Technische Universität München

Institut für Entwicklungsgenetik, GSF-Forschungszentrum, Neuherberg

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Analyse der Funktion von *Wnt1* während der Mittel- und Hinterhirnentwicklung von Säugetieren

DIPL. BIOL. UNIV. MARKUS PANHUYSEN

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. E. Grill**
Prüfer der Dissertation: **1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl**
2. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst
3. Univ.-Prof. G. A. Manley, Ph.D. /Princeton N.J./USA

Die Dissertation wurde am 29.01.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.3.2003 angenommen.

1 ZUSAMMENFASSUNG 5

2 EINLEITUNG 6

2.1 Organisationszentren während der Entwicklung des zentralen Nervensystems von Wirbeltieren 6

2.2 Wnts sind Liganden und stehen am Anfang mehrerer Signaltransduktionswege 9

2.3 Das Expressionsmuster von Wnt1 12

2.4 Charakterisierung der Funktion von Wnt1 durch *Knockout* Experimente 13

2.5 Regulation von Gewebegröße, Zellwachstum und Zellteilung während der Entwicklung 13

2.6 Die *Knock-In* Targetingstrategie als Werkzeug zur Funktionsanalyse von *Wnt1* 14

3 ERGEBNISSE 16

3.1 Herstellung der Mausmutante 16

3.2 Untersuchung der Funktionsfähigkeit des Transgens 22

3.3 Untersuchung der Musterbildung während der frühen Mittel- und Hinterhirnentwicklung 28

***3.4* *LEF1*-Expression wird in *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen vorübergehend ektopisch induziert 30**

3.5 Phänotypische Charakterisierung der adulten *En1*$^{+/Wnt1}$ Maus 32

3.6 Untersuchungen zur Entstehung des *En1*$^{+/Wnt1}$ Phänotyps 41

3.7 Gendosiseffekt der proliferationsverstärkenden Wirkung von *Wnt1* und partielle Aufhebung des *En1 Knockout* Phänotyps in *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäusen 49

4 DISKUSSION 54

4.1 Erzeugung der transgenen Mauslinie 54

4.2 Ektopische Expression von W*nt1* in der *En1* Expressionsdomäne 55

4.3 Die Positionierung des MHO wird durch eine Verschiebung der *Wnt1* Expressionsdomäne nicht verändert 56

***4.4* *Wnt1* verstärkt die Proliferation in der Mittel-/Hinterhirnregion 58**

4.5 Wnt1 Signaltransduktion während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung 62

4.6 Teilweise Aufhebung des *En1-Knockout* Phänotyps durch ektopische Expression von *Wnt1* 63

4.7 Ektopisches Wnt1 beeinflußt das neuronale Zellgrößenwachstum 65

4.8 Die Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation während der Mittel- / Hinterhirnentwicklung 66

4.9 Modell zur Funktion von Wnt1 während der Mittel- / Hinterhirnentwicklung 68

5 MATERIAL 70

5.1 Geräteliste 70

5.2 Chemikalien 72

5.3 Verwendete Baukastensysteme 74

5.4 Allgemein verwendete Lösungen und Stammlösungen 74

5.5 Lösungen für die Southernblot Analyse 75

5.6 Lösungen für den Umgang mit Bakterien 75

5.7 Zellkultur – Medien und Medienzusätze 76

5.8 Lösungen für die RNA *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen 76

5.9 Lösungen für die RNA *in situ* Hybridisierung an Paraffinschnitten 78

5.10 Lösungen für die Myelinfärbung nach Gallyas 78

5.11 Lösungen für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) 78

5.12 Enzyme 79

5.13 Antikörper 79

5.14 Lösungen für die Immunhistochemie 80

5.15 Lösung zur *in vivo* Markierung proliferierender Zellen mit BrdU 81

5.16 Zelllinien 81

***5.17* *E.coli* Bakterienstämme 81**

5.18 Vektoren und Plasmide 81

5.19 Oligonukleotide 84

5.20 DNA-Sonden 84

5.21 Mauslinien 84

5.22 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges 85

6 METHODEN 86

6.1 Tierhaltung 86

6.2 Bestimmung embryonaler Stadien 86

6.3 Zellkulturtechnik embryonaler Stammzellen 86

6.4 Herstellung von Injektions-Chimären 91

6.5 Aufzucht der transgenen Mäuse 92

6.6 Herstellung kompetenter Bakterien 92

6.7 Transformation kompetenter Bakterien 92

6.8 Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren 93

6.9 Herstellung rekombinanter DNS 95

6.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 97

6.11 RNA *in situ* Hybridisierung 98

6.12 Histochemische und immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten 102

6.13 Stereologische Untersuchungen an Gewebeschnitten 105

6.14 BrdU Inkorporation 107

6.15 Durchflusszytometrie 108

6.16 Elektronenmikroskopie 109

6.17 ß-Galaktosidase Färbung 110

6.18 Southernblot Analyse 110

7 ANHANG 113

Danksagungen 113

Abkürzungen 114

8 LITERATUR 116

1 Zusammenfassung

Das sezernierte Glykoprotein Wnt1 wird während der Embryonalentwicklung von Säugetieren im rostralen Bereich der sich entwickelnden Mittel-/Hinterhirngrenze exprimiert. Geninaktivierungsstudien haben gezeigt, dass Wnt1 für die normale Entwicklung dieser Hirnregion von essentieller Bedeutung ist. Die genaue Funktion von Wnt1 konnte jedoch durch diesen Ansatz nicht geklärt werden. Um tiefere Einsichten in die Bedeutung dieses Faktors für die Mittel-/Hinterhirnentwicklung zu erlangen, wurde *Wnt1* in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der *Knock-In* Technologie ektopisch unter der Kontrolle des endogenen *En1* Promotors exprimiert. Dadurch konnte die Expressionsdomäne von *Wnt1* sowohl nach rostral als auch nach kaudal über die Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg erweitert werden. Die heterozygoten Mäuse sind lebensfähig und konnten daher detailliert untersucht werden. Anhand der Expressionsanalyse von Markergenen konnte gezeigt werden, dass zwar subtile Veränderungen der Musterbildungsaktivität des Mittel-/Hinterhirnorganisators durch die ektopische Expression von *Wnt1* erzeugt wurden, jedoch ohne die Mittel-/Hinterhirngrenze entsprechend der neuen *Wnt1*-Expressionsdomäne zu verschieben. Während der späten Embryonalentwicklung konnte eine enorm verstärkte Proliferation neuraler Vorläuferzellen im dorsalen Mittelhirn beobachtet werden, die in adulten Tieren zu sehr stark vergrößerten inferioren colliculi führte. Ventrale Strukturen der Mittel-/Hinterhirnregion sowie das Kleinhirn waren von den morphologischen Veränderungen weit weniger betroffen. Weiterhin konnte ein klarer Zusammenhang zwischen Gendosis und Proliferationsstärke nachgewiesen werden. Die Zellzykluslänge der neuralen Vorläuferzellen scheint in den Mutanten leicht verkürzt zu sein, was auf ein beschleunigtes Zellwachstum hindeutet. Zudem konnte gezeigt werden, dass der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg ektopisch in der dorsalen Mittelhirnregion aktiviert wird. In adulten transgenen Tieren wurde die überraschende Beobachtung gemacht, dass sich die Volumina der Neurone in den inferioren colliculi mit fortschreitendem Alter der Tiere dramatisch vergrößerten. Durch immunhistochemische, durchflusszytometrische und elektronenmikroskopische Analysen der vergrößerten Neurone konnten zytopathologische Prozesse als Ursache für das ungewöhnliche Wachstum weitgehend ausgeschlossen werden. Aus den gewonnenen Daten konnte ein Modell für die Funktionsweise von *Wnt1* während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung entwickelt werden, wonach *Wnt1* während der Embryonalentwicklung Wachstum und Proliferation neuraler Vorläuferzellen verstärkt, während terminal differenzierte Neurone von *Wnt1* zwar zu langsam fortschreitendem Zellwachstum, nicht jedoch zu erneuten Zellteilungen angeregt werden können.

