Zelltransplantationen zu entwickeln (Winkler, Kirik et al., 2005). Dabei erscheint es essentiell zu untersuchen, welche Bedingungen vorhanden sein müssen damit sich aus pluripotenten Zellen neuronale Vorläuferzellen entwickeln können, aus denen dann wiederum dopaminerge Neuronen entstehen.

Bekanntermaßen sind viele Transkriptionsfaktoren, wie Foxa1/2 (forkhead box A1/2), Lmx1a/b (LIM homeobox transcriptionfactor 1 alpha/beta) und der basic helix loop helix Familie, z.B. Neurogenin2, nötig, um diese mDA Neuronen im Bereich des isthmischen Organizers (IsO) entstehen und ausdifferenzieren zu lassen (Andersson, Tryggvason et al., 2006; Echevarria, Vieira et al., 2003; Ferri, Lin et al., 2007; Guo, Qiu et al., 2007; Kele, Simplicio et al., 2006). Weiterhin ist sicher, dass durch Wnt1 dopaminerge Neuronen ektopisch erzeugt werden können. Somit ist Wnt1 ausreichend für die Entwicklung dieser Neuronen. Andererseits ist Wnt1 aber auch notwendig um mDA Neuronen zu generieren, wie anhand von Mutanten gezeigt werden konnte, in denen das entsprechende Gen fehlte (Prakash, Brodski et al., 2006; Smidt & Burbach, 2007).

Wnt1 zählt höchstwahrscheinlich zu den Wnt- Liganden, die per kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg funktionieren (Prakash & Wurst, 2006; Andersson, Prakash et al., 2008). Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Entwicklung dopaminerger Neuronen des Mittelhirns untersucht. Speziell sollten folgende Teilbereiche des kanonischen Wnt Signalwegs genauer betrachtet werden:

1. die Aufnahme des extrazellulären Wnt Signals über die Fzd Rezeptoren 3 und 6 anhand von *ko* Mäusen,
2. die intrazelluläre Weiterleitung des Signals über den Transkriptionsfaktor Lef1 mit Hilfe der *Lef1 ko* Maus sowie Überprüfung der vorhergesagten Bindung von Lef1 in der Promoterregion des Zielgens Pitx3.

Zum ersten Teil ist bekannt, dass die insgesamt 10 in Vertebraten vorhandenen Frizzled Rezeptoren unterschiedliche Expressionsdomänen haben (Huang & Klein, 2004). Eine genauere Analyse hat ergeben, dass von 10 Fzd Rezeptoren lediglich

sechs in der mesencephalen Flexur exprimiert sind (Fischer, Guimera et al., 2007). Mit der mDA neurogenen Region in der Bodenplatte des Mittelhirns (Joksimovic, Yun et al., 2009) wiesen *Fzd3* und *Fzd6* einen vollständigen Überlapp auf. Dies ließ eine Weiterleitung des Wnt1 Signals über den Fzd6 und den Fzd3 Rezeptor vermuten (Fischer, Guimera et al., 2007).

Sollte sich einer der Fzd Rezeptoren als essentiell für die Entwicklung von mDA Neuronen herausstellen, so wäre eine „small compound“ Therapie (Zhang, Smith et al., 2005) denkbar. Zusammengefasst werden bei dieser Therapie Aktivatoren für den entsprechenden Rezeptor dem Patienten zugeführt und somit die Entwicklung von mDA Neuronen induziert. Bei fehlender Umsetzbarkeit der ‚extrazellulären‘ Therapie besteht ein Weg darin, die Entwicklung der mDA Neuronen intrazellulär zu beeinflussen. Hierbei könnte der Transkriptionsfaktor Lef1 in der Promotorregion des Zielgens *Pitx3* eine wesentliche Rolle spielen.

Zum zweiten Teil ist zu erwähnen, dass Wnt1 für die Ausdifferenzierung von mDA Neuronen notwendig ist, indem es den Transkriptionsfaktor Pitx3 vermutlich direkt reguliert (Prakash, Brodski et al., 2006). Pitx3 wiederum ist an der Entstehung der mDA Neuronen (SNc) beteiligt (Maxwell, Ho et al., 2005) welche bei Parkinson-Patienten zuerst degenerieren.

Die Expression des Transkriptionsfaktors Pitx3 ist erst ab dem Stadium E11.5 auf mRNA Ebene nachweisbar. Pitx3 ist dabei mit Th überlappend innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) nur im ventralen Mittelhirn in DA Neuronen exprimiert (Smidt, van Schaick et al., 1997). Pitx3 kann somit als sehr spezifischer Marker der mDA Neuronen im Mittelhirn gesehen werden.

Weiterhin ist bekannt, dass Lef1 an den *Pitx2* Promoter bindet, ein Gen, welches derselben homeobox Familie wie *Pitx3* angehört (Kioussi, Briata et al., 2002). Lef1 ist zudem in der mesencephalen Flexur, zur Zeit der Entstehung der mDA Neuronen, exprimiert. Weiterhin deuten die *in silico* Daten auf Lef1 Bindestellen im *Pitx3* Promoter hin.

Hier wurde nun der Transkriptionsfaktor Lef1 in Bezug auf die Bildung von mDA Neuronen sowie eine Verbindung zwischen Lef1 und *Pitx3* *in vitro* und *in vivo* untersucht.

4.1. Redundante Funktionen der Frizzled Rezeptoren in mDA Neuronenentwicklung

4.1.1. mDA Neuronen werden ohne Frizzled 6 Rezeptor entwickelt

Aufgrund der lokalisierten Expression von Fzd6 an der MHG und in der Bodenplatte der mesencephalen Flexur und damit innerhalb der mDA neurogenen Region (Fischer, 2006) bestand die Vermutung, dass Fzd6 eine wichtige Rolle in der Transduktion des Wnt1- Signals für die Entwicklung der mDA Neuronen spielt.

Die Analyse einer *Fzd6*^{-/-} Mutante, in der kein Fzd6 Protein hergestellt wird (Guo, Hawkins et al., 2004) zeigte jedoch, dass Fzd6 weder für die frühe Spezifizierung, noch für die Differenzierung, noch den Erhalt der mDA Neuronen notwendig ist.

Die Expressionsanalyse von MHG- Markergenen, wie Wnt1, Fgf8 und Gbx2 in der *Fzd6*^{-/-} Mutante, zeigte ebenfalls keine Veränderungen in der Etablierung dieser Grenze bzw. des isthmischen Organizers an dem Übergang zwischen Mittel- und Hinterhirn.

Zum Einen deutete die überlappende Expression des Fzd6 Rezeptors mit dem Fzd3 Rezeptor sowie möglicherweise noch weiteren Fzd Rezeptoren schon auf eine mögliche funktionelle Redundanz dieser Rezeptoren hin. Diese funktionelle Redundanz hat sich zumindest in Bezug auf die Entwicklung der mDA Neuronen sowie die Etablierung der MHG nach Analyse der *Fzd6*^{-/-} Mutante bestätigt. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Funktion des Fzd6 Rezeptors durch einen weiteren (z.B. Fzd3) Rezeptor in der Mutante kompensiert wird. Deshalb folgte die Analyse der *Fzd3*^{-/-} Mutante.

Zum Anderen ist nicht sicher, ob der Fzd6 Rezeptor am kanonischen Wnt-Signalweg beteiligt ist. Dieser wird ja sowohl der Entwicklung der mDA Neuronen, sowie der Etablierung der MHG zugrunde gelegt (Brault, Moore et al., 2001; Castelo-Branco, Wagner et al., 2003). Vorhandene Evidenzen weisen darauf hin, dass es ein PCP-Rezeptor sein könnte (Guo, Hawkins et al., 2004; Wang, Badea et al., 2006). So ist Fzd6 z.B. an der Haarmusterbildung beteiligt.

4.1.2. Auch die *Fzd3*^{-/-} Maus weist keinen veränderten mDA Phänotyp auf

Der *Fzd3*^{-/-} Einzel *ko* musste zunächst untersucht werden, um auszuschließen, dass dieser eventuell schon ein zum *wt* veränderten Phänotyp in Bezug auf mDA Neuronen aufweist.

Die daraus gewonnenen Ergebnisse zeigen einerseits, dass es keinen veränderten Phänotyp in den *Fzd6*^{-/-} und *Fzd3*^{-/-} Einzelmutanten gibt. Dabei liegt eine redundante Funktion beider Rezeptoren nahe, dieses resultierte in der Analyse der *Fzd3*^{-/-}/*Fzd6*^{-/-} Doppelmutante.

Andererseits ist auch hierbei nicht auszuschließen, dass *Fzd3* als PCP- Rezeptor in Frage kommt. Diese Vermutung liegt nah, da hier eine starke Ähnlichkeit mit dem in der *Wnt5a*^{-/-} *ko* Maus beobachteten Phänotyp besteht (Andersson, Prakash et al., 2008). *Wnt5a* wird aufgrund der vorhandenen *in vivo* Daten dem PCP Signalweg zugeordnet (Andersson, Prakash et al., 2008; Qian, Jones et al., 2007). Für die *Wnt5a*^{-/-} *ko* Maus wird im Stadium E12.5 eine ebenso deutliche Verbreiterung der mDA Neuronendomäne für die gleichen Marker (*Th*, *Pitx3* und *Slc6a3*) gezeigt. Die Verbreiterung dieser Domäne ist in der *Fzd3*^{-/-} *ko* Maus nämlich auch nur transient in den Stadien E12.5 und E13.5 beobachtet worden.

Allerdings konnte am adulten Tier diese Analyse nicht fortgesetzt werden, da die *Fzd3* homozygoten Tiere kurz nach der Geburt starben (Wang, Thekdi et al., 2002). Ein wie bei Wang beschriebenes spontan mutiert offenes Neuralrohr wurde in den 70 untersuchten *Fzd3* homozygoten Embryonen nicht festgestellt. Der eingedrehte bzw. geringelte Schwanz (Wang, Thekdi et al., 2002) hingegen war bei den meisten Mutanten zu finden.

4.1.3. Massiver dorsaler Neuralrohrdefekt - jedoch normale Entwicklung der mDA Neuronendomäne im *Fzd3/Fzd6* Doppel *ko*

Nachdem nun die *Fzd3* und *Fzd6* Einzelmutanten keine Veränderung in Bezug auf die Entwicklung von mDA Neuronen zeigen konnten, sollte als nächstes der *Doppel ko* in Betracht gezogen werden. Die Hypothese dazu ging davon aus, dass *Fzd3* und *Fzd6* redundant sind und beim jeweiligen *Einzel ko* der andere Rezeptor die Funktion

der Weiterleitung des Wnt1 Signals übernimmt. Im *Doppel ko* sollte dies ausgeschlossen sein.

Bei der Analyse der *Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-} ko* Maus ergaben sich folgende Situationen:

Eine reduzierte Fertilität bzw. Infertilität der Männchen zeigte sich bei allen (acht von acht) Männchen. Sie wiesen bei Entnahme der Epididymides keine Spermien auf. Das weist auf einen Defekt der Spermatogenese oder der hormonellen Stimulation der Gonaden in den mutanten Männchen hin, ähnlich der Beobachtungen von Wang (Wang, Guo et al., 2006). Die dort beschriebenen Männchen hatten aber nur eine 90%ige Reduktion der Spermienzahl, die aufgrund des Fehlens beider Fzd Rezeptoren auftrat. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht mit *Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-}* Männchen, sondern mit *Fzd3^{+/-}/Fzd6^{-/-}* Männchen gearbeitet.

In der Quintessenz stand damit eine eingeschränkte Anzahl an doppelmutanten Embryonen für die Analyse zur Verfügung. Die erwartete Häufigkeit (nach Mendelschen Regeln) für *Doppel ko* Embryonen bei den verwendeten Verpaarungen bzw. IVF lag zwischen 1/8 und 1/16.

Obwohl ein massiver dorsaler Neuralrohrdefekt in den Doppelmutanten auftrat, wurden die mDA Neuronen offenbar normal spezifiziert und differenzierten in ihren normalen Neurotransmitter- Phänotyp, was aufgrund der unveränderten Expression von Pitx3 und Th in den Doppelmutanten festgestellt wurde. Allerdings war, vermutlich aufgrund des massiven Neuralrohdefekts, die Morphologie der mDA Domäne und der Pou4f1⁺ Nucleus ruber Domäne in diesen Mutanten zum Teil deutlich verändert. Dieser Neuralrohrdefekt ist in den *Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-}* Embryonen die bedeutendste Veränderung zum Phänotyp des *wt*.

Wang (Wang, Guo et al., 2006) hatten bereits eine fast vollständige Penetranz eines Neuralrohrdefekts in den *Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-}* Doppelmutanten beschrieben, die als „offenes Neuralrohr“ bzw. Craniorachitis bezeichnet wurde. Dieser Defekt wurde von Wang jedoch nicht weiter analysiert und beruhte offensichtlich auf einer rein qualitativen, äußerlichen Beurteilung der präparierten Embryonen. Deshalb war auf die Beschreibung dieses Defekts in der vorliegenden Arbeit näher einzugehen.

Es konnte hier festgestellt werden, dass es im Bereich des Mittelhirns zu einer Schließung des Neuralrohrs kommt, jedoch dorsales Gewebe unkontrolliert in den dritten Ventrikel einwächst. Interessanterweise handelt es sich nicht um überproliferierendes Gewebe, da die Anzahl pH3⁺ Zellen im Verhältnis zur Größe der VZ nicht verändert war. Zudem lag eine klare Unterteilung in erstens die

proliferierende VZ (in der die pH3⁺ Zellen liegen), zweitens die Ascl1⁺/Sox2⁺ SVZ (die die Vorläuferzellen enthält), sowie drittens die NeuN⁺ Mantelzone (MZ) (die die postmitotischen Neuronen umfasst), vor. Die Aufteilung und Dichte dieser Zonen entsprach dem dorsalen Mittelhirn (Tectum), in dem die Neurogenese – im Gegensatz zum ventralen Mittelhirn – verzögert eintritt und zur Generierung der Schichten/Cortices der superioren Colliculi führt.