2 Einleitung

Die biologischen Vorgänge während der Individualentwicklung eines Lebewesens, der Ontogenese, ausgehend von einer befruchteten Eizelle über Embryonalstadien und juvenile Stadien zum adulten, reproduktionsfähigen Organismus sind äußerst komplex. Dennoch konnten in den vergangenen Jahrzehnten anhand unzähliger Studien an Modellorganismen wie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Taufliege *Drosophila melanogaster*, dem Zebrafisch *Danio rerio*, oder auch der Hausmaus *Mus musculus* tiefe Einblicke in die der Entwicklung zugrunde liegenden biologischen Mechanismen gewonnen werden. Es lassen sich zwei grundlegend verschiedene Formen der Entwicklung unterscheiden: Die Mosaikentwicklung und die Regulationsentwicklung. Bei der Mosaikentwicklung findet eine sehr frühe Determination des Schicksals einzelner Zellen oder Zellverbände statt, und es gibt genetisch festgelegte Zellstammbäume. Die Entwicklung des Fadenwurms *C. elegans* ist ein Beispiel für eine beinahe ausschließliche Mosaikentwicklung. So führt die Ablation einer einzigen Zelle während der Entwicklung von *C. elegans* zum vollständigen Verlust aller normalerweise aus dieser Zelle hervorgehenden Tochterzellen. Bei der Regulationsentwicklung finden Wechselwirkungen zwischen benachbarten Zellverbänden statt. Das Schicksal einer Zelle wird erst spät festgelegt, und die Zellstammbäume sind nicht vollständig determiniert. Diese Form der Entwicklung wurde schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Hans Spemann (1869-1941) durch Schnürungsexperimente an Amphibienembryonen untersucht. Zusammen mit Hilde Proescholdt-Mangold konnte Spemann 1921 anhand der Urmundlippe von Amphibienembryonen zeigen, dass es „Organisatoren“ gibt, das sind Zellverbände, die die Fähigkeit besitzen, entwicklungsrelevante Informationen an benachbarte Zellen oder Gewebe weiterzugeben und dadurch deren Entwicklungsschicksal zu beeinflussen. Zwar lassen sich Mosaik- und Regulationsentwicklung klar voneinander abgrenzen, doch stellt die Entwicklung der meisten Tiere eine Mischform aus den beiden Modellen dar.

2.1 Organisationszentren während der Entwicklung des zentralen Nervensystems von Wirbeltieren

Während der frühen Entwicklung des zentralen Nervensystems von Wirbeltieren spielen Organisatoren eine bedeutende Rolle, insbesondere der als anteriore Neuralfurche (*anterior neural ridge*) bezeichnete Organisator, der die Entwicklung der vorderen Neuralplatte beeinflußt, und der Mittel-/Hinterhirnorganisator (*isthmic organizer*, MHO), der maßgeblich an der Entwicklung der Mittel- und Hinterhirnregion (MHR) beteiligt ist.

Vor der Ausbildung dieser Organisationszentren wird das zunächst unsegmentierte Neuralrohr, das aus der Neuralplatte durch Abrundung im Zuge der Neurulation entstanden ist, in einem ersten Schritt der Regionalisierung in drei, später in fünf Gehirnvesikel unterteilt. Diese Abschnitte werden als Prosencephalon, Mesencephalon, Rhombencephalon bzw. als Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Rhombencephalon bezeichnet. Korrespondierend zu der Vesikelbildung entstehen Bereiche differentiell exprimierter Gene entlang der anterior – posterior Achse. Zu den ersten Proteinen, die regionenspezifisch synthetisiert werden, gehören die Transkriptionsfaktoren Otx2 und Gbx2, die beide der Familie der Homeodomänenproteine zugeordnet werden. Otx2 wird ab dem Embryonalstadium E6.5 im anterioren Neuralrohr exprimiert (Simeone, A. *et al.*, 1993; Ang, S. L. *et al.*, 1994), während Gbx2 ab dem Stadium E7.5 posterior zu der Otx2 Expressionsdomäne exprimiert wird (Bouillet, P. *et al.*, 1995; Wassarman, K. M. *et al.*, 1997). Die Position des MHO wird durch die Grenze der Expressionsdomänen von Otx2 und Gbx2 bestimmt (Broccoli, V. *et al.*, 1999; Millet, S. *et al.*, 1999; Simeone, A., 2000; Joyner, A. L. *et al.*, 2000; Garda, A. L. *et al.*, 2001).

Entdeckt wurde der MHO durch Transplantationsexperimente an Vogelembryonen. Wurde Gewebe aus der MHR in die kaudale Vorderhirnregion transplantiert, so änderte das Empfängergewebe sein Schicksal und entwickelte Gewebe mit Mittelhirncharakter (Nakamura, H. *et al.*, 1988; Martinez, S. *et al.*, 1990; Martinez, S. *et al.*, 1991; Marin, F. *et al.*, 1994). Transplantation der MHR in das Rhombencephalon induzierte Gewebe mit Kleinhirncharakter (Martinez, S. *et al.*, 1995).

Die Regionalisierung des Neuralrohres durch die differenzielle Expression von Otx2 und Gbx2 ist nur der erste Schritt in der Ausbildung des MHO. Die nächsten Gene, die an der sich entwickelnden Mittel-/Hinterhirngrenze induziert werden, kodieren für die Transkriptions-faktoren Pax2, En1 sowie für das sezernierte Glykoprotein Wnt1. Nur wenig später werden auch die Transkriptionsfaktoren Pax5, En2 und der sezernierte Ligand Fgf8 exprimiert (Rhinn, M. *et al.*, 2001). Alle diese Faktoren sind für die normale Entwicklung der Mittel-/Hinterhirngrenze von großer Bedeutung, wie durch gezielte Geninaktivierungsexperimente gezeigt werden konnte. Embryonen, die homozygot für eine *Otx2* Mutation sind, fehlt das gesamte Vorder-, Mittel- und Hinterhirn bis zu Rhombomer 3 (Acampora, D. *et al.*, 1995; Ang, S. L. *et al.*, 1996; Rhinn, M. *et al.*, 1999). Inaktivierung beider *Gbx2*-Allele führt zu einer kaudalen Expansion des Mittelhirns und einem Verlust des vorderen Hinterhirnes. Einhergehend mit der Erweiterung des Mittelhirns sind auch die Expressionsdomänen von *Otx2*, *Wnt1* und *Fgf8* nach kaudal verschoben (Wassarman, K. M. *et al.*, 1997; Millet, S. *et al.*,

1999). Der Phänotyp von *Pax2-Knockout* Mäusen hängt sehr von dem genetischen Hintergrund der Tiere ab und reicht von sehr subtilen morphologischen Veränderungen bis hin zu einem völligen Verlust des hinteren Mittelhirns und Kleinhirns (Favor, J. *et al.*, 1996; Torres, M. *et al.*, 1996; Schwarz, M. *et al.*, 1997). *Pax5*$^{-/-}$ Mäuse zeigen morphologische Veränderungen in der Region des dorsalen Mittelhirns und des vorderen Kleinhirns (Urbanek, P. *et al.*, 1994). *Pax2* und *Pax5* Doppelmutanten weisen einen deutlich ausgeprägteren Phänotyp auf als einzelne *Pax2* oder *Pax5* Mutanten, was auf eine redundante Funktion der beiden Gene sowie auf einen Effekt der Gendosis hindeutet (Urbanek, P. *et al.*, 1997).

En1-Mutanten weisen, abhängig von dem genetischen Hintergrund, eine stark reduzierte oder vollständig fehlende Mittel-/Hinterhirnregion auf und sterben kurz nach der Geburt (Wurst, W. *et al.*, 1994). *En2* ist für die Entwicklung der MHR von geringerer Bedeutung als *En1*, da *En2*-Inaktivierungsexperimente nur zu einer leichten Veränderung der Kleinhirnschichtung führt (Millen, K. J. *et al.*, 1994). Ähnlich zu *Pax2* und *Pax5* scheinen sich auch *En1* und *En2* in ihrer Wirkung zu ergänzen, wie Experimente an Doppelmutanten gezeigt haben (Blanquet *et al.*, unveröffentlichte Daten, Liu, A. *et al.*, 2001a). *Fgf8-Knockout* Mäuse haben einen Gastrulationsdefekt, doch konnte an Mäusen mit hypomorphen *Fgf8*-Allelen die Bedeutung von *Fgf8* für die normale Entwicklung von Mittel- und Hinterhirn gezeigt werden (Meyers, E. N. *et al.*, 1998; Sun, X. *et al.*, 1999). Der Phänotyp von *Wnt1*$^{-/-}$ Mäusen ist leicht variabel und besteht im wesentlichen aus der Reduktion oder dem Verlust der Mittelhirnregion und des Kleinhirns (McMahon, A. P. *et al.*, 1990; Thomas, K. R. *et al.*, 1990). Außerdem sind in Mäusen mit einer hypomorphen *Wnt1* Mutation die Expressionsdomänen von Mittelhirn- und Hinterhirn-spezifischen Markergenen weniger scharf abgegrenzt als in wildtypischen Tieren, was eine Bedeutung von *Wnt1* für die Ausbildung der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn nahelegt (Bally-Cuif, L. *et al.*, 1995). Durch Expression von *En1* in der normalen *Wnt1*-Expressiondomäne von *Wnt1*$^{-/-}$ Mäusen konnte zudem die normale Entwicklung der MHR teilweise wiederhergestellt werden (Danielian, P. S. *et al.*, 1996). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass *Wnt1* für die Aufrechterhaltung der *En1* Expression verantwortlich ist, oder dass die beiden Gene die gleichen oder wenigstens in ihrer Funktion ähnliche Zielgene regulieren.

Neben den Geninaktivierungsexperimenten, die wesentlich zur Aufklärung von Genfunktionen beitragen können, können andere experimentelle Ansätze wie zum Beispiel Überexpression oder Transplantationsexperimente wichtige neue Erkenntnisse über die Bedeutung einzelner Gene während der Embryonalentwicklung liefern.

So konnte die Hypothese, das Otx2 und Gbx2 die Position des MHO und nachfolgend der Mittel-/Hinterhirngrenze festlegen, durch die ektopische Expression dieser Faktoren untermauert werden. Wurde die Expressionsdomäne von Otx2 nach kaudal bzw. von Gbx2 nach rostral jeweils über die normale Expressionsgrenze hinweg verschoben, konnte gezeigt werden, dass die Position des MHO der künstlich erzeugten Expressionsgrenze von Otx2 und Gbx2 folgte (Broccoli, V. *et al.*, 1999; Millet, S. *et al.*, 1999). Fgf8 kommt eine besondere Bedeutung während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung zu und scheint eines der Schlüsselmoleküle des MHO zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des MHO von in Fgf8 getränkten Acrylkügelchen wenigstens teilweise nachgeahmt wurde, sobald diese mit embryonalem Vorderhirngewebe in Kontakt kamen (Crossley, P. H. *et al.*, 1996; Liu, A. *et al.*, 1999; Martinez, S. *et al.*, 1999; Shamim, H. *et al.*, 1999; Liu, A. *et al.*, 2001a). Im Gegensatz zu Fgf8 ist über die Funktion von Wnt1 während der Entwicklung der MHR sehr wenig bekannt.