Ein weiterer Befund ist, dass die Marker für die Dachplatte *Lmx1a*, *Lmx1b* und *Wnt1* (Adams, Maida et al., 2000; Chizhikov & Millen, 2004), welche normalerweise nur in der dorsalen Mittellinie des Mittelhirns exprimiert werden, in einer dorso-ventral nach ventral verlaufenden, vertikalen Domäne innerhalb des eingewachsenen Neuroepithels exprimiert werden. Dies deutet darauf hin, dass zumindest einige der Positionssignale der dorsalen Mittellinie in dem einwachsenden Neuroepithel erhalten bleiben und dieses nicht in seiner Vollständigkeit dorsales Dachplattengewebe ist.

Obwohl der Mechanismus für diesen Defekt noch nicht vollständig analysiert ist, deuten die vorläufigen Befunde auf ein Mitwirken von Fzd3 und Fzd6 während der Schließung des Neuralrohrs. Es wird vermutet, dass es hier zu einer Unterbrechung des normalen Wachstums bzw. zu einem weiteren „Einschieben“ des neuroepithelialen Gewebes kommt, nachdem sich die äußeren Enden der Neuralplatte beim Auffalten zum Neuralrohr kontaktiert haben und zusammengewachsen sind.

Somit liegt nahe, dass Fzd3 und Fzd6 im nichtkanonischen PCP und nicht im kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiv sind. Der PCP – planare Zellpolarität – Signalweg leitet Signale ebenfalls über Fzd Rezeptoren und Dishevelled weiter, jedoch sind Lrp, β -Catenin und Tcf/Lef nicht an der Weiterleitung beteiligt (van Amerongen, Mikels et al., 2008). Der PCP Signalweg ist z.B. an der Ausrichtung von Zellen innerhalb einer Ebene und der konvergenten Extension beteiligt. Ähnlich der hier beschriebenen Ergebnisse (*Fzd3*^{-/-} Maus) wurde auch in *Wnt5a*^{-/-} Mutanten ein Defekt der konvergenten Extension festgestellt (Andersson, Prakash et al., 2008), was wiederum für eine Beteiligung von Fzd3 am PCP- Signalweg spricht.

Fischer (2006) stellte anhand von Expressionsdaten fest, dass *Fzd3* und *Fzd6* in der Region exprimiert sind, in der DA Neuronen entstehen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *Einzel ko*-Analyse und noch stärker die *Doppel ko*-Analyse zeigten, dass sehr wahrscheinlich zumindest ein weiterer Fzd Rezeptor (vermutlich Fzd9) im

ventralen Mittelhirn für die Weiterleitung des Wnt Signals zuständig sein muss. Es ist hierbei von einer weitaus größeren Redundanz auszugehen, als von Fischer angenommen. Für Fzd9 wurde bereits gezeigt, dass er im kanonischen Wnt-Signalweg ein Rezeptor für Wnt2 ist (Karasawa, Yokokura et al., 2002).

Nach Wang (Wang & Nathans, 2007) ist es auch möglich, dass Fzd3 und Fzd6 Funktionen im PCP Signalweg übernehmen. Dies würde auch andere Beobachtungen in *Fzd3^{-/-}*, *Fzd6^{-/-}* und *Fzd3^{-/-}/Fzd6^{-/-}* ko Mäusen erklären, wie Abnormalitäten in Haarmustern (Guo, Hawkins et al., 2004), Leitungsdefekte bei kommissuralen Axonen (Lyuksyutova, Lu et al., 2003; Wang, Zhang et al., 2006), Musterfehlern bei Sinneshaarzellen des Innenohrs und nicht zuletzt die fehlerhafte Einstülpung des Neuralrohrs (Wang, Guo et al., 2006). Defekte in korrekter Bildung des Neuralrohrs werden eher dem PCP Signalweg zugeschrieben (Ciani & Salinas, 2005).

Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass die Signalweiterleitung via PCP in Ratten eine Rolle bei der Fertilität der Männchen spielt (Beall, Boekelheide et al., 2005), was mit den hier dargestellten Beobachtungen übereinstimmt.

4.2. *Lef1* ist sowohl in der Spezifikationsphase als auch in der frühen Differenzierungsphase im ventralen MH exprimiert

Mit der im vorherigen Kapitel beschriebenen Analyse war es nicht möglich einen Rezeptor zu identifizieren, der für die Entwicklung von mDA Neuronen von Bedeutung ist. Somit ist der Ansatz, mit Hilfe von spezifischen Liganden, sogenannten „small compounds“ (Zhang, Smith et al., 2005), die Entwicklung von mDA Neuronen im therapeutischen Sinne *in situ* anzuregen, vorerst nicht verwirklichtbar. Als nächstes sollte die intrazelluläre Stimulierung des kanonischen Wnt- Signalwegs näher in Betracht gezogen werden. Dafür ist aber zuerst der Nachweis zu erbringen, dass dieser Signalweg auch für die Entwicklung der mDA Neuronen zuständig ist. Dabei sind die intrazellulären Faktoren bedeutend.

Die Tcf/Lef Transkriptionsfaktoren binden in der Promoterregion von Zielgenen und können durch aktives kanonisches Wnt Signal vom Repressor zum Aktivator werden. Bereits *in vivo* wurde nachgewiesen, dass β -Catenin an Lef1 bindet (Lin, Cui et al., 2007).

Insgesamt wird von vier Tcf/Lef Faktoren im Mausgehirn ausgegangen (Billin, Thirlwell et al., 2000). *Tcf1* (neu: *Tcf7*) ist nicht im ventralen Mittelhirn exprimiert (Oosterwegel, van de Wetering et al., 1993), ebenso wie *Tcf3* (neu: *Tcf711*) und *Tcf4* (neu: *Tcf712*) die nur im Vorderhirn exprimiert sind (Galceran, Farinas et al., 1999).

Lediglich *Lef1* wird im Mittelhirn vermutet (Oosterwegel, van de Wetering et al., 1993). Diese publizierten Expressionsdaten wurden jedoch nur in bestimmten Embryonalstadien durchgeführt. Deshalb sollte eine detailliertere Expressionsanalyse in dieser Arbeit Aufschluss über die genaue Lokalisierung von *Lef1* zu den wichtigen Embryonalstadien E10.5 und E12.5 bringen.

In dieser Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass *Lef1* in der Region im Mittelhirn exprimiert ist in der mDA Neuronen entstehen. Bei den drei Stadien E9.5, E10.5 und E12.5 ist die mRNA von *Lef1* in der mesencephalen Flexur zu detektieren. Dies bestätigt frühere Ergebnisse (Oosterwegel, van de Wetering et al., 1993) und kann ein Hinweis darauf sein, dass *Lef1* im kanonischen Wnt Signalweg für die Entwicklung von mDA Neuronen eine Rolle spielt, da es zumindest zur „richtigen Zeit“ am „richtigen Ort“ vorgefunden wird.

4.2.2. Im *Lef1 ko* sind 10% weniger Th⁺ Neuronen im Stadium E17.5 detektierbar

Im Anschluss an die Expressionsstudie wurde die *Lef1 ko* Maus untersucht, um die Funktion von *Lef1* *in vivo* zu überprüfen. Dabei zeigte es sich, dass es trotz der nachgewiesenen Expression von *Lef1* und der starken Beeinträchtigung der Maus (van Genderen, Okamura et al., 1994) qualitativ keinen Unterschied zwischen der Expression von Th und Pitx3 in *wt* und *Lef1^{-/-}* Embryonen zu geben scheint.

Die Quantifizierung von Th⁺ Neuronen in E17.5 Embryonen weist aber eine signifikante ($p < 0,003$) Reduktion um 10% Th⁺ Zellen in den Mutanten auf. Ob und wann jedoch die Anzahl von Pitx3⁺ Zellen in den *Lef1^{-/-}* Embryonen möglicherweise ebenfalls reduziert ist, muß offen bleiben.

Zum Einen ist kanonisches Wnt- Signal für die Expression von Pitx3 zuständig (Prakash, Brodski et al., 2006). Zum Anderen haben Maxwell et al. (Maxwell, Ho et al., 2005) gezeigt, dass es zwischen E12.5 und E13.5 eine Subpopulation Pitx3⁺ aber Th⁻ sowie Th⁺ aber Pitx3⁻ Zellen im ventralen MH gibt und diese sich auch in

ihrer Position im ventralen Mittelhirn unterscheiden. Weiterhin ist bekannt, dass in den *aphakia* Mutanten (*Pitx3*^{-/-}) zuerst nur die Subpopulation fehlt, die Pitx3 vor Th exprimiert, der Entwicklungsphänotyp in dieser Mutante sich also nur auf diese Subpopulation beschränkt. Demnach liegt nahe, dass kanonisches Wnt- Signal zunächst nur diese Subpopulation (Pitx3⁺/Th⁻) reguliert, und dass eventuell nur diese Subpopulation in den *Lef1*^{-/-} Embryonen betroffen ist.

Mithin ist eine Quantifizierung Pitx3⁺/Th⁺ Zellen in frühen (E12.5, E13.5) und späten (E17.5) Stadien zukünftig von Bedeutung.

Dabei muss ausgeschlossen werden, dass andere Tcf-Faktoren im ventralen Mittelhirn exprimiert werden. Dafür sollte eine genaue Kartierung der Expressionen der 3 Tcf Faktoren in *wt* Embryonen in Ergänzung zu vorhandenen Daten folgen (Galceran, Farinas et al., 1999; Oosterwegel, van de Wetering et al., 1993). Jedoch ist auch eine kompensatorische Hochregulation der Tcf Faktoren im *Lef1*^{-/-} zu beachten.

4.2.3. Lef1 bindet in der Promoterregion des *Pitx3* Gens *in vivo*

Mit dem Genomatix MatInspector Programm wurden 2005 11 Lef1- Bindestellen im *Pitx3* Promoter der Maus vorhergesagt (D.Trümbach, persönliche Mitteilung, 2005). Da sich die zugrunde liegenden Datenbanken/Matrizen ständig verändern und erneuert werden, muß diese Analyse regelmäßig wiederholt werden.

Im Gegensatz zum *Pitx2* Gen (Kioussi, Briata et al., 2002) – in dem nur eine Lef1 Bindestelle erkannt wurde – genügt es beim *Pitx3* Gen nicht, nur ein Primerpaar zu verwenden. Vielmehr ist es notwendig, zwischen 11 interessierenden Lef1 Bindestellen zu unterscheiden.

Die Bindung von Lef1 wurde innerhalb von drei Bereichen, in der ca. 1400bp großen, 5' vom TSS gelegenen Promoterregion, detektiert. Diese Bereiche enthalten zwei, zum Teil drei zwischen Maus und Ratte, teilweise auch zwischen Maus, Ratte und Mensch hochkonservierte Lef1 Bindestellen, welche *in silico* vorhergesagt wurden. Eine Bindung von Lef1 an den erwarteten Lef1 Bindestellen im ersten Intron des *Pitx3* Gens der Maus konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Bindestellen können somit als funktionale Bindestellen *in vivo* ausgeschlossen werden. Es ergeben sich bei dieser Analyse aber folgende Diskussionspunkte:

Da die per ChIP-PCR nachgewiesene Bindung von Lef1 in diesen Regionen zwei, resp. drei mögliche Lef1 Bindestellen im *Pitx3* Promoter betrifft, ist nicht definiert, welche Lef1 Bindestellen durch Lef1 gebunden werden. Eine Aufschlüsselung per PCR ist aufgrund der weniger als 100bp auseinander liegenden, erwarteten Bindestellen nicht mehr möglich. Deshalb sollten zukünftig funktionale Analysen wie das Luciferase Assay und Bindestellengerichtete Mutagenese durchgeführt werden. Bei der ChIP-Analyse wurde gesamtes Gewebe - Neuralgewebe, aber auch darunter liegendes Mesenchym - der Mittelhirnregion von E11.5 Embryonen verwendet. Lef1 ist auch im Mesenchym exprimiert, das das Neuralrohr in diesem Stadium umgibt. Eine Bindung von Lef1 an den *Pitx3*-Promoter in nicht-neuralem Gewebe erscheint möglich.

Die Angaben zu den vorhergesagten Lef1 Bindestellen im *Pitx3*-Promoter haben sich in der Zwischenzeit in den Datenbanken verändert, so dass eine genaue *in silico* Analyse bei weiteren Forschungen in dieser Richtung zu wiederholen ist.

4.2.4. Luciferaseassay - Funktionsanalyse des *Pitx3* Promoters

Die Ergebnisse des Luciferaseassay waren nicht reproduzierbar, obwohl die Funktionalität der verwendeten *Lef1* und ΔN - β -*Catenin* cDNA mittels TOP- und FOP-flash Reportern sichergestellt werden konnte und Transfektions- bzw. Elektroporationsartefakte ausgeschlossen werden konnten.

Wie sich später herausstellte, waren die *Pitx3* Reporterkonstrukte mit Vektorsequenzen kontaminiert (N. Ahmad, persönliche Mitteilung, 2008) und daher eigentlich nicht brauchbar. Das *Pitx3* Reporterkonstrukt muß zukünftig deshalb neu kloniert werden bzw. von anderen Quellen (Peng, Fan et al., 2007) bezogen werden. Anschließend könnten dann auch oben angesprochene mutagenisierte Konstrukte im Luciferaseassay Verwendung finden, denen genau die Lef1 Bindestellen des *Pitx3* Promoters fehlen, die per ChIP (Vergleich 3.4.3.) bestätigt wurden.