2.2 Wnts sind Liganden und stehen am Anfang mehrerer Signaltransduktionswege

Wnt1 wurde als erstes Gen der Wnt-Genfamilie entdeckt und wurde zunächst unter dem Namen „*int1*“ mit dem Maus-Brusttumorvirus (MMTV) in Zusammenhang gebracht (Nusse, R. *et al.*, 1982; van't Veer, L. J. *et al.*, 1984; Nusse, R. *et al.*, 1984). Nachdem eine ganze Reihe von Genen mit hoher Homologie zu *int1* entdeckt worden waren, darunter auch das Drosophila Gen *wingless* (*wg*), wurde das Gen in den heutigen Namen umbenannt, und die „*Wnt*“-Genfamilie entstand (Nusse, R. *et al.*, 1991). Mittlerweile sind in der Maus 18 verschiedene *Wnt* Gene charakterisiert worden, und es wurde deutlich, dass *Wnts* in sehr vielfältige biologische Vorgänge involviert sind, darunter z.B. auch die Regulation von Musterbildung, Zellmigration, Zellpolarität, Proliferation und Apoptose (Nusse, R. *et al.*, 1992; Miller, J. R., 2002; Nusse, R., 2002). Die Genprodukte der *Wnt*-Genfamilie stehen am Anfang mehrerer Signaltransduktions-kaskaden (Abbildung 1). Gemeinsam ist den Signaltransduktionswegen die Interaktion des Wnt-Moleküls mit einem 7-Helix-G-Protein-gekoppelten Rezeptor aus der Frizzled Familie (Bhanot, P. *et al.*, 1996). Im „kanonischen“ oder „klassischen“ Wnt Signaltransduktionsweg und vielleicht auch im Wnt/Ca^{2+} Signaltransduktionsweg spielt ein drittes Molekül als Korezeptor bei der Ligand-Rezeptor-Interaktion eine wichtige Rolle, LRP/arrow (*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*) (Wehrli, M. *et al.*, 2000; Tamai, K. *et al.*, 2000; Pinson, K. I. *et al.*, 2000).

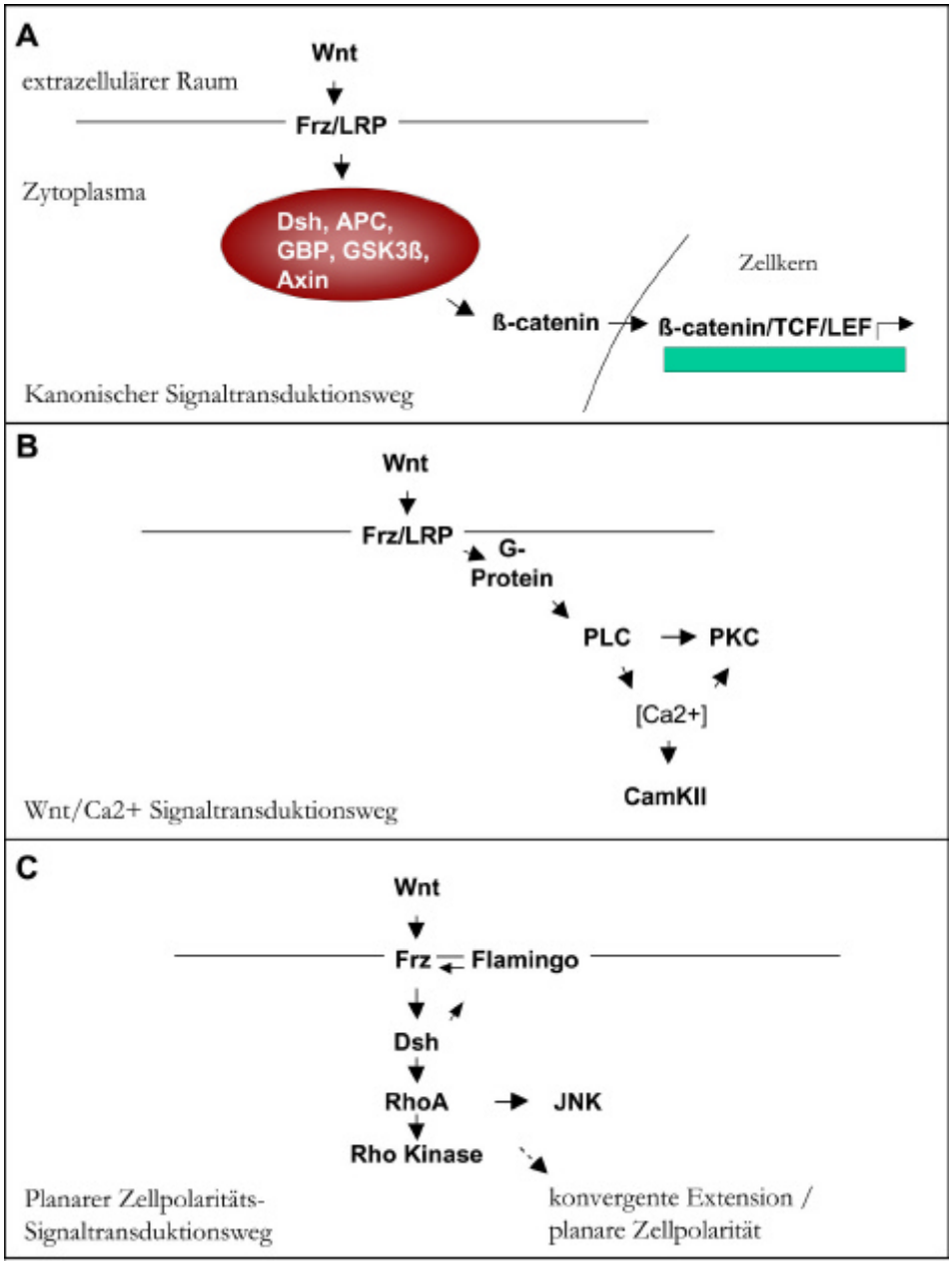

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Wnt Signaltransduktionswege. Die nähere Beschreibung befindet sich im Haupttext.

Membranständige Proteoglykane regulieren dabei die Interaktion zwischen Wnts und dem Rezeptorkomplex (Baeg, G. H. *et al.*, 2000). Eine Reihe sezernierter Proteine, darunter sFRPs (*secreted frizzled-like proteins*) und WIFs (*Wnt inhibitory factors*) können mit Wnts physikalisch interagieren und dadurch die Signaltransduktion inhibieren (Rattner, A. *et al.*, 1997; Hsieh, J. C. *et al.*, 1999). Dickkopf (Dkk) ist ein weiterer Faktor, der Wnt Signaltransduktion modifizieren kann; der Mechanismus beruht in diesem Fall allerdings nicht auf einer Interaktion mit dem Liganden, sondern auf einer Bindung an den Korezeptor LRP/arrow (Mao, B. *et al.*, 2001; Brott, B. K. *et al.*, 2002; Li, L. *et al.*, 2002). Im „klassischen“ oder „kanonischen“ Wnt Signaltransduktionsweg sowie im planaren Zellpolaritäts-Signalweg

führt das Signal zur Aktivierung von Dishevelled (Dsh). Im „klassischen“ Signaltransduktionsweg folgt auf die Aktivierung von Dsh die Signalweiterleitung zu einem Multiproteinkomplex, der unter anderem aus Adenomatous Polyposis Coli (APC), GSK3-bindendem Protein (GBP/Frat1), Axin und Glykogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β) besteht. Die Kinase GSK3β wird durch das Wnt Signal inaktiviert. Als Folge davon wird das Schlüsselmolekül des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges, Armadillo/β-catenin, nicht mehr phosphoryliert. Die Stabilität und intrazelluläre Lokalisation von β-catenin hängt vom Phosphorylierungszustand des Proteins ab. Im phosphorylierten Zustand bindet β-catenin an Axin und ist für die Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation zugänglich (Aberle, H. *et al.*, 1997), während es im unphosphorylierten Zustand im Zytoplasma akkumuliert (Salic, A. *et al.*, 2000). Das stabilisierte β-catenin kann in den Zellkern wandern und dort mit Transkriptions-faktoren der TCF/LEF-Familie interagieren, wodurch die Genexpression responsiver Zielgene reguliert wird (Abbildung 1 A) (Nusse, R., 1999; Roose, J. *et al.*, 1999). Eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflußt und modifiziert die klassische Wnt Signaltransduktion, z.B. Caseinkinase 1 und 2, Phosphatase PP2A, Groucho und CBP/P300. Verschiedene Übersichtsartikel liefern hier ein vollständiges Bild des heutigen Wissensstandes (Nusse, R., 1999; Sakanaka, C. *et al.*, 2000; Huelsken, J. *et al.*, 2001; Moon, R. T. *et al.*, 2002).

Über den planaren Zellpolaritäts-Signaltransduktionsweg beeinflussen Wnts die Organisation des Zytoskeletts und steuern konvergente Extensionsbewegungen während der Gastrulation und Neurulation (Djiane, A. *et al.*, 2000; Wallingford, J. B. *et al.*, 2000; Wallingford, J. B. *et al.*, 2001). Die Signaltransduktion erfolgt wie auch im klassischen Wnt-Signaltransduktionsweg über Dsh (Abbildung 1 C) (Tada, M. *et al.*, 2000; Heisenberg, C. P. *et al.*, 2000; Adler, P. N. *et al.*, 2001). RhoA, Rho Kinase und Jun-N-terminale Kinase (JNK) werden jedoch nur in diesem Signaltransduktionsweg aktiviert (Abbildung 1 C) (McEwen, D. G. *et al.*, 2000).

Der Wnt/Ca^{2+} Signaltransduktionsweg führt ausgehend von der Wnt-Frizzled-Interaktion und der Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) und Aktivierung der Kalzium/Calmodulin-regulierten Kinase II (CamKII, Abbildung 1 B). Bisher sind keine Zielgene dieses Signaltransduktionsweges bekannt, doch konnte im Krallenfrosch *Xenopus* gezeigt werden, dass der Wnt/Ca^{2+}-Signalweg antagonistisch zu dem klassischen Wnt-Signaltransduktionsweg wirkt (Torres, M. A. *et al.*, 1996; Slusarski, D. C. *et al.*, 1997; Kuhl, M. *et al.*, 2000).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Familie der Wnt-Moleküle entsprechend ihrer Funktion und Signaltransduktions-Spezifität in unterschiedliche Klassen unterteilt werden kann. So wurde im

Krallenfrosch *Xenopus laevis* gezeigt, dass abhängig von Wnt und Frizzledrezeptor der „klassische“ ß-catenin oder der Wnt/Ca^{2+}-Signalweg stimuliert wird. Durch Überexpression von XWnt1, XWnt3a, XWnt8 und XWnt8b konnte der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg aktiviert werden, während XWnt4, XWnt5a und XWnt11 den Wnt/Ca^{2+}-Signalweg aktivierten (Kuhl, M. *et al.*, 2000). *In vivo* scheinen spezifische Wnts nicht in jedem Fall auf einen der beiden Signaltransduktionswege festgelegt zu sein, da die Überexpression von XWnt5a und humanem FZD5 in Xenopus Embryos zu einer Aktivierung des Wnt/β-catenin-Signalweges führte (He, X. *et al.*, 1997). Eine Aufteilung der Wnt-Proteine in zwei Klassen wurde schon vor der Kenntnis der Signaltransduktionswege anhand der biologischen Aktivität vorgenommen. Die Wnt1 Klasse konnte durch *in vivo* Überexpression in *Xenopus* Embryos eine Achsenduplikation hervorrufen, während die Wnt5a-Klasse dazu nicht in der Lage war (Sokol, S. *et al.*, 1991; Du, S. J. *et al.*, 1995). Korrespondierend zu den funktionellen Klassen der Wnts konnten auch die Frizzled-Rezeptoren in zwei funktionelle Gruppen eingeteilt werden, je nachdem, ob durch sie der β-catenin- oder der Ca^{2+}-Signalweg stimuliert werden konnte (Kuhl, M. *et al.*, 2000).

Das Gen *Wnt1* befindet sich bei der Maus auf Chromosom 15 (56.80 cM) und kodiert ein aus 370 Aminosäuren aufgebautes Protein, das wie auch die anderen Mitglieder der *Wnt*-Genfamilie posttranslational glykosyliert wird und über den sekretorischen Weg in den Extrazellularraum gelangt (Smolich, B. D. *et al.*, 1993; Papkoff, J., 1994).

2.3 Das Expressionsmuster von Wnt1

Das zeitliche und räumliche Expressionsmuster kann bereits wichtige Hinweise auf mögliche Funktionen eines Gens enthalten. Das Expressionsmuster von *Wnt1* während der Mausentwicklung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen detailliert beschrieben (Wilkinson, D. G. *et al.*, 1987; Parr, B. A. *et al.*, 1993; Bally-Cuif, L. *et al.*, 1994; Rowitch, D. H. *et al.*, 1995) und legt eine Funktion von *Wnt1* während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung nahe. Aus den Untersuchungen geht hervor, dass *Wnt1* ab dem 1-Somiten-Stadium (E8) exprimiert wird. Die Expressionsdomäne umfasst zunächst das gesamte sich entwickelnde Mittelhirn. Ab dem 9-Somiten-Stadium wird das Gen zudem in der dorsalen Mittellinie des Rückenmarks exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Expression im rostralen Mittelhirn bereits schwächer zu werden. Nach und nach engt sich die Expressionsdomäne im Mittelhirn ein bis auf einen dünnen Ring an der sich entwickelnden Mittel-/Hinterhirngrenze. Zusätzlich wird *Wnt1* im Stadium E9.5 (ca. 27-Somiten-Stadium) auch in der dorsalen Mittellinie des Vorder- und Mittelhirnes sowie in Form von zwei Fortsätzen („*Spikes*“) in der ventralen mesencephalen

Flexur synthetisiert (Vgl. auch Abbildung 6 A, D). Die Expression von *Wnt1* wird graduell schwächer und ist im Stadium E16.5 nur noch in der rhombischen Lippe des Hinterhirns festzustellen (vgl. Abbildung 9 A).