In vitro wurde gezeigt, dass kanonisches Wnt Signal, bzw. β -Catenin und Lef1 zusammen eine sehr starke Aktivierung eines nachgeschalteten Promoters aufweisen (Lin, Cui et al., 2007). Dies sollte mit dem neuen *Pitx3* Reporterkonstrukt ebenso möglich sein. Die Abhängigkeit der Aktivierung des *Pitx3*-Targetgens vom aktiven kanonischen Wnt Signalweg könnte überprüft werden, indem die erwähnten

mutagenisierten Konstrukte dann keine Aktivierung mehr durch *Lef1/ΔN-β-Catenin* zeigen.

4.2.5. Ausblick zum LiCl induzierten kanonischen Wnt Signal in der *Pitx3^{+Gfp} ko* Maus

In der *Wnt1 ko* Maus wird Pitx3 nicht in mDA Neuronen exprimiert und ist damit vermutlich ein direktes Zielgen von Wnt1 (Prakash, Brodski et al., 2006). Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob Pitx3 durch den kanonischen Wnt Signalweg aktiviert werden kann.

Bei den *Pitx3^{+Gfp}* Experimenten handelt es sich um einen ersten Versuch nachzuweisen, dass der *Pitx3*- Promoter bzw. die Pitx3- Expression *in vivo* durch den via LiCl induzierten kanonischen Wnt- Signalweg aktiviert wird (Hedgepeth, Conrad et al., 1997; Klein & Melton, 1996; Stambolic, Ruel et al., 1996). Ähnliche Experimente, allerdings mit einer lacZ/β-Gal Reporter Maus, wurden von Kioussi et al. durchgeführt (Kioussi, Briata et al., 2002).

In der *Pitx3^{+Gfp}* Maus ist eine Gfp Fluoreszenz erst ab E12.5 detektierbar (S. Zhao, Maxwell et al., 2004), also einen Tag nach der Aktivierung des endogenen *Pitx3*- Promoters (M.P. Smidt, van Schaick et al., 1997). Die Initialisierung des kanonischen Wnt Signalwegs durch intraperitoneale Injektion von LiCl von trächtigen Weibchen am Tag E11.0 – E11.5 sollte also zu einer verstärkten Aktivierung des *Pitx3*- Promoters und somit zu einer vorzeitigen Detektion der Gfp Fluoreszenz am Tag E11.5, also einen Tag früher als beschrieben (S. Zhao, Maxwell et al., 2004) in den behandelten - nicht aber in den unbehandelten - Embryonen führen. Diese Hypothese konnte bei den mit LiCl injizierten Embryonen (E11.5) bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dieses Experiment an Zellkulturen durchzuführen, die aus dem ventralen Mittelhirn der *Pitx3^{+Gfp}* Embryonen angelegt werden. So wäre eine Quantifizierung auf mRNA und Proteinebene möglich.

5. Material

5.1. Technische Geräte

Im Folgenden soll nur die Auswahl der Geräte inklusive der Herstellerangaben aufgelistet werden, die für eine Reproduktion der Daten entscheidend sind.

Einbettautomat	Leica, TP1020
Filmentwicklermaschine	Agfa, Curix 60
Geldokumentation	Herolab
Gelelektrophoresekammern	MWG Biotech; PeqLab
Hybridisationsofen	ThermoHybaid; UVP, Hybridizer HB100
Inkubator für Zellkultur	Heraeus
Isotopenzähler	Scott-lab, Easicount 400
Kamera	Zeiss AxioCam MRc, HRc
Luminometer	Berthold Technologies, Centro LB960
Mikroskop	Zeiss Axioplan 2 imaging, Stemi SV 6
Mikrotom	Microm, HM 355 S
Paraffineinbettstation	Sakura, Tissue-TEK [®] TEC
PCR Maschine	Eppendorf, Mastercycler Gradient
pHmeter	WTW, pH 538
Photometer	Eppendorf, Biophotometer
Reinstwasseraufbereitungssystem	Millipore, MilliQ
Spannungsquelle für Gelelektrophorese	E-C Apparatus Inc., EC 250-90, EC 3000-90 Consort, E443
Tischthermostat	Eppendorf, Thermomixer 5463 Comfort
Zentrifuge	Sorvall, RC5C Plus, Rotor: GSA, SA600; Heraeus Biofuge pico/fresco, Variofuge 3.0R; Hettrich, Universal 30F, Eba 12

5.2. Verbrauchsartikel

24, 48 Loch Platten	Nunc
DPX Einschlussmittel	Fluka
Einschlussmittel Immuno	Polyscience, Aqua Poly/Mount

Fotoemulsion, Entwickler, Fixer	Kodak, New Haven, USA
Kulturschalen	Greiner Labortechnik, Frikenhausen
Radioaktivschutz– Filmkassetten	Amersham, Freiburg
Smartladder® DNA Standard	Eurogentec, Köln
steriles Wasser (Ampuwa®)	Fresenius AG, Bad Homburg

5.3. Biologisches Material

5.3.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden HCN, COS7 und HEK-293 Zellen verwendet. Die adherenten HCN Zellen sind immortalisierte neurale Stammzellen, die ursprünglich aus dem Hippocampus von adulten Ratten stammen (bezogen von D.C. Lie, Helmholtz Zentrum München).

Bei COS7 Zellen handelt es sich um immortalisierte Nierenzellen, welche ursprünglich aus der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen wurden. HEK-293 (human embryonic kidney) Zellen sind immortalisierte humane embryonale Nierenzellen. Diese Zellen sind in der ATCC archiviert.

5.3.2. Mauslinien

Die einzelmutanten Mauslinien *Fzd3* und *Fzd6* wurden von J. Nathans, Baltimore (USA) bezogen. Die Doppelmutante entstand durch jeweils heterozygote Einkreuzung.

Die *Lef1 ko* Maus stammt dem Labor von R. Grossschaedl, Freiburg (D).

Die *Pitx3^{+Gfp}* Maus wurde von Meng Li, Edinburgh (GB) bezogen.

CD1 wt Mäuse wurden bestellt bei Charles River, Deutschland.

6. Methoden

6.1. Isolation von DNA

6.1.1. Isolation von DNA aus PCR Reaktionen und Gelen

Zur Isolation von DNA aus PCR Reaktionen kam das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) zum Einsatz. Die Aufreinigung wurde mit einer Tischzentrifuge (10.000x g) durchgeführt. Die Isolation von DNA Banden aus Gelen erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Die DNA Bande konnte mit einem Skalpell aus dem Gel heraus geschnitten und laut Protokoll aufgereinigt werden. Dabei sollte die dreifache Menge an Puffer im Vergleich zur Menge des Gelausschnitts verwendet werden.

6.1.2. Isopropanol Präzipitation

Das Ziel die DNA aus einer Lösung zu fällen, konnte durch Zugabe von 10% 3M Natriumacetat (pH 5) sowie 100% Isopropanol umgesetzt werden. Nach kurzem Schwenken der Lösung wird die DNA sichtbar und lässt sich bei 16000 – 20000x g abzentrifugieren (2min.). Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert. Nach dem Dekantieren erfolgt ein kurzes Zentrifugieren, um restlichen Alkohol mit einer Pipette aufnehmen zu können. Die anschließende Trocknung des Pellets erfolgte bei 37°C 10min. lang, um danach in Wasser oder TE Puffer gelöst zu werden.

6.1.3. Isolation von DNA aus Mausschwänzen

6.1.3.1. Isolation der DNA mit Aufreinigung

Für die saubere Isolation der DNA kam das Wizard Purifikation Kit von Promega zur Anwendung. Das Originalprotokoll wurde an folgenden Stellen modifiziert, um einen höheren Probendurchsatz zu erreichen:

1. Zugabe von 480µl Nuclei Lysis Solution + 100µl EDTA + 20µl Proteinase K (20mg/ml). Inkubation ü.N. bei 55°C und 600rpm.
2. Zu den 30min. bei Raumtemperatur (RT) abgekühlten Proben 3µl RNase A zufügen. Die Proben 25x schwenken, dann 30min. bei 37°C inkubieren.
3. Die wiederum auf RT abgekühlten Proben mit 200µl Protein Precipitation Solution versetzen, vortexen und für 12min. bei -20°C einfrieren.

4. Nun bei 20.000x g 10min. zentrifugieren. Das präzipitierte Protein bildet ein Pellet. Den DNA-haltigen Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferieren.
5. 600µl Isopropanol dazugeben und 10x schwenken. Die DNA wird sichtbar.
6. Nach dem Zentrifugieren (2min. bei 20.000x g) den Überstand verwerfen.
7. Zum Waschen 600µl 70%-iges Ethanol zugeben und 10x schwenken.
8. Nach dem anschließenden Zentrifugieren (1min. bei 20.000x g) Überstand dekantieren, die Probe kurz abzentrifugieren und restliches Ethanol abpipettieren, danach die DNA 10 min. bei 37°C trocknen.
9. 100µl DNA Rehydration Lösung zugeben und bei 4°C aufbewahren.

6.1.3.2. Isolation der DNA ohne Aufreinigung

Viele der verwendeten Primer funktionierten äußerst robust in den Genotypisierungs-PCR. Deshalb konnte hierbei ein vereinfachtes Protokoll, mit einer Zeitersparnis von 2 Stunden/ 100 Proben (im Vergleich zu 6.1.3.1.), verwendet werden.

Die Größe des Gewebes (adulte Tiere) bestimmte die Menge an Puffer (100µl bis 500µl) und Proteinase K (1,5µl Prot.K. je 100µl Puffer).

Puffer Herstellung:	<u>Konzentration</u>
	50mM KCl
	10mM Tris-HCl (pH 8,3)
	2,5mM MgCl ₂
	0,1mg/ml Gelatine
	0,45% NP-40 V/V
	0,45% Tween20 V/V

Um den Genotyp von Mausembryonen zu bestimmen, wurde ein Stück des Embryoschwanzes abgenommen und mit 125µl Embryo Lysis Puffer + 0,25µl Prot.K. versetzt.

Embryo Lysis Puffer:	<u>Konzentration</u>
	50mM KCl
	10mM Tris-HCl (pH 8)
	1,5mM MgCl ₂
	0,45% NP-40 V/V
	0,45% Tween20 V/V

Die Proben wurden bei 55°C und 600rpm ü.N. inkubiert und anschließend 15min. bei 94°C erhitzt, um die Prot.K. zu inaktivieren. Nach dem Zentrifugieren (13500x g) in der Tischzentrifuge erfolgt die Lagerung der Proben bei 4°C.

6.2. Bestimmung der Konzentration von DNA

Das BioPhotometer (Eppendorf) diente der Messung der Konzentration von DNA sowie RNA. Die Qualität der aufgereinigten DNA bzw. RNA wurde mit der Ratio (meist 1,6) der Absorbtionswerte bei 260nm und 280nm bestimmt.

6.3. RNA Präparation aus Zellen

Die Präparation von RNA erfolgte RNase-frei mit Einmalhandschuhen, autoklavierten Lösungen und gebackenen Glaswaren. Das Medium der adherenten Zellen wurde abgesaugt, dann mit PBS gewaschen. Es kam das TRIzol (Invitrogen, 15596-026) Protokoll zur Anwendung. Die abschließende Messung der Konzentration (zwischen 1,7 und 2,0) als Qualitätskontrolle fand letztlich im Photometer (A260/280) statt.

6.4. cDNA Synthese durch RT - PCR

Für die cDNA Synthese aus RNA wurde das Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech) eingesetzt. 3µl der verdünnten cDNA (100µl) waren für die anschließende PCR bestimmt.

Für einen 20µl Ansatz gilt folgende Zusammenstellung:

xµl	H ₂ O (Gesamtvolumen 20µl)
10%	10x Puffer
5%	DMSO
250µmol	dNTP's
10pmol	Primer vorwärts
10pmol	Primer rückwärts
0,25U	Red Taq® Polymerase (Sigma, 8312)
3µl	cDNA

Standard Programm: 94°C 5min.; 94°C 30sek., 56°C 45sek., 72°C 30sek. 36x; 72°C 5min.; 4°C ∞

6.5. Klonierung

Klonierungen erfolgten mit dem Topo TA Cloning® Kit (Invitrogen). PCR Produkte wurden nach mitgeliefertem Protokoll in den pCRII TOPO Vektor (siehe 9.4.) kloniert und anschließend in chemisch kompetente Zellen (DH5 α) transformiert.

6.6. Transformation von chemisch kompetenten Bakterienzellen

200 μ l chemisch kompetente Bakterienzellen (bei -80°C gelagert) werden 10min. auf Eis aufgetaut und danach 1 μ l des Ligationsansatzes hinzugegeben. Es folgt nach 20min. auf Eis ein Hitzeschock (35sek. bei 42°C). Nach weiteren 2min. auf Eis und Zugabe von 900 μ l LB Medium genau 45min. bei 37°C auf einem Schüttler inkubieren. Im Folgenden werden 100 μ l auf einer Agarplatte, die Ampicillin bzw. Kanamycin enthält, mit einem Drigalskispatel verteilt und für bis zu 16Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wird eine Starterkultur mit 3ml LB Medium und dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt. Nach 4-6 Stunden folgt eine Großkultur mit 150ml LB Medium mit Antibiotikum und 150 μ l Starterkultur ü.N. bei 37°C auf einem Schüttler. Letztlich wird die Plasmid DNA aufgereinigt (s. 6.7.2.).

6.7. Plasmid DNA

6.7.1. Aufspaltung von Plasmid DNA

Die Spaltung der Plasmid DNA geschah mit Restriktionsendonukleasen. Es kamen dabei 1-10 units pro 1 μ g DNA entsprechend der Produkthanleitung zum Einsatz.