2.4 Charakterisierung der Funktion von Wnt1 durch *Knockout* Experimente

Um die Funktion von *Wnt1* während der Entwicklung des Nervensystems zu verstehen, wurde das Gen von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander durch gezielte Mutagenese (Gen *Knockout* Experimente) inaktiviert (McMahon, A. P. *et al.*, 1990; Thomas, K. R. *et al.*, 1990). *Wnt1*$^{-/-}$ Mäuse starben postnatal oder überlebten mit schweren Ataxien. Die Embryonen wiesen schon im Embryonalstadium E9.5 eine weitgehende Deletion der Mittel-/Hinterhirnregion auf, und es konnte gezeigt werden, dass es in diesen Embryonen zu einem schrittweisen Verlust der *En1* Expression kommt (McMahon, A. P. *et al.*, 1992). Aus den Untersuchungen wurde deutlich, dass *Wnt1* für die normale Entwicklung der Mittel-/Hinterhirnregion notwendig ist. Durch den Geninaktivierungsansatz konnte jedoch nicht geklärt werden, ob *Wnt1* direkt an der Musterbildungsfunktion des MHO beteiligt ist, oder ob das Gen möglicherweise nur indirekt für die Aufrechterhaltung der MHO-Aktivität von Bedeutung ist. Ferner könnte *Wnt1* als Proliferations- oder Überlebensfaktor die Entstehung des Gewebes in der MHR als Substrat für die Aktivität des MHO regulieren.

Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung der Proliferation für die Musterbildung während der Embryonalentwicklung näher erläutert.

2.5 Regulation von Gewebegröße, Zellwachstum und Zellteilung während der Entwicklung

Die Regionalisierung von zuvor unsegmentierten Geweben ist ein wichtiger Vorgang während der Embryonalentwicklung. Dies geschieht durch differenzielle Genexpression, gefolgt von und einhergehend mit der Kompartimentalisierung und der regionenspezifischen Spezialisierung der Gewebe. Doch neben der Gewebeidentität muss auch die Gewebegröße festgelegt werden. Dies kann einerseits dadurch geschehen, dass ein oder mehrere Wachstumsfaktoren nur in einem begrenzten Zeitraum exprimiert werden, oder dadurch, dass das Gewebe eine zeitliche Begrenzung der Responsivität auf Wachstumssignale aufweist. Letzteres ist z.B. dann der Fall, wenn Zellen aufhören, die Komponenten der Zellzyklusmaschinerie zu synthetisieren.

Weiterhin muss eine koordinierte Regulation von Zellzahl und Zellgröße gewährleistet sein (Conlon, I. *et al.*, 1999). Bei einem Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zellteilung

entstünden ansonsten entweder progressiv immer kleinere Zellen (bei erhöhter Zellteilungsaktivität bzw. verringertem Zellwachstum) oder immer größere Zellen (bei geringerer Zellteilungsaktivität bzw. verstärktem Zellwachstum).

Es konnte in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, in *Drosophila melanogaster* und auch in Säugetierzellen gezeigt werden, dass eine durch experimentelle Inaktivierung von Zellzyklusgenen hervorgerufene Inhibition der Zellteilung eine Vergrößerung der Zellen zur Folge haben kann (Johnston, G. C. *et al.*, 1977; Weigmann, K. *et al.*, 1997; Neufeld, T. P. *et al.*, 1998a; Fingar, D. C. *et al.*, 2002). Umgekehrt führte die Inaktivierung von Biosynthesegenen oder Nährstoffmangel jedoch zu einer gleichzeitigen Blockierung der Zellteilung, was für die Annahme spricht, dass für Zellzyklusprogression ein ausreichendes Zellwachstum Grundvoraussetzung ist. Diese Beobachtungen führten zur Postulation eines Zellwachstumskontrollpunktes für die Zellzyklusprogression (Johnston, G. C. *et al.*, 1977). Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass dieser Kontrollpunkt, falls er existiert, dynamisch und responsiv zu extrazellulären Bedingungen sein muss (Fingar, D. C. *et al.*, 2002). Es gibt noch sehr viele offene Fragen in Bezug auf die koordinierte Regulation von Zellgröße und Zellteilung in Säugetieren, jedoch deutet einiges darauf hin, dass der Insulin/PI3K Signaltransduktionsweg sowie die Kinasen Target of Rapamycin mTOR/FRAP und S6K1 diesbezüglich eine zentrale Stellung einnehmen (Conlon, I. *et al.*, 1999; Stocker, H. *et al.*, 2000; Fingar, D. C. *et al.*, 2002). Interessanterweise konvergieren der kanonische Wnt- und der Insulin-Signaltransduktionsweg auf der Ebene der Kinase GSK3β, die bei der Aktivierung beider Signalwege inaktiviert wird.

2.6 Die *Knock-In* Targetingstrategie als Werkzeug zur Funktionsanalyse von *Wnt1*

Um zwischen den verschiedenen möglichen Wirkungsweisen von *Wnt1* während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung unterscheiden zu können, wurde in dieser Arbeit die *Knock-In* Technik angewandt, durch die das Gen sowohl zeitlich als auch räumlich über die normale Expressionsdomäne hinaus exprimiert werden konnte. Diese Technik beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination von DNA in embryonalen Stammzellen, wodurch eine beliebige DNA-Sequenz zielgerichtet in einen spezifischen Genort eingebaut werden kann. In diesem Fall wurde die kodierende Sequenz des *Wnt1* Gens zusammen mit einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (*IRES*) und der kodierenden Sequenz des *lacZ* Gens unter die Kontrolle des endogenen *En1* Promotors gebracht, wodurch von nun an *Wnt1* und *lacZ* in der Expressionsdomäne von *En1* exprimiert wurden. *En1* wird während der Entwicklung des Mittel- und Hinterhirnes etwa ab dem gleichen Zeitpunkt exprimiert wie *Wnt1* (Rowitch, D. H. *et al.*, 1995), jedoch in einer wesentlich breiteren Expressionsdomäne, die sich über die sich entwickelnde Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg erstreckt (vgl. Abbildung 6 B, E). Durch den

gezielten Einbau der kodierenden Sequenz von *Wnt1* an den *En1* Genort wurde daher eine ektopische Expression von *Wnt1* im kaudalen Mittelhirn und rostralen Hinterhirn während der Embryonalentwicklung erreicht. In der normalen Expressionsdomäne von *Wnt1* wurde durch dieses Vorgehen eine Überexpression von *Wnt1* erzeugt. Da *En1* heterozygote Tiere (Genotyp $En1^{+/-}$) keinen Phänotyp zeigen (Wurst, W. *et al.*, 1994), kann davon ausgegangen werden, dass durch das Ersetzen eines der *En1* Allele durch die kodierende Sequenz von *Wnt1* (Genotyp $En1^{+/Wnt1}$) nur die Effekte des verstärkt exprimierten *Wnt1* und nicht die Effekte des gleichzeitigen Verlustes einer Kopie des *En1*-Gens untersucht werden können.