<i>in situ</i> Probe	Restriktionsendonuklease	Polymerase
<i>Aldh1a1</i> (Niederreither, Fraulob et al., 2002)	BamH I	T7
<i>Fgf8</i> (Martinez, Crossley et al., 1999)	Pst I	T7
<i>Gbx2</i> (Puelles, Acampora et al., 2003)	Hind III	T7
<i>Lef1</i> (S.Stübner)	Spe I	T7
<i>Nr4a2</i> (Brodski, Weisenhorn et al., 2003)	Hind III	T7
<i>Pitx3</i> (Brodski, Weisenhorn et al., 2003)	Not I	Sp6
<i>Shh</i> (Epstein, McMahon et al., 1999)	Hind III	T3
<i>Slc6a3</i> (Brodski, Weisenhorn et al., 2003)	Hind III	T7
<i>Th</i> (Brodski, Weisenhorn et al., 2003)	Sph I	Sp6
<i>Wnt1</i> (Fischer, Guimera et al., 2007)	Hind III	T7

Tab. 2: Verwendete *in situ* Proben mit zugehörigen Restriktionsendonukleasen für Herstellung der Gegen-Sinnprobe.

6.7.2. Plasmid DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von Plasmid DNA aus geringen (5ml) oder größeren (150ml) Mengen von Bakterienzellen erfolgte unter Verwendung des mitgelieferten Protokolls des Miniprep Kit resp. Maxiprep Kit von Qiagen.

6.8. DNA Sequenzierung

DNA Sequenzierungen liefen in der Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) ab.

6.9. Herstellung von Glycerolstocks

Für Glycerolstocks wurden 800µl der Großkultur (Übernachtkultur) mit 800µl autoklaviertem 40%-igem Glycerol/LB Medium gemischt und in einem Schraubröhrchen bei -80°C aufbewahrt.

6.10. Gelelektrophorese

Die Konzentration des Agarosegels wurde je nach zu trennender DNA-Größe gewählt. Für besonders lange DNA, z.B. 10kb bot sich eine Konzentration von 0,8% Agarose an. Zur Trennung von kurzen Banden (von 100 bis 300bp) wird die Konzentration auf 2,5% angehoben. Das Sichtbarmachen der DNA gelang über die Zufuhr von 1µg/ml Ethidium Bromid (EtBr) zum Gel. EtBr interkaliert zwischen die Basen der DNA und fluoresziert bei 312nm und 366nm (UV Licht).

Die Probe konnte mit 5x loading buffer (Bioline, Bio-37045) versetzt und dann auf das Gel aufgetragen werden. Das Gel wurde mit 30V – 90V gefahren.

50x TAE Puffer: 1,5M Tris
 1M Eisessig CH₃COOH
 0,05M EDTA
 pH 8,5

6.11. Primer Erstellung

Bei der Erstellung von Primern ist darauf zu achten, dass das 5' Ende GC und das 3' Ende AT haltig ist. Die Sequenz sollte mit einem G beginnen und auf C oder G enden. Des Weiteren wurde darauf Wert gelegt, eine Sequenz mit 20 bis 24bp

(Basenpaaren) zu nehmen, wobei mehr als 3 gleiche Basen hintereinander ebenso vermieden wurden, wie Dimer- oder Hairpinverbindungen. Die Schmelztemperatur liegt optimal bei 65°C. Die Primer stellte Metabion lyophilisiert zur Verfügung.

6.12. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

6.12.1. Standardprotokoll der PCR

Die Temperaturkontrolle erfolgte über den Eppendorf Mastercycler.

Standard Programm: 94°C 4min.; 94°C 30sec., 60°C 40sec., 72°C 1min. 25x; 72°C 10min.; 4°C ∞

Standardprotokoll für den PCR Mastermix:

xµl	H ₂ O (Gesamtvolumen 20µl)
10%	10x buffer
5%	DMSO
250µmol	dNTP's
10pmol	Primer – vorwärts
10pmol	Primer – rückwärts
0,3U	RedTaq® DNA Polymerase (Sigma, D8312)
1µl	DNA

Je nach Schmelztemperatur sowie der Länge der zu amplifizierenden DNA war das Programm anzupassen. Die Temperatur während der Anlagerung der Primer (hier 60°C) sollte ca. 3°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen. Die Zeit der Extension (bei 72°C) sollte lang genug (30sek. für 500bp) gewählt werden, um eine vollständige Synthese des neuen Stranges zu gewährleisten. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C.

6.12.2. Primer für die PCR

Primer für die Genotypisierung der Mauslinien:

<i>Fzd3 wt</i> vorwärts	5'-gat ctg atc atc cga gcc tca ttc-3'
<i>Fzd3 wt</i> rückwärts	5'-att cca tac tca gct act gaa cgc-3'
<i>Fzd3 ko</i> vorwärts	5'-act gag gag cct aac aga taa ggg-3'
<i>Fzd3 ko</i> rückwärts	5'-cat caa cat taa atg tga gcg agt-3'
<i>Fzd6 wt</i> vorwärts	5'-atg gaa agg tcc ccg ttt ctg ttg gcg tgc att c-3'

Fzd6 wt rückwärts 5'-cag cgg gag gag ggg aac tta atg ttc aaa act ac-3'
Fzd6 ko vorwärts 5'-tag ggg gac ctc gct caa cc-3'
Fzd6 ko rückwärts 5'-cca ggg ttt tcc cag tca cg-3'
Lef1 wt vorwärts 5'-ccg ttt cag tgg cac gcc ctc tcc-3'
Lef1 wt rückwärts 5'-cgt gca tcc tcc aaa gat c-3'
Lef1 ko rückwärts 5'-cat ggc gat gcc tgc ttg c-3'
Pitx3 wt vorwärts 5'-gga gtt tgg gct gct tgg tg-3'
Pitx3 wt rückwärts 5'-cca cac cgc gat ctc ttc g-3'
Pitx3 ko vorwärts 5'-cca tgg tga gca agg gcg a-3'
Pitx3 ko rückwärts 5'-ctc gag ctt gta cag ctc gtc cat g-3'

Primer für Lef1 Bindestellen im *Pitx3* Gen (Promoteranalyse):

Lef1 vorwärts1 5'-cct gtc cct tgc aaa cac tt-3'
Lef1 rückwärts1 5'-ccc ctc ctt tcc atc cta tc-3'
Lef1 vorwärts2 5'-gga agg gag ggg tgg tct tt-3'
Lef1 rückwärts2 5'-ttg cca tcc act gag caa c-3'
Lef1 vorwärts3 5'-aag gcc tca att agc cac ag-3'
Lef1 rückwärts3 5'-gct agc gga gga gag agt ga-3'
Lef1 vorwärts4 5'-tgg cac tgc act gtg aga ct-3'
Lef1 rückwärts4 5'-ccc cta gat ttc aag gtg ctc-3'
Lef1 vorwärts5 5'-cct tta cca gag agc acc ttg-3'
Lef1 rückwärts5 5'-aca ttc cgt tca cca ctg ct-3'
Lef1 vorwärts6 5'-cag acg atg tgt cca gca gt-3'
Lef1 rückwärts6 5'-ttc gag ttt gtg agg gga ct-3'

6.13. Maushaltung

Die fünf betreuten Mauslinien (*Fzd3*, *Fzd6*, *Fzd3/6 Doppel ko*, *Lef1*, *Pitx3^{+/Gfp}*) wurden unter konstanten Bedingungen, gemäß dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland sowie den internen Richtlinien des Helmholtz Zentrum München gehalten. Dabei stand den Mäusen Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Die Luftfeuchte betrug ca. 55% und die Temperatur 22°C +/-2°C. Der Hell-Dunkel-Rhythmus war auf 12/12 Stunden per Zeitschaltuhr eingestellt. Die Hellphase dauerte von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr.

Zur Genotypisierung wurde den Juvenilen im Alter zwischen 4 und 6 Wochen ein ca. 5mm langes Stück der Schwanzspitze entnommen und nach 6.1.3. aufgereinigt.

Fzd6 ko Maus

Die Wurfgröße dieser Zucht betrug im Durchschnitt 8,1 Embryonen (C57BL/6 x 129 Hintergrund). Von insgesamt 638 Tieren waren 49,7% weiblich und 50,3% männlich. Die Genotypen verteilten sich auf 56,3% heterozygot, 24,3% wt und 19,4% ko. 60,4% waren agouti, 21,2% schwarz und 18,4% weiß gefärbt.

Fzd3 ko Maus

Mit nur 5,5 Nachkommen pro Wurf war die Wurfgröße bei dieser Mauslinie (C57BL/6 x 129 Hintergrund) deutlich geringer, als im Falle der *Fzd6 ko* Maus. Der Grund wird darin gesehen, dass homozygote *Fzd3^{-/-}* Mäuse kurz nach der Geburt sterben. 59,7% (insgesamt 335 Mäuse) waren heterozygot (*Fzd3^{+/-}*) und 40,3% Wildtypen. Die Nachkommen teilten sich in 57,5% schwarze und 42,5% agouti farbene Mäuse sowie in 56,3% weiblich resp. 43,7% männlich.

Fzd3/Fzd6 ko Maus

Die Wurfgröße betrug im Durchschnitt 6,2 Embryonen. 52,1% weibliche und 47,9% männliche Tiere (insgesamt 1210 Mäuse) hatten zu 60,8% agouti, in 19,8% weißes und zu 19,4% schwarzes Fell. Für eine IVF wurden jeweils 30 Weibchen mit PMSG und 46 Stunden später mit HCG intraperitoneal gespritzt. 16 Stunden darauf erfolgte die Präparierung der Tiere, durchgeführt von der Abteilung CryoGene, Helmholtz Zentrum München.

Lef1 ko Maus

Die Wurfgröße lag bei dieser Linie bei 6,3 Embryonen (C57BL/6 Hintergrund). 48,6% der Mäuse waren weiblich und 51,4% männlich. Bei heterozygoten Elterntieren waren 65,3% der Nachkommen (insgesamt 203 Mäuse) heterozygot und 35,7% wt. Homozygote Nachkommen sind nicht lebensfähig.

Pitx3^{+Gfp} Maus

Die Zucht von *Pitx3^{+Gfp}* Mäusen erfolgte über homozygot-heterozygote Verpaarungen (C57BL/6 Hintergrund). Die Nachkommen zeigten sich zu 50,9%

heterozygot und zu 49,1% homozygot bei insgesamt 344 Tieren. Diese Tiere wurden auf die An- oder Abwesenheit der Augenlinse phänotypisiert. Die Fellfarbe unterteilte sich in 54,5% schwarz und 45,5% agouti. Es wurden dabei 51,9% männliche und 48,1% weibliche Nachkommen geboren.

Bei *Pitx3^{+Gfp}* Mäusen ist vermutlich die Fertilität gestört, für ein sicheres Detektieren des Plugs wurden nur Weibchen ausgewählt, die bereits einmal geworfen hatten.

6.13.1. Entnahme von Embryonen

Für die Analyse von Embryonalstadien wurden die Verpaarungen nachmittags angesetzt und der vaginale Plug am Morgen des Folgetages überprüft. Ein positiver Plug galt als E0.5. Am Mittag des zu analysierenden Tages, erfolgte die Tötung der Maus per Genickbruch sowie das Herauspräparieren der Uteri auf Eis. Das Herauspräparieren der Embryonen schloss sich in 4°C kaltem PBS an.

Ein kleines Stück Schwanz des Mausembryos diente der Genotypisierung. Bei E10.5, E12.5, E13.5 wurde der Kopf, bei älteren Embryonen (E15.5, E17.5) nur das herauspräparierte Gehirn in 4% PFA ü.N. geschwenkt (weitere Prozedur siehe 6.14.).

4% PFA Verdünnung der 20% PFA Lösung mit PBS

20% PFA 200g PFA (Sigma, P6 148) + 800ml 0,1M PBS bei 70°C + NaOH
Plätzchen bis Lösung klar ist + PBS (Gesamtvolumen 1L) + HCL
(pH_{gesamt} 7,4)

6.14. Einbetten der Objekte

6.14.1. Einbettung von Embryonen

6.14.1.1. Einbettung in Paraffin für Immunhistochemie

Folgendes Protokoll bildete die Basis für die Immunhistochemie. Dabei sollte das Gewebe möglichst intakt bleiben, um so eine bestmögliche Anfärbung gewährleisten zu können.

<u>Lösung</u>	<u>Zeit</u>		
4% PFA	ü.N.		
PBS	1Std.		
30% Ethanol	1Std.		
60% Ethanol	1Std.		
70% Ethanol	1Std.		
70% Ethanol	ü.N. (Lagerung möglich, 4°C)		
85% Ethanol	1Std.		
95% Ethanol	1Std.		
100% Ethanol	1Std.		
100% Ethanol	ü.N. 4°C		
Xylol	je nach Alter des Embryos:	E10.5	6min.
		E12.5	10min.
		E17.5	20min.
Paraffin	ü.N. 60°C (ohne Deckel, um Xylol entweichen zu lassen)		

6.14.1.2. Einbettung in Paraffin für *In-situ*-Hybridisierung

Protokoll zur Einbettung von Embryonen für die radioaktive ISH.

	<u>E10.5</u>	<u>E12.5</u>	<u>E13.5</u>	<u>E15.5-E17.5</u>
4% PFA	ü.N.	ü.N.	ü.N.	ü.N.
70% Ethanol	2Std.	3Std.	3Std.	4Std.
96% Ethanol	10min.	15min.	20min.	30min.
100% Ethanol	10min.	15min.	20min.	30min.
Xylol	6min.	10min.	14min.	20min.
Paraffin 60°C	ü.N.	ü.N.	ü.N.	ü.N.

Beim Paraffinschritt wurden die Proben offen in den 60°C Inkubator gestellt, damit noch eventuell verbliebenes Xylol entweichen konnte.

6.15. Schneiden von Mausgewebe

Das Mikrotom mit einer Messereinstellung von 11° di ente dazu, Paraffinschnitte von 8µm Schnittdicke anzufertigen. Um verschiedene mRNA bzw. Proteine in ein und demselben Gehirn auf konsekutiven Schnitten nachweisen zu können, wurden die

Schnitte auf eine Serie von Objektträgern (z.B. A-D) aufgebracht. Dabei wird z.B. bei einer Serienstärke von 4 jeder 5. Schnitt auf demselben Objektträger (z.B. A) gezogen. Die Serienstärke richtete sich nach folgender Tabelle:

	<u>coronal</u>	<u>sagittal</u>
E10.5	4	2
E12.5	6	4
E13.5	8	6
E15.5	8	8
E17.5	8	8

6.16. *In situ* Hybridisierung (ISH)

Die ISH kam zum Einsatz, um mRNA mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden in Schnitten von Mausembryonen nachweisen zu können. Bei der Laborarbeit im Allgemeinen und bei der Detektion von RNA im Besonderen wurde auf sauberste Arbeit (autoklavierte Lösungen, gebackene Glaswaren und Einmalhandschuhe) geachtet, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

Zunächst sollten 20µg des gewünschten Plasmids linearisiert werden. Je nach Enzym dauerte es eine Stunde bis ü.N.. Die Gelelektrophorese diente der Kontrolle in Bezug auf die volle Linearisierung des Plasmides. Es sollte eine starke Bande nach der Linearisierung zu erkennen sein, die langsamer läuft als das zirkuläre Plasmid. Die DNA wurde mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt. Anschließend waren die Proben mit radioaktivem ³⁵S-UTP zu markieren:

- 1.5µg linearisiertes Plasmid
- xµl DEPC H₂O (Gesamtvolumen 30µl)
- 3µl 10x Transkriptions Puffer
- 3µl NTP-mix (rATP/rCTP/rGTP à 10mM)
- 1µl 0,5M DTT
- 1µl RNasin (40U/µl; Promega)
- 3µl ³⁵S-UTP (Amersham)
- 1µl T7, T3 oder SP6 RNA Polymerase (20U/µl) siehe Tab. 2 (6.7.1.).

Danach folgte die Inkubation bei 37°C für eine Stunde, nach Zugabe von 1µl RNA Polymerase weitere 2 Stunden. Um die Matrizen DNA zu entfernen, erfolgte die

abschließende Inkubation mit Zugabe von 2µl RNase freier DNase I (Roche 776785) 15min. lang. Zur Aufreinigung der Proben kam das RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) zum Einsatz. 1µl der Probe wurde mit 2ml Szintillationsflüssigkeit im β -Strahlungszähler gemessen. Die Werte müssen zwischen 0,5 und 2,5 Mio. cpm liegen. Bei -20°C konnten die Proben bis zu einer Woche gelagert werden.

Die ISH geschah auf 8µm Paraffin Schnitten, mit folgenden Inkubationszeiten:

<u>Zeit</u>	<u>Lösung</u>
2x 15min.	Xylol
2x 5min.	100% Ethanol
5min.	70% Ethanol
3min.	DEPC-H ₂ O
3min.	PBS/DEPC
20min.	4% PFA/PBS auf Eis
2x 5min.	PBS/DEPC
7min.	20µg/ml Prot.K. in Prot.K. Puffer (0,5M Tris-HCl pH7,5 + 0,05M EDTA pH8,0; Puffer eingestellt pH7,8)
5min.	PBS/DEPC
10min.	200ml 0,1M triethanolamine-HCl (pH8) TEA + 600µl Eisessig
2x 5min.	2x SSC
1min.	60% Ethanol
1min.	70% Ethanol
1min.	95% Ethanol
1min.	100% Ethanol

Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet waren, konnten sie mit dem Hybridisierungsmix (Hyb-mix) (90µl/Objektträger + Deckglas) für eine Stunde bei 56°C in einer feuchten Kammer (Hybridisierungsflüssigkeit: in H₂O: 50% Formamid, 10% 20x SSC) prähybridisiert werden.

Für die eigentliche Hybridisierung kamen 7 Mio. cpm pro 100µl Hyb-mix zum Einsatz. Der Hybridisierungsmix wurde für 2min. auf 90°C aufgeheizt, dann kurz auf Eis gestellt und bei RT verwendet. Nach dem Prähybridisieren konnte das Deckglas entfernt und 100µl der Hybridisierungslösung luftblasenfrei aufgebracht werden. Im Anschluss des erneuten Auflegens des Deckglases, wurden die Objektträger wieder

in der feuchten Kammer bei 56°C ü.N. inkubiert. Der Hybridisierungs-Mix konnte am nächsten Tag wie folgt herunter gewaschen werden:

<u>Zeit</u>	<u>Lösung</u>
4x5 min.	4xSSC
20min.	NTE (20µg/ml RNaseA) bei 37°C (NTE: 0,5M Na Cl, 10mM Tris-HCl pH8,0, 5mM EDTA pH8,0)
2x5min.	2xSSC/1mM DTT
10min.	1xSSC/1mM DTT
10min.	0,5xSSC/1mM DTT
2x30min.	0,1xSSC/1mM DTT bei 64°C
2x10min.	0,1xSSC
1min.	30% Ethanol/300mM NH ₄ Oac
1min.	50% Ethanol/300mM NH ₄ Oac
1min.	70% Ethanol/300mM NH ₄ Oac
1min.	95% Ethanol
2x1min.	100% Ethanol.

Später erfolgte eine Lufttrocknung der Schnitte für 1 Stunde.

Weitere Schritte fanden in der Dunkelkammer statt: Mit einem Röntgenfilm konnte das Signal der Objekte aufgenommen und so 3 Tage später überprüft werden, ob die ISH erfolgreich war. Daraufhin war die Dauer der Expositionszeit zu wählen.

Die NTB2 Fotoemulsion (Kodak; mit 1:1 H₂O verdünnt) ist empfindlich gegenüber Licht, Metall und Bewegung. Trotzdem ist eine Durchmischung unerlässlich, deshalb wurde die Lösung vorsichtig langsam geschwenkt, bevor sie in das Wasserbad bei 42°C gestellt werden konnte. Anschließend kam es da drauf an die Objektträger langsam und sorgsam, ohne Luftblasen zu verursachen an welchen später das Signal nicht sichtbar wäre, in die Fotoemulsion zu tauchen. Die Objektträger standen ü.N. senkrecht zum Abtropfen auf Papiertüchern in einer Dunkelkammer. Sie wurden in lichtdichten Boxen mit Silicagel (Kieselgel) bei 4°C, für 3 bis 6 Wochen aufbewahrt. Die 1Std. bei RT erwärmten Objektträger inkubierten 5min. bei RT in dem D19 Entwickler (Kodak), dann 30sek. in Leitungswasser und 15min. im Fixierer (Kodak). Letztlich wurden die Objektträger 20min. unter kaltem Leitungswasser gespült und

die Rückseite der Objektträger mit einer Rasierklinge von Resten der Fotoemulsion befreit. Danach konnte die Kresylviolett Färbung (6.18.) durchgeführt werden.

6.17. Immunhistochemie (IHC)

Die angefertigten Paraffinschnitte sind mittig in den Küvetteneinsatz zu positionieren. Dieser ist gegebenenfalls mit leeren Objektträgern aufzufüllen. Danach werden die Schnitte inkubiert:

<u>Zeit</u>	<u>Lösung</u>
10min.	Xylol
15min.	Xylol
4min.	2x 100% Ethanol
4min.	95% Ethanol
4min.	85% Ethanol
4min.	60% Ethanol
4min.	30% Ethanol
5min.	3x H ₂ O

Nach dem Waschen schließt sich das Sieden in Zitratpuffer an, um vorhandene Antikörperbindungen zu lösen. Dafür werden 500ml 1x Zitratpuffer benötigt. Die Küvette muß bis zum Rand mit Zitratpuffer gefüllt sein.

Die so präparierte Küvette - mit invertiert diagonal aufgelegtem Deckel - kam zusammen mit dem Rest des Puffers (in einem Erlenmeyerkolben) in die Mitte der mit Papier ausgelegten Mikrowelle. Die Kochschritte (1x 4min., 3x 3min.) laufen bei 650 Watt ab, wobei die Küvette zwischen den Kochschritten bis zum Rand wieder mit Puffer aufgefüllt wird, um Verdunstungsverluste auszugleichen. Das Abkühlen der Objektträger geschieht durch Wasserzugabe.

5min.	H ₂ O
5min.	1x PBS

Ein Stück Parafilm diente der Verteilung der Blockierungslösung (500µl) auf dem Objektträger, der dann eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubierte. Nach dem seitlichen Abtupfen der Objektträger wurde der Primärantikörper (Verdünnungen aller

verwendeten Antikörper in 9.3) in Blockierungslösung (500µl) aufgetragen und ü.N. inkubiert.

5min. 3x PBS

Danach folgte die Inkubation des sekundären Antikörpers (siehe 9.3.) in Blockierungslösung (500µl) für 1:15 Std. in der feuchten Kammer.

5min. 3x PBS

30sek. H₂O

Letztlich passiert die Trocknung der Objektträger und die Lagerung (mit Aqua Poly/Mount eingedeckt) horizontal sowie lichtdicht bei 4°C. Fotografische Aufnahmen der Immuno folgten (siehe 6.19.).

6.18. Kresylviolett Färbung

Die Kresylviolett Färbung dient dem Sichtbarmachen des Gewebes, mithin der Verteilung der Nervenzellkörper:

<u>Zeit</u>	<u>Lösung</u>
5-10min.	Kresylviolett
2min.	dest. Wasser
2x 2min.	70% Ethanol
15-30sek.	96% Ethanol +1ml Eisessig (zum raschen Entfärben)
2x 1min.	96% Ethanol
2x 2min.	100% Ethanol (Nachfärben bis hier möglich)
2x 5min.	Xylol

Danach werden die Objektträger mit DPX eingebettet. Es ist darauf zu achten, dass die Schnitte nicht trockenfallen.

Kresylviolettlösung: (2,5g Kresylviolett, 0,102g Natriumacetat, 1,55ml Eisessig, 500ml dest. Wasser, pH 3,5 mit Eisessig einstellen)

6.19. Fotografieren von Präparaten

Für die bildliche Darstellung der Präparate fand das Programm AxioVision (für *in situ*: AxioVs40 V 4.6.1.0; für immuno: AxioVs40 V 4.5.0.0) von Zeiss Verwendung.

Übersichtsaufnahmen der *in situ* bzw. Kresylviolettfräbung bis 5-facher Vergrößerung wurden mit dem Stereomikroskop Zeiss Stemi SV6, Detailaufnahmen mit dem Axioplan 2 imaging Mikroskop (Kamera: AxioCam MRc) von Zeiss fotografiert. Aufnahmen der Immuno hingegen erfolgten mit dem Axioplan 2 imaging (Zeiss) Mikroskop (Kamera: AxioCam HRc).

Die Einstellung der Kamera geschah mit höchstmöglicher Belichtungszeit, ohne Einbußen von Bildinformationen. Diese Konfiguration wurde dann für die gesamten Aufnahmen dieser Experimentserie beibehalten, um *wt* und *ko* vergleichen zu können. Die aufgenommene Bildgröße betrug jeweils 1300x1030px (AxioVision: standard color). Die verwendeten Zeiss- Objektive waren 5x/0,15, 10x/0,30, 20x/0,50 Plan-NEOFLUAR sowie für Detailaufnahmen 40x/1,3 Oil DIC Plan-NEOFLUAR.

6.20. Zellzählung

Die Zellzählung (Th⁺ Neuronen) lief über das Programm Stereo Investigator (MicroBrightField Inc., Version 5.05.4), mit der Methode Optical Fraktionator, auf dem Axioplan 2 imaging Fluoreszenzmikroskop (Zeiss). Das Programm erlaubt eine Kalkulation der Gesamtzellzahl eines Gehirns. Hier wurde jeder 8. Schnitt ausgezählt. Die Methode Optical Fraktionator gibt randomisierte Flächen, innerhalb des festgelegten Rahmens, zum Auszählen vor.

Einstellungen:

Serial section manager:	8µm	Blockadvance
	6µm	mounted section thickness
	8	section evaluation interval
	1	starting section number
Optical Fractionator:	150x150µm	scan grid size
	10	desired sampling site
	3µm	fixed distance
	5µm	optical dissector hight
	6µm	mounted section hight
	yes	manual focus

6.21. LiCl Test

Für diesen Test wurden heterozygote *Pitx3^{+Gfp}* Mäuse mit homozygoten (*Pitx3^{Gfp/Gfp}*) verpaart. Die Nachkommen sollten sich demnach wiederum in 50% homozygot und 50% heterozygot aufspalten. Beim Stadium E11.5 schloss sich die Injektion von 50% der trächtigen Muttertiere mit LiCl bzw. mit H₂O an.

Für 4ng LiCl/g Körpergewicht einer adulten Maus wurde eine Lösung mit 100ng LiCl/100µl H₂O hergestellt und steril (0,2µm) filtriert intraperitoneal gespritzt. Das Herauspräparieren der Gehirne der Embryonen erfolgte 3 Stunden nach dem Spritzen, um im Weiteren das Mesencephalon an der dorsalen Mittellinie zu öffnen. Bei dieser so genannten Open-Book Präparation wird nun das ventrale Mittelhirn von dorsal aus sichtbar und es können sich Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop anschließen. Die Schwanzspitze der jeweiligen Embryonen ist für die Isolation von DNA (6.1.3.2.) zur weiteren Genotypisierung (6.12.) unverzichtbar.