Dieses Tiermodell eignet sich deshalb sehr gut um die Funktionsweise von *Wnt1* zu ergründen, weil je nach Funktionsmechanismus von *Wnt1* unterschiedliche Phänotypen zu erwarten sind. Im Falle einer primären Musterbildungsfunktion sollte die Aktivität des MHO und nachfolgend die Position der Mittel-/Hinterhirngrenze entsprechend der neuen Expressionsgrenzen von *Wnt1* verschoben sein. Falls *Wnt1* lediglich als permissiver Faktor für die Aufrechterhaltung des MHO während der Entwicklung des Mittel-/Hinterhirnareals erforderlich ist, sollte keine ausgeprägte morphologische Veränderung auftreten. Schließlich könnte die verstärkte Expression von *Wnt1*, sofern ihm eine Proliferationsfunktion zukommt, zu einem lokal verstärkten Wachstum, unter Umständen bis hin zu einer Exencephalie oder Tumorbildung, führen. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Wnt1* eine Kombination unterschiedlicher Funktionen gleichzeitig ausübt.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Mausmutante

Durch *Knockout*-Experimente wurde bereits gezeigt, dass das sezernierte Glykoprotein *Wnt1* für die normale Entwicklung der Mittel-/Hinterhirnregion (MHR) von essentieller Bedeutung ist (McMahon, A. P. *et al.*, 1990; Thomas, K. R. *et al.*, 1990). Jedoch ist es nicht möglich, aus diesen Experimenten die genaue Funktionsweise von *Wnt1* während der Embryonalentwicklung abzuleiten. So könnte die Reduktion oder das völlige Fehlen der dorsalen Mittel-/Hinterhirnstrukturen in den *Wnt1*-Mutanten einerseits durch eine Musterbildungsfunktion von *Wnt1* erklärt werden - in diesem Falle partizipierte *Wnt1* in direkter Weise an der Funktion des Mittel-/Hinterhirn-Organisators (MHO). Andererseits könnte *Wnt1* aber auch für die Aufrechterhaltung des MHO notwendig sein und somit indirekt zum Erhalt der Region beitragen. Als weitere Möglichkeit kommt in Betracht, dass *Wnt1* ein Überlebensfaktor für Zellen in der MHR sein könnte, ohne den es zu verstärktem Zelltod und als Konsequenz daraus zu einem Verlust des Mittel-/Hinterhirngewebes kommen könnte. Schließlich könnte Wnt1 als Proliferationsfaktor das Wachstum der MHR regulieren. Das Ausschalten von *Wnt1* während der Embryonalentwicklung führte in diesem Fall aufgrund fehlender Proliferation zu einem Verlust der gesamten Region.

Um die genaue Funktion von *Wnt1* während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine alternative Methodik angewandt, die sogenannte *Knock-In*-Technik, bei der das Gen nicht inaktiviert, sondern im Gegenteil überaktiviert wurde. Durch den gezielten Einbau der *Wnt1*-cDNA an die Position des ersten Exons des *Engrailed-1* Gens wurde eine transgene Maus hergestellt, die *Wnt1* während der kritischen Phase der Mittel-/Hinterhirnentwicklung in einer verbreiterten Region über die Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg exprimiert. Dies hat zur Folge, dass *Wnt1* im hinteren Mittelhirnbereich überexprimiert und im vorderen Hinterhirnbereich ektopisch exprimiert wird. Da die Expression des künstlich eingefügten *Wnt1*-Allels durch den *En1*-Promoter reguliert wird, wird in dieser transgenen Maus Wnt1 auch, anders als im Wildtyp, in der späteren Entwicklung und in adulten Tieren synthetisiert, und zwar in all den Zellen, in denen auch das *En1* Gen aktiv ist. Dadurch konnten an der Mausmutante auch die Auswirkungen einer Fehlaktivierung des *Wnt1*-Signaltransduktionsweges im adulten Nervensystem studiert werden. Zusätzlich zu *Wnt1* wurden auch die interne Ribosomen-Eintrittsstelle des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV-*IRES*) sowie die kodierende Sequenz des *lacZ* Gens unter die Kontrolle des *En1*-Promotors gebracht. Die *IRES*-Sequenz ermöglicht es den Ribosomen, an die mRNA zu binden und die Translation zu initiieren, ohne einen Scan ausgehend vom 5'-

Ende der mRNA durchzuführen. So konnte die Expression des Transgens anhand der Aktivität der bakteriellen β-Galaktosidase überprüft werden. Dies wurde deshalb für sinnvoll erachtet, da zu diesem Zeitpunkt kein für immunhistochemische Experimente geeigneter Antikörper gegen Wnt1 erhältlich war.

3.1.1 Klonierung des Targetingvektors

Die Klonierungsschritte zur Konstruktion des Targetingvektors sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Zunächst wurde die Maus-*Wnt1* cDNA isoliert. Dazu wurde das Plasmid *pBS-KS(+)Wnt1* (eine freundliche Gabe von Dr. M. Wassef) mit dem Enzym *SalI* geschnitten. Das Insert mit einer Größe von 1879 bp wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Gelextraktion aufgereinigt. Die Einzelstrangüberhänge an den Enden des DNA-Fragmentes wurden anschließend durch die Klenowreaktion aufgefüllt. Der *IRES-lacZ* Vektor (eine freundliche Gabe von Dr. A. Mallamaci) wurde durch Restriktionsverdau mit *BamHI* linearisiert. Die dabei entstandenen Einzelstrangüberhänge wurden ebenfalls aufgefüllt.