In diesem Experiment musste festgestellt werden, dass möglicherweise aufgrund von Fertilitätsproblemen diese Mäuse nur wenig Nachkommen (Wurfgröße im Durchschnitt: 4,0 Embryonen) hatten. Deshalb war es notwendig nach der ersten Serie von Experimenten - aufgrund unsicherer Plugs - das Experimentdesign umzustellen.

Obwohl bis zu 20 Brutpaare - mit Weibchen die bereits erfolgreich geworfen hatten - angesetzt wurden, waren wenig Mäuse gleichzeitig trächtig. In insgesamt fünf von acht Experimenten konnten Embryonen präpariert werden. Bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von nur vier Embryonen war es im Stadium E11.5 mit bloßem Auge nicht möglich trächtige Weibchen von unbefruchteten sicher zu unterscheiden. Infolgedessen war für das Experiment (6.21.) nicht auszuschließen, dass nur Weibchen mit LiCl trächtig waren, keines jedoch mit der Wasserkontrolle.

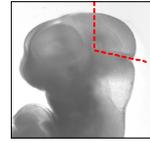
Weiteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten eine größere Anzahl von Verpaarungen anzusetzen und ggf. die Trächtigkeit per Ultraschall zu testen (Mu, Slevin et al., 2008), um zu weiterführenden Ergebnissen *in vivo* resp. *in vitro* - ggf. durch Anlegen von Zelllinien aus dem ventralen Mittelhirn - zu gelangen.

6.22. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunpräzipitation wurde mit dem EZ ChIP™ Kit (Upstate 17-371) durchgeführt. Das Originalprotokoll musste an die gegebene Aufgabenstellung angepasst werden.

Änderungen werden im Folgenden aufgelistet:

- IV. A. Ausgangsmaterial: Mittelhirn von 18 CD1 Mausembryonen, Stadium E11.5 herauspräpariert (siehe Bild) und in 1ml PBS mit dem Pestler homogenisiert und anschließend auf 5ml PBS aufgefüllt.
- IV.A.1. 135µl 37%iger Formaldehyd
- IV.A.4. 0,5ml Glycin
- IV.A.13. 1,4ml SDS + 7µl Protease Inhibitor Cocktail II
- IV.A.16. in 4 Reaktionsgefäße à 300µl Aliquot aufteilen
- IV.B.2. mit 57% (40Watt) auf Eis 10mal 10sek. sonifizieren
- IV.B.4. 20µl abnehmen für die Gelanalyse
- IV.C.7. 20µl als Input abnehmen
- IV.E.3. 1 Stunde inkubieren
- IV.F.4. bei 12.500x g zentrifugieren
- IV.F.15. 52µl Elution buffer auf die Membran geben, 2min. bei 37°C inkubieren



6.23. Zellkultur

6.23.1. Neuronale Zellen

6.23.1.1. Beschichtung der Platten für HCN Zellen

Die Platten für HCN Zellen wurden mit 6ml 10µg/ml poly-L-ornitine (Sigma, P36655, in H₂O) auf einer 10cm Platte und 300µl/Loch einer 24Loch Platte beschichtet und 24Std. bei RT belassen. Sodann wurden sie zweimal mit Wasser gewaschen und mit 5µg/ml Laminin (Invitrogen, 23017-015, mit PBS verdünnt) gleicher Menge 24Std. bei 37°C inkubiert. Die Platten sind sechs Monate in Frischhaltefolie gewickelt bei -20°C haltbar.

6.23.1.2. Passage der HCN Zellen

Zur Passage von HCN Zellen wurden DMEM/F12 (Invitrogen, 21331-020) + N2 (Invitrogen) Medium, DMEM/F12 Medium und Trypsin in das 37°C Wasserbad gestellt, sowie eine beschichtete Platte (siehe 6.23.1.1.) im Inkubator aufgetaut. Das Medium der HCN Zellen wurde abgesaugt, 1,5ml Trypsin zugegeben, die Platte 3sek. geschwenkt und das Trypsin direkt abgenommen. Danach konnte die Platte für 2min. in den Inkubator gestellt werden, um anschließend die Zellen mit 5ml DMEM/F12 Medium von der Platte zu waschen, zu suspendieren, in ein 15ml Reaktionsgefäß zu geben und für 2min. bei 270x g zu zentrifugieren. Der Überstand

musste vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 1ml DMEM/F12+N2 resuspendiert werden. Bei einer 1:10 Passage kamen 100µl davon in 8ml DMEM/F12+N2 mit Fgf2 (20ng/ml, Peprotech) zum Einsatz. Diese Lösung sollte auf die neue Platte aufgebracht, sternförmig waagrecht geschwenkt und in den Inkubator gestellt werden.

6.23.1.3. Mediumwechsel bei HCN Zellen

Der Mediumwechsel bei HCN Zellen geschieht im Abstand von 2 Tagen. Das neue DMEM/F12+N2 Medium wurde im Wasserbad vorgewärmt, 8ml davon mit 20ng/ml Fgf2 versetzt und nach dem Absaugen des alten Mediums auf die Platte aufgebracht.

6.23.1.4. Elektroporation in HCN Zellen

Nach dem Zusammenstellen der zu elektroporierenden Lösung wurden die Zellen wie bei der Passage (6.23.1.2.) behandelt. Nach dem Resuspendieren mussten pro Elektroporation 3×10^6 Zellen in 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert und 2min. bei 270x g zentrifugiert werden. Der Überstand war zu verwerfen und das Pellet in 100µl Rat Nucleofector Solution zu resuspendieren. Zellen und DNA konnten gemischt in die Elektroporationsküvette gegeben und elektroporiert (Programm A-033 high efficiency) werden. Letztlich folgen 3ml Medium + Fgf2 und davon sind 500µl/Loch (Anzahl technischer Replikate) auf die vorbereitete 24 Loch Platte (6.23.1.1.) aufzubringen.

Pitx3 wt/Firefly beinhaltet die proximale Promoterregion des *Pitx3* Gens, pcDNA3 als Leervektor galt als Negativkontrolle, Prox1 als Positivkontrolle (Vergleich D.Münster, Dissertation). Messung der Luciferase Aktivität erfolgte 40 Std. nach der Elektroporation.

Konfigurationen für die Elektroporation der fünf Lösungen (A - E):

	A	B	C	D	E
<i>Pitx3 wt/Firefly</i>	2,5µg	2,5µg	2,5µg	2,5µg	2,5µg
<i>Renilla</i>	0,002µg	0,002µg	0,002µg	0,002µg	0,002µg
<i>pcDNA3</i>	5µg	3,5µg	3,5µg	3,5µg	2µg
<i>Prox1</i>	-	1,5µg	-	-	-
ΔN - β cat	-	-	1,5µg	-	1,5µg
<i>Lef1</i>	-	-	-	1,5µg	1,5µg

6.23.2. Nicht neuronale Zellen

6.23.2.3. Passage der COS7 und HEK-293 Zellen

Die COS7 und HEK-293 Zellen waren alle 4 Tage zu passagieren. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, 3ml Trypsin zugegeben und für 2,5min. (COS7) bzw. 1min. (HEK-293) in den Inkubator gestellt. Nach dem Absaugen des Trypsins mussten die Zellen in 10ml Medium resuspendiert und 2min. bei 200x g zentrifugiert werden. Das Pellet (nach Verwerfung des Überstandes) wurde in 1ml Medium resuspendiert und 1:10 auf eine neue Platte mit 10ml frischem Medium ausgebracht.

6.23.2.4. Mediumwechsel bei COS7 und HEK-293 Zellen

Nach jeweils 2 Tagen konnte das Medium abgesaugt und durch 10ml, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt werden. Langsames Pipetieren verhinderte ein Ablösen der adherenten Zellen.

6.23.2.5. Transfektion in COS7 und HEK-293 Zellen

Für die Transfektion bei COS7 und HEK-293 Zellen wurde Lipofektamine LTX Reagent und Plus Reagent (Invitrogen) nach mitgeliefertem Protokoll verwendet. Dafür galt es am Tag vor der Transfektion 4×10^5 HEK-293 und 5×10^5 COS7 Zellen in je 500µl Medium/Loch auf einer 24 Loch Platte auszubringen. Somit waren die Platten am Tag der Transfektion 60% konfluent. *Pitx3 wt/Firefly* beinhaltet die proximale Promoterregion des *Pitx3* Gens, pcDNA3 als Leervektor galt als Negativkontrolle, Prox1 als Positivkontrolle (Vergleich D.Münster, Dissertation). Messung der Luciferase Aktivität erfolgte 40 Std. nach der Transfektion.

Konfigurationen für die Transfektion der fünf Lösungen (A - E):

	A	B	C	D	E
<i>Pitx3 wt/Firefly</i>	0,25µg	0,25µg	0,25µg	0,25µg	0,25µg
<i>Renilla</i>	0,0002µg	0,0002µg	0,0002µg	0,0002µg	0,0002µg
<i>pcDNA3</i>	0,5µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,2µg
<i>Prox1</i>	-	0,15µg	-	-	-
ΔN - <i>βcat</i>	-	-	0,15µg	-	0,15µg
<i>Lef1</i>	-	-	-	0,15µg	0,15µg

6.23.3. Standardbedingungen

Der Inkubator hatte eine Temperatur von 37°C. Die C O₂ Konzentration betrug 5%. Selbstverständlich muß immer für genügend Wasser in der Inkubatorwanne gesorgt sein. In der Zellkultur diente GLP als Basis.

6.23.4. Messung der Luciferase Aktivität

Das Medium der 24 Loch Platte war abzusaugen und je 100µl/Loch Passive Lysis Buffer (Promega, 1:5 mit H₂O verdünnt) hinzu zugeben, sowie 10min. auf den Schüttler zu stellen. 7,5µl/Loch wurden auf die Messplatte aufgetragen und im Luminometer gemessen.

6.23.5. Einfrieren von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bis zur 30. Passage genutzt. Sehr frühe Passagen wurden stark expandiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Dafür musste das Medium einer Platte abgesaugt, bei serumhaltigem Medium mit PBS gewaschen, trypsiniert (wie bei einer Passage) und das Pellet nach der Zentrifugation in 1ml Medium mit 10% DMSO resuspendiert werden. Danach noch 1ml Medium/10% DMSO zugegeben, gemischt und auf zwei Schraubröhrchen verteilt eingefroren werden.

6.23.6. Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff in das 37°C Wasserbad transferiert und sofort nach dem Auftauen mit 9ml Medium versetzt. Darauf folgend wurde 2min. bei 200x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden 19ml Medium zugegeben und je 10ml auf eine Platte ausgebracht. Sternförmiges Schwenken sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen.

7. Literatur

- Adams, K. A., Maida, J. M., Golden, J. A., & Riddle, R. D. (2000). The transcription factor *Lmx1b* maintains *Wnt1* expression within the isthmus organizer. *Development*, *127*(9), 1857-1867.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., & Ericson, J. (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell*, *124*(2), 393-405.
- Andersson, E. R., Prakash, N., Cajanek, L., Minina, E., Bryja, V., Bryjova, L., Yamaguchi, T. P., Hall, A. C., Wurst, W., & Arenas, E. (2008). *Wnt5a* regulates ventral midbrain morphogenesis and the development of A9-A10 dopaminergic cells in vivo. *PLoS ONE*, *3*(10), e3517.
- Beall, S. A., Boekelheide, K., & Johnson, K. J. (2005). Hybrid GPCR/cadherin (Celsr) proteins in rat testis are expressed with cell type specificity and exhibit differential Sertoli cell-germ cell adhesion activity. *J Androl*, *26*(4), 529-538.
- Billin, A. N., Thirlwell, H., & Ayer, D. E. (2000). Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Mol Cell Biol*, *20*(18), 6882-6890.
- Blackwell, R. E. (1992). Hyperprolactinemia: evaluation and management. *Reprod. Endocrinol.*, *21*, 105-124.
- Bradley, A. (2002). Mining the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 512-514.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O., & Kemler, R. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by *Wnt1*-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*, *128*(8), 1253-1264.
- 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*(10), 4199-4207.
- Burns, C. J., Zhang, J., Brown, E. C., Van Bibber, A. M., Van Es, J., Clevers, H., Ishikawa, T. O., Taketo, M. M., Vetter, M. L., & Fuhrmann, S. (2008). Investigation of *Frizzled-5* during embryonic neural development in mouse. *Dev Dyn*, *237*(6), 1614-1626.

- Castelo-Branco, G., Wagner, J., Rodriguez, F. J., Kele, J., Sousa, K., Rawal, N., Pasolli, H. A., Fuchs, E., Kitajewski, J., & Arenas, E. (2003). Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, *100*(22), 12747-12752.
- Chizhikov, V. V., & Millen, K. J. (2004). Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS. *Nat Rev Neurosci*, *5*(10), 808-812.
- Ciani, L., & Salinas, P. C. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci*, *6*(5), 351-362.
- Crossley, P. H., & Martin, G. R. (1995). The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, *121*(2), 439-451.
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, *39*(6), 889-909.
- Eastman, Q., & Grosschedl, R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol*, *11*(2), 233-240.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic Hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, *75*, 1417-1430.
- 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), 179-191.
- Epstein, D. J., McMahon, A. P., & Joyner, A. L. (1999). Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development*, *126*(2), 281-292.
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, *991*, 1-14.
- Favor, J., Sandulache, R., Neuhauser-Klaus, A., Pretsch, W., Chatterjee, B., Senft, E., Wurst, W., Blanquet, V., Grimes, P., Sporle, R., & Schughart, K. (1996). The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(24), 13870-13875.

- Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, *114* (Pt 5), 2283-2301.
- Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A., & Ang, S.-L. (2007). Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*, *134*(15), 2761-2769.
- Findley, L., Aujla, M., Bain, P. G., Baker, M., Beech, C., Bowman, C., Holmes, J., Kingdom, W. K., MacMahon, D. G., Peto, V., & Playfer, J. R. (2003). Direct economic impact of Parkinson's disease: a research survey in the United Kingdom. *Mov Disord*, *18*(10), 1139-1145.
- Fischer T. (2006). Fibroblast growth factor and Wnt signaling in the development of the vertebrate central nervous system. Universitätsbibliothek der Technischen Universität München.
- Fischer, T., Guimera, J., Wurst, W., & Prakash, N. (2007). Distinct but redundant expression of the Frizzled Wnt receptor genes at signaling centers of the developing mouse brain. *Neuroscience*, *147*(3), 693-711.
- Fitzgerald, P., & Dinan, T. G. (2008). Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol*, *22*(2 Suppl), 12-19.
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W.-Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., Eidelberg, D., & Fahn, S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.*, *344*(10), 710-719.
- Fuchs, J., Mueller, J. C., Lichtner, P., Schulte, C., Munz, M., Berg, D., Wüllner, U., Illig, T., Sharma, M., & Gasser, T. (2007). The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*.
- Galceran, J., Farinas, I., Depew, M. J., Clevers, H., & Grosschedl, R. (1999). Wnt3a-/-like phenotype and limb deficiency in Lef1-/-Tcf1-/- mice. *Genes Dev.*, *13*(6), 709-717.
- Goridis, C., & Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat. Rev. Neurosci.*, *3*, 531-541.
- Graw, J. (2004). Congenital hereditary cataracts. *Int J Dev Biol*, *48*(8-9), 1031-1044.
- Guo, C., Qiu, H.-Y., Huang, Y., Chen, H., Yang, R.-Q., Chen, S.-D., Johnson, R. L., Chen, Z.-F., & Ding, Y.-Q. (2007). Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1

- expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development*, 134(2), 317-325.
- Guo, N., Hawkins, C., & Nathans, J. (2004). Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25), 9277-9281.
- Hashimoto, R., Suzuki, T., Iwata, N., Yamanouchi, Y., Kitajima, T., Kosuga, A., Tatsumi, M., Ozaki, N., Kamijima, K., & Kunugi, H. (2005). Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm.*, V112(2), 303-307.
- Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M., & Klein, P. S. (1997). Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol*, 185(1), 82-91.
- Herrup, K., & Yang, Y. (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci*, 8(5), 368-378.
- Hsu, W., Zeng, L., & Costantini, F. (1999). Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J Biol Chem*, 274(6), 3439-3445.
- Huang, H. C., & Klein, P. S. (2004). The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol*, 5(7), 234.231-234.237.
- Hynes, M., & Rosenthal, A. (1999). Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Op. Neurobiol.*, 9, 26-36.
- Ishikawa, T., Tamai, Y., Zorn, A. M., Yoshida, H., Seldin, M. F., Nishikawa, S., & Taketo, M. M. (2001). Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development*, 128(1), 25-33.
- Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D., & Awatramani, R. B. (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat Neurosci*, 12(2), 125-131.
- Joyner, A. L., Liu, A., & Millet, S. (2000). Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr Opin Cell Biol*, 12(6), 736-741.
- Karasawa, T., Yokokura, H., Kitajewski, J., & Lombroso, P. J. (2002). Frizzled-9 Is Activated by Wnt-2 and Functions in Wnt/beta -Catenin Signaling. *J. Biol. Chem.*, 277(40), 37479-37486.
- Katsu, T., Ujike, H., Nakano, T., Tanaka, Y., Nomura, A., Nakata, K., Takaki, M., Sakai, A., Uchida, N., Imamura, T., & Kuroda, S. (2003). The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is

- associated with the susceptibility to schizophrenia. *Neurosci. Lett.*, 353(1), 53-56.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., & Ang, S.-L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development*, 133(3), 495-505.
- Kimura, M., Satoh, T., & Matsumoto, N. (2007). What does the habenula tell dopamine neurons? *Nat Neurosci*, 10(6), 677-678.
- Kioussi, C., Briata, P., Baek, S. H., Rose, D. W., Hamblet, N. S., Herman, T., Ohgi, K. A., Lin, C., Gleiberman, A., & Wang, J. (2002). Identification of a Wnt/Dvl/ β -Catenin --> Pitx2 Pathway Mediating Cell-Type-Specific Proliferation during Development. *Cell*, 111(5), 673-685.
- Klein, P. S., & Melton, D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8455-8459.
- Klockgether, T. (2004). Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell Tissue Res.*, 318, 115-120.
- Knight, J., & Abbott, A. (2002). Full house. *Nature*, 417(6891), 785-786.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*, 275(5307), 1784-1787.
- Korotkova, T. M., Ponomarenko, A. A., Haas, H. L., & Sergeeva, O. A. (2005). Differential expression of the homeobox gene Pitx3 in midbrain dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 22(6), 1287-1293.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Zullig, S., & Basler, K. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*, 109(1), 47-60.
- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998). Parkinson's Disease: Second of Two Parts. *N. Engl. J Med.*, 339(16), 1130-1143.
- Langston, J. W. (2006). The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol*, 59(4), 591-596.
- Lin, L., Cui, L., Zhou, W., Dufort, D., Zhang, X., Cai, C.-L., Bu, L., Yang, L., Martin, J., Kemler, R., Rosenfeld, M. G., Chen, J., & Evans, S. M. (2007). beta-Catenin

- directly regulates *Islet1* expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *PNAS*, *104*(22), 9313-9318.
- Liu, A., & Joyner, A. L. (2001). Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.*, *24*, 869-896.
- Liu, C., Wang, Y., Smallwood, P. M., & Nathans, J. (2008). An essential role for *Frizzled5* in neuronal survival in the parafascicular nucleus of the thalamus. *J Neurosci*, *28*(22), 5641-5653.
- Lyuksyutova, A. I., Lu, C. C., Milanesio, N., King, L. A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M., & Zou, Y. (2003). Anterior-posterior guidance of commissural axons by *Wnt-frizzled* signaling. *Science*, *302*(5652), 1984-1988.
- Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L., & Martin, G. R. (1999). *FGF8* induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development*, *126*(6), 1189-1200.
- 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), 971-981.
- 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), 467-479.
- 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*(4), 581-595.
- Mendez, I., Vinuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J. Q., & Isacson, O. (2008). Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med*, *14*(5), 507-509.
- Mikels, A. J., & Nusse, R. (2006). Purified *Wnt5a* protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*, *4*(4), e115.
- Millen, K. J., Wurst, W., Herrup, K., & Joyner, A. L. (1994). Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development*, *120*(3), 695-706.

- Milovanovic, T., Planutis, K., Nguyen, A., Marsh, J. L., Lin, F., Hope, C., & Holcombe, R. F. (2004). Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. *Int J Oncol*, *25*(5), 1337-1342.
- Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., & Kaykas, A. (2004). Wnt and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.*, *5*, 689-699.
- Mu, J., Slevin, J. C., Qu, D., McCormick, S., & Adamson, S. L. (2008). In vivo quantification of embryonic and placental growth during gestation in mice using micro-ultrasound. *Reprod Biol Endocrinol*, *6*, 34.
- Münster D. (2005). Pitx3 und seine Rolle in der Augen- und Gehirnentwicklung. Universitätsbibliothek der Technischen Universität München.
- Nestler, E. J. (2005). The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect*, *3*(1), 4-10.
- Niederreither, K., Fraulob, V., Garnier, J.-M., Chambon, P., & Dolle, P. (2002). Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech. Dev.*, *110*(1-2), 165-171.
- Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Timmerman, J., Kruisbeek, A., Destree, O., Meijlink, F., & Clevers, H. (1993). Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development*, *118*(2), 439-448.
- Peng, C., Fan, S., Li, X., Fan, X., Ming, M., Sun, Z., & Le, W. (2007). Overexpression of pitx3 upregulates expression of BDNF and GDNF in SH-SY5Y cells and primary ventral mesencephalic cultures. *FEBS Lett*, *581*(7), 1357-1361.
- Perlmann, T., & Wallen-Mackenzie, A. (2004). Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res.*, *318*, 45-52.
- Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D., Sussel, L., Weisenhorn, D. M. V., Martinez, S., Arenas, E., Simeone, A., & Wurst, W. (2006). A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development*, *133*(1), 89-98.
- Prakash, N., & Wurst, W. (2004). Specification of midbrain territory. *Cell Tissue Res.*, *318*(1), 5-14.

- Prakash, N., & Wurst, W. (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell. Mol. Life Sci.*, *63*(2), 187-206.
- Prakash, N., & Wurst, W. (2007). A Wnt signal regulates stem cell fate and differentiation in vivo. *Neurodegener. Dis.*, *4*(4), 333-338.
- Puelles, E., Acampora, D., Lacroix, E., Signore, M., Annino, A., Tuorto, F., Filosa, S., Corte, G., Wurst, W., Ang, S. L., & Simeone, A. (2003). Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. *Nat. Neurosci.*, *6*(5), 453-460.
- 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. *Development*, *131*(9), 2037-2048.
- Qian, D., Jones, C., Rzadzinska, A., Mark, S., Zhang, X., Steel, K. P., Dai, X., & Chen, P. (2007). Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev. Biol.*, *306*(1), 121–133.
- Ranheim, E. A., Kwan, H. C. K., Reya, T., Wang, Y.-K., Weissman, I. L., & Francke, U. (2005). Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood*, *105*(6), 2487-2494.
- Salamone, J. D. (1996). The behavioral neurochemistry of motivation: methodological and conceptual issues in studies of the dynamic activity of nucleus accumbens dopamine. *J Neurosci Methods*, *64*(2), 137-149.
- Schmitz, Y., Benoit-Marand, M., Gonon, F., & Sulzer, D. (2003). Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *J Neurochem.*, *87*(2), 273-289.
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M., & Gruss, P. (1997). Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: Evidence from targeted mutations. *PNAS*, *94*(26), 14518-14523.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., & Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*, *358*(6388), 687-690.
- Singh, B. (2005). Recognition and optimal management of schizophrenia and related psychoses. *Intern Med J*, *35*(7), 413-418.
- Smidt, M. P., & Burbach, J. P. H. (2007). How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat. Rev. Neurosci.*, *8*(1), 21-32.

- Smidt, M. P., Smits, S. M., Bouwmeester, H., Hamers, F. P., van der Linden, A. J., Hellemons, A. J., Graw, J., & Burbach, J. P. (2004). Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene *Pitx3*. *Development*, *131*(5), 1145-1155.
- Smidt, M. P., van Schaick, H. S., Lanctot, C., Tremblay, J. J., Cox, J. J., van der Kleij, A. A., Wolterink, G., Drouin, J., & Burbach, J. P. (1997). A homeodomain gene *Ptx3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, *94*(24), 13305-13310.
- Spanagel, R., & Weiss, F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci*, *22*(11), 521-527.
- Stambolic, V., Ruel, L., & Woodgett, J. R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*, *6*(12), 1664-1668.
- Terasaki, H., Saitoh, T., Shiokawa, K., & Katoh, M. (2002). Frizzled-10, up-regulated in primary colorectal cancer, is a positive regulator of the WNT - beta-catenin - TCF signaling pathway. *Int J Mol Med*, *9*(2), 107-112.
- van Amerongen, R., Mikels, A., & Nusse, R. (2008). Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal*, *1*(35), re9.
- van Genderen, C., Okamura, R. M., Farinas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L., & Grosschedl, R. (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.*, *8*(22), 2691-2703.
- Vernier, P., Moret, F., Callier, S., Snappyan, M., Wersinger, C., & Sidhu, A. (2004). The Degeneration of Dopamine Neurons in Parkinson's Disease: Insights from Embryology and Evolution of the Mesostriatocortical System. *Ann. NY Acad. Sci.*, *1035*(1), 231-249.
- Wallen, A., Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Arvidsson, M., Olson, L., & Perlmann, T. (1999). Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in *Nurr1* mutant mice. *Exp. Cell Res.*, *253*(2), 737-746.
- Wang, Y., Badea, T., & Nathans, J. (2006). Order from disorder: Self-organization in mammalian hair patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(52), 19800-19805.
- Wang, Y., Guo, N., & Nathans, J. (2006). The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J Neurosci*, *26*(8), 2147-2156.

- Wang, Y., Huso, D., Cahill, H., Ryugo, D., & Nathans, J. (2001). Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the frizzled-4 gene. *J Neurosci*, 21(13), 4761-4771.
- Wang, Y., Macke, J. P., Abella, B. S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Nathans, J. (1996). A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem*, 271(8), 4468-4476.
- Wang, Y., & Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development*, 134(4), 647-658.
- Wang, Y., Thekdi, N., Smallwood, P. M., Macke, J. P., & Nathans, J. (2002). Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. *J Neurosci*, 22(19), 8563-8573.
- Wang, Y., Zhang, J., Mori, S., & Nathans, J. (2006). Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 knock-out mice: A comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J Neurosci*, 26(2), 355-364.
- Wassef, M., & Joyner, A. L. (1997). Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum. *Perspect Dev Neurobiol*, 5(1), 3-16.
- Wilkinson, D. G., Bailes, J. A., & McMahon, A. P. (1987). Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell*, 50(1), 79-88.
- Williams, R., Ryves, W. J., Dalton, E. C., Eickholt, B., Shaltiel, G., Agam, G., & Harwood, A. J. (2004). A molecular cell biology of lithium. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 5), 799-802.
- Winkler, C., Kirik, D., & Bjorklund, A. (2005). Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci*, 28(2), 86-92.
- Wurst, W., Auerbach, A. B., & Joyner, A. L. (1994). Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development*, 120(7), 2065-2075.
- Wurst, W., & Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci*, 2, 99-108.
- Yang, J., Si, T., Ling, Y., Ruan, Y., Han, Y., Wang, X., Zhang, H., Kong, Q., Li, X., & Liu, C. (2003). Association study of the human FZD3 locus with schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 54(11), 1298-1301.

- 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(5), 755-766.
- Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B. J., Olson, L., & Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*, 276(5310), 248-250.
- Zhang, X., Smith, D. L., Meriin, A. B., Engemann, S., Russel, D. E., Roark, M., Washington, S. L., Maxwell, M. M., Marsh, J. L., Thompson, L. M., Wanker, E. E., Young, A. B., Housman, D. E., Bates, G. P., Sherman, M. Y., & Kazantsev, A. G. (2005). A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(3), 892-897.
- Zhao, C., Aviles, C., Abel, R. A., Almli, C. R., McQuillen, P., & Pleasure, S. J. (2005). Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval. *Development*, 132(12), 2917-2927.
- Zhao, S., Maxwell, S., Jimenez-Beristain, A., Vives, J., Kuehner, E., Zhao, J., O'Brien, C., de Felipe, C., Semina, E., & Li, M. (2004). Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J Neurosci.*, 19(5), 1133-1140.

Webseiten:

Statistisches Bundesamt Deutschland www.destatis.de

Bundesfinanzministerium www.bundesfinanzministerium.de

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Institut durchführen zu können. Die mir immer gewährte Unterstützung sowie sein Anspruch waren für mich Motivation und Ansporn zugleich.

Frau Dr. Nilima Prakash gebührt der Dank für die exzellente Betreuung während meiner Promotion. Zahlreiche fachliche Diskussionen waren für mich stets ein Hinzugewinn und der Ursprung neuer Ideen.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer und Herrn PD Dr. Johannes Beckers bin ich verbunden für Ihre Bereitschaft meine Promotionsarbeit zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Antonio Simeone und Herrn Dr. Chichung Lie für die Begleitung meiner Arbeit und ideenreiche Diskussionen im Rahmen des Dissertationskomitees danken.

Ebenso möchte ich Frau Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn für die Unterstützung im Bereich der Morphologie und Histologie Dank sagen.

Herrn Dr. Dietrich Trümbach danke ich für die Durchführung der *in silico* Analyse, Frau Theresa Fauss-Kessler für die statistische Betreuung meiner Daten sowie Frau Susanne Weidemann und Frau Adrienne Tasdemir für die Durchführung der IVF.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, besonders Frau Dr. Eleonora Minina, Herrn Dr. Jordi Guimera i Vilaro, Frau Susanne Laaß sowie den Mitarbeitern am Institut für Entwicklungsgenetik möchte ich für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn Dr. Thomas Fischer danke ich für die Einführung in die Frizzled Thematik und Herrn Changgeng Peng für die Unterstützung bei der ChIP.

Für die fortwährende Unterstützung in der Maushaltung bin ich den Tierpflegerinnen, besonders Frau Carmen Haas dankbar.

Meinen Eltern, Susanna und Christian danke ich herzlich für ihren Zuspruch und ihre Geduld während des Studiums und der Promotion. Schließlich danke ich meiner Sissi und Frederico für ihre Liebe und Verständnis, die mich stets bestärkt haben diesen Weg zu gehen.

9. Anhang

9.1. Umrechnung Schwerkraft/ Drehzahl

In einigen Protokollen unterschiedlicher Firmen wurden *g* bzw. *rcf* (engl. relative centrifugal force) oder *rpm* für Zentrifugen angegeben. Zur Umrechnung wurde folgende Formel benutzt.

$$g = (1,118 \cdot 10^{-5}) r \cdot n^2$$

g – Vielfaches der Erdbeschleunigung

r – Radius der Zentrifuge

n – Drehzahl (rpm)

9.2. *Lef1 ko* Maus: Einzelergebnisse der Zellzählung

Die folgende Abbildung zeigt die Einzelergebnisse der Zählung der Th^+ Neuronen in *Lef1 ko* Mäusen, im Vergleich dazu jeweils der *wt* aus dem gleichen Wurf. Es sind Schwankungen zwischen den einzelnen Paaren zu erkennen.

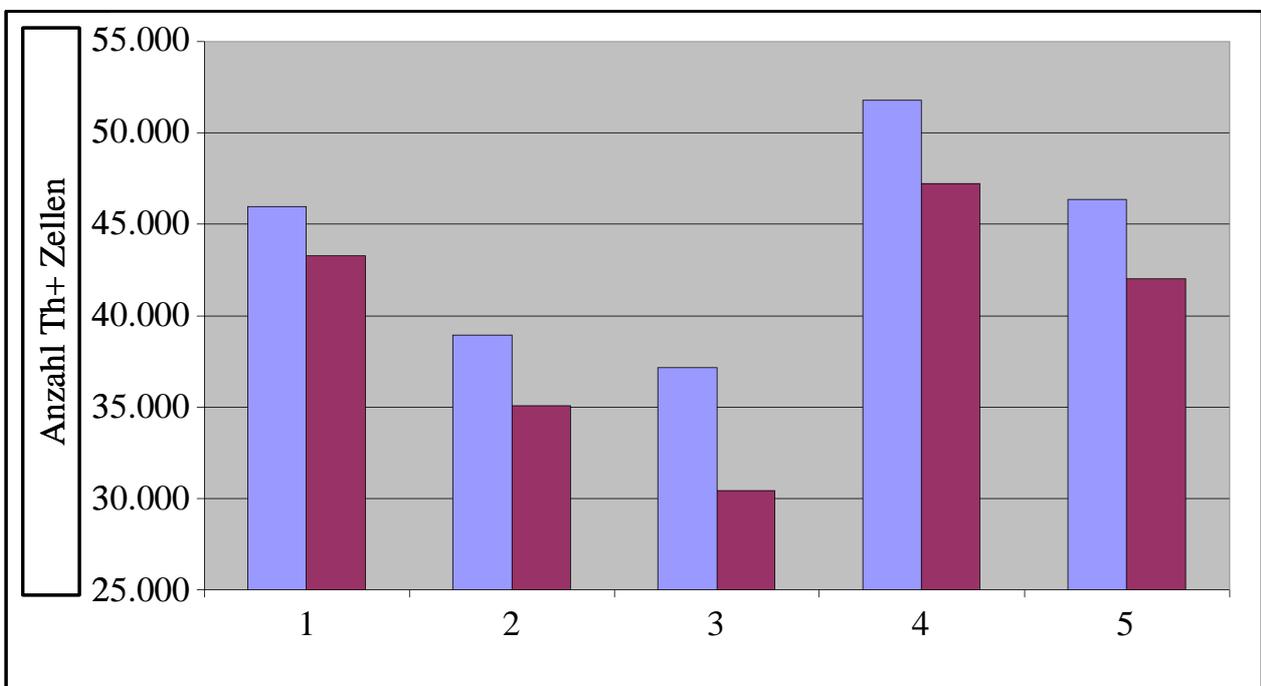


Abb. 38: Einzelergebnisse der Th^+ Zellzählung. Insgesamt wurden 5 Paare (1 – 5) untersucht. *Wt* (blau) und *ko* (rot) sind jeweils Wurfgeschwister. Die Unterschiede zwischen *wt* und *ko* eines Paares betragen jeweils in etwa 10%. Die Differenzen zwischen den einzelnen Würfen können z.B. durch geringes Abweichen vom Stadium E17.5, verschiedene Bedingungen bei den IHC oder der Zellzählung hervorgerufen werden.

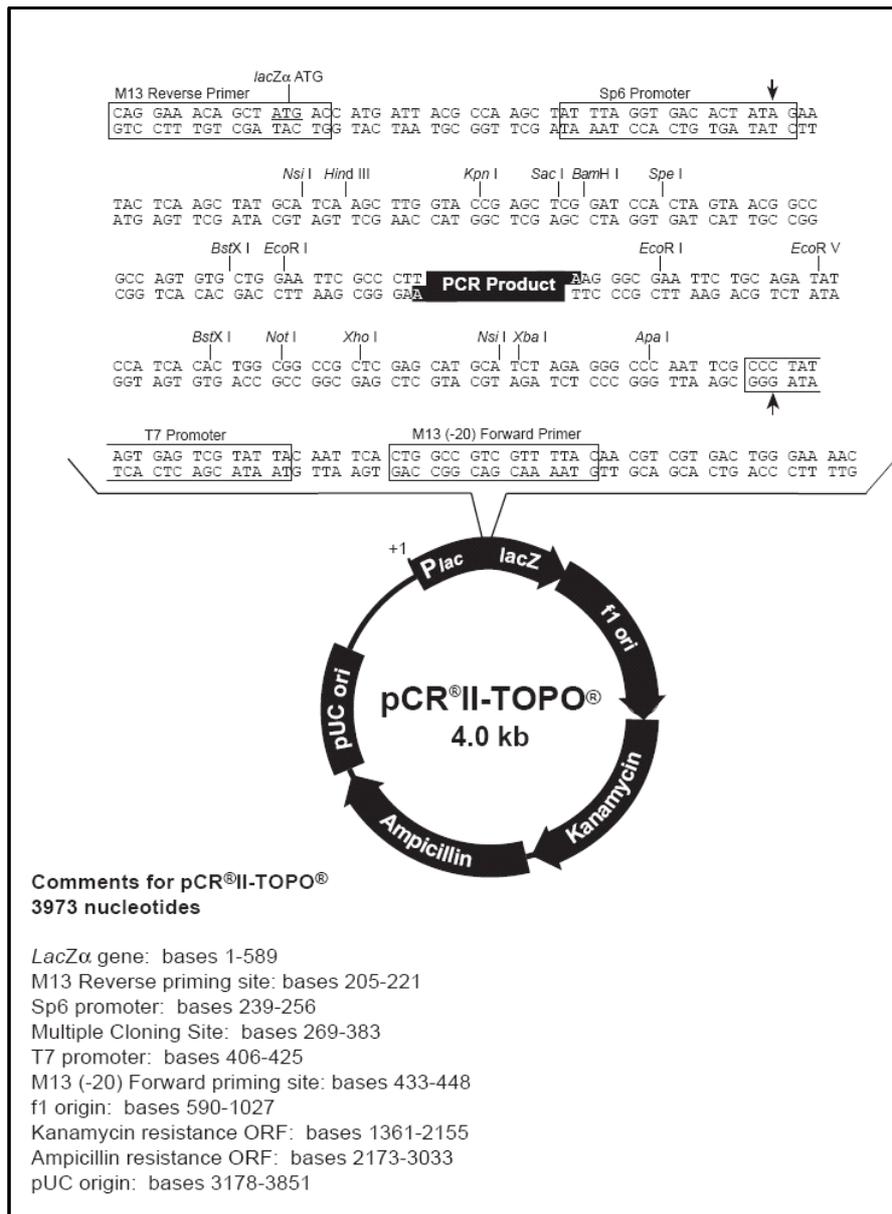
9.3. Antikörperverzeichnis

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalognr.
Primär-Antikörper				
Aldh1a1	Rabbit	1:1200	Abcam	ab24343
Pou4f1	Mouse	1:100	Santa Cruz	Sc-8429
Cleaved caspase 3	Rabbit	1:100	Cell Signaling	Asp175 5a1
Cyclin D1	Rabbit	1:150	Thermo scientific	RM-9104
Islet1	Mouse	1:100	DSHB	40.2D6-c
Lef1 - Nr.1	Rabbit	IP - 1:50	Cell Signaling	2286
Lef1 - Nr.2	Rabbit	IP - 1:50	Cell Signaling	2230
Mash1	Mouse	1:40	BD Pharmingen	556604
NeuN	Mouse	1:300	Chemicon	MAB377
P27	Mouse	1:2000	BD Biosciences	610241
Ph3	Rabbit	1:500	Upstate-Millipore	06-570
Pitx3	Rabbit	1:300	Zymed-Invitrogen	382850
Sox2	Rabbit	1:200	Santa Cruz	sc-20088
Th	Rabbit	1:150	Chemicon	AB152
Sekundär- Antikörper				
Donkey-anti-rabbit	Donkey	1:500	Molecular Probes	red(594) A21207
Donkey-anti-rabbit	Donkey	1:500	Molecular Probes	green(488) A21206
Donkey-anti-mouse	Donkey	1:500	Molecular Probes	red(594) A21203
Donkey-anti-mouse	Donkey	1:500	Molecular Probes	green(488) A21202

Tab. 3: Verzeichnis der verwendeten Antikörper.

9.4. Vektorkarte pCRII- TOPO

Die Vektorkarte des pCRII- TOPO Vektors von Invitrogen zeigt unter anderem die Resistenzen sowie die Enzymschnittstellen.



9.5. Abkürzungen

Bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cpm	counts per minute (Radioaktivitätsmessung)
EtBr	Ethidium Bromid
x g	x-fache Erdbeschleunigung
g	Gramm
IP	Immun Präzipitation
IHC	Immunhistochemie

ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
<i>ko</i>	Knock Out (eines Gens/ -abschnitts)
LB	Luria-Bertani
μm	Mikrometer
ml	Milliliter
MHG	Mittel- Hinterhirn Grenze
Mio.	Millionen
min.	Minuten
p	pico
px	Pixel
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
Prot. K.	Proteinase K
r	Radius
resp.	respektive
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
sek.	Sekunden
Std.	Stunde
SVZ	Subventrikulärzone
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V/V	Volumen über Volumen
VZ	Ventrikulärzone
<i>wt</i>	Wildtyp

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe sowie keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass ich mich zu keiner Zeit anderweitig um die Erlangung eines Doktorgrades beworben habe.

München, den 15.07.2009

Sebastian Stübner