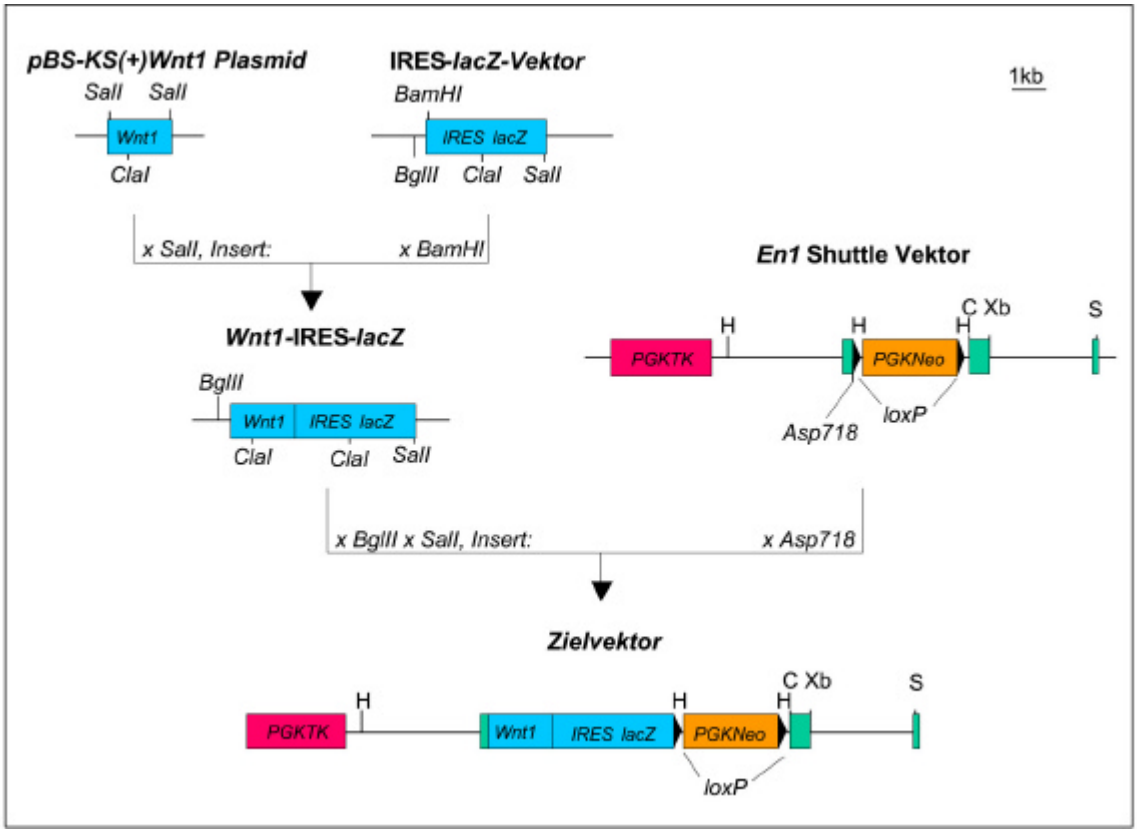

Abbildung 2: Klonierungsstrategie des Zielvektors. Alle Klonierungen erfolgten nach Auffüllen der Einzelstrangüberhänge, wodurch die jeweiligen Restriktionsschnittstellen zerstört wurden. *IRES*, Interne Ribosomeneintrittsstelle; *PGKNeo*, Neomycinresistenzgen mit *PGK*-Promotor; *PGKTK*, Thymidinkinasegen mit *PGK*-Promotor; *loxP*, Rekombinationsschnittstellen für die Cre-Rekombinase; x, Restriktionsverdau. Exonbereiche des *En1*-Gens sind in grüner Farbe dargestellt. Restriktionsschnittstellen: C, *ClaI*; H, *HindIII*; S, *SacI*; Xb, *XbaI*.

Danach wurden das *Wnt1* cDNA-Fragment und der linearisierte Vektor in einer Ligationsreaktion miteinander verbunden. Kompetente Bakterien des Stammes DH5α wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Von Ampicillin-resistenten Klonen wurden Mini-DNA-Präparationen angefertigt. Die Orientierung des Inserts wurde durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *ClaI* überprüft. Ein 2,8 kb Fragment entsprach einer Ligation in der gewünschten, ein 2,2 kb Fragment in der nicht gewünschten Orientierung. Von einem Klon, der das *Wnt1* cDNA-Insert in der gewünschten Orientierung enthielt, wurde eine Maxi-DNA-Präparation angefertigt. Das Plasmid wurde mit den Enzymen *BglII*, *SalI* und *ScaI* geschnitten, wodurch das 5,57 kb große *Wnt1-IRES-lacZ*-Insert isoliert werden konnte. Dieses DNA-Fragment konnte nun in den *En1-3'* Shuttle-Vektor kloniert werden. Dieser Vektor enthielt die für die homologe Rekombination mit dem *En1*-Genort verwendeten DNA-Sequenzen, die aus dem 4.2 kb großen *En1 XbaI*/*ApaI* Promotorfragment als 5'-Homologie-Arm sowie dem 4 kb großen *En1 ClaI*/*SacI* Fragment als 3'-Homologie-Arm bestanden (Hanks, M. *et al.*, 1995, Abbildung 2). Als Positiv-Selektionsmarker enthielt der Vektor ein Hybridgen bestehend aus der kodierenden Sequenz des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens und dem *Phosphoglycerat-Kinase I* Promotor (*PGKNeo*). Es wurde beobachtet, dass die Insertion einer *Neo*-Kassette in einen Genort die Expression benachbarter Gene beeinflussen kann (Olson, E. N. *et al.*, 1996; Pham, C. T. *et al.*, 1996; Floss, T. *et al.*, 1996; Broccoli, V. *et al.*, 1999). Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde die *Neo*-Kassette mit zwei *loxP*-Rekombinationsschnittstellen flankiert. Die *loxP* Schnittstellen bestehen aus zwei 13 bp langen invertiert wiederholten Sequenzen (*inverted repeats*) sowie einer 8 bp langen asymmetrischen Platzhaltersequenz und dienen als Bindestelle für die Cre-Rekombinase. Die Cre-Rekombinase ist ein 38 kDa Protein des Bakteriophagen P1, das eine sequenzspezifische intramolekulare oder intermolekulare Rekombination zwischen zwei *loxP*-Stellen ermöglicht (Sauer, B., 1993). Durch Einkreuzen einer Mauslinie, die das *Cre*-Rekombinasegen in Keimzellen exprimiert, kann daher die *Neo*-Kassette herausgeschnitten werden (Schwenk, F. *et al.*, 1995). Der Shuttle-Vektor enthielt außerdem eine Kassette aus dem *PGK*-Promotor und der kodierenden Sequenz des *Thymidinkinase*-Gens, die der Negativ-Selektion diente (*PKGTK*, s. Abbildung 2).

Für die Klonierung des *Wnt1-IRES-lacZ*-Inserts in den *En1-3'* Shuttle-Vektor wurde der Vektor mit *Asp718* linearisiert. Die Einzelstrangenden sowohl des Inserts als auch des Vektors wurden wiederum durch die Klenowreaktion aufgefüllt. Das Insert wurde durch eine Ligationsreaktion in den Shuttlevektor kloniert. Kompetente Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und Klone, die das *Wnt1-IRES-lacZ* Insert in der richtigen Orientierung enthielten, wurden durch Mini-DNA-Präparationen gefolgt von analytischen Restriktionsverdauen (Daten

nicht gezeigt) identifiziert. Von einem Klon, der das gewünschte Konstrukt enthielt, wurde eine Maxi-DNA-Präparation angefertigt. Die Linearisierung des Plasmids für die Elektroporation erfolgte mit dem Enzym *SalI*.

3.1.2 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Das homologe Rekombinationsereignis ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Das wildtypische *En1* Gen enthält zwei Exons und ein Intron. Nach der Integration des Zielvektors durch homologe Rekombination wird die Expression der *Wnt1-IRES-lacZ*-Kassette durch den *En1* Promotor reguliert, wohingegen von dem rekombinierten Genort keine *En1* mRNA mehr erzeugt wird.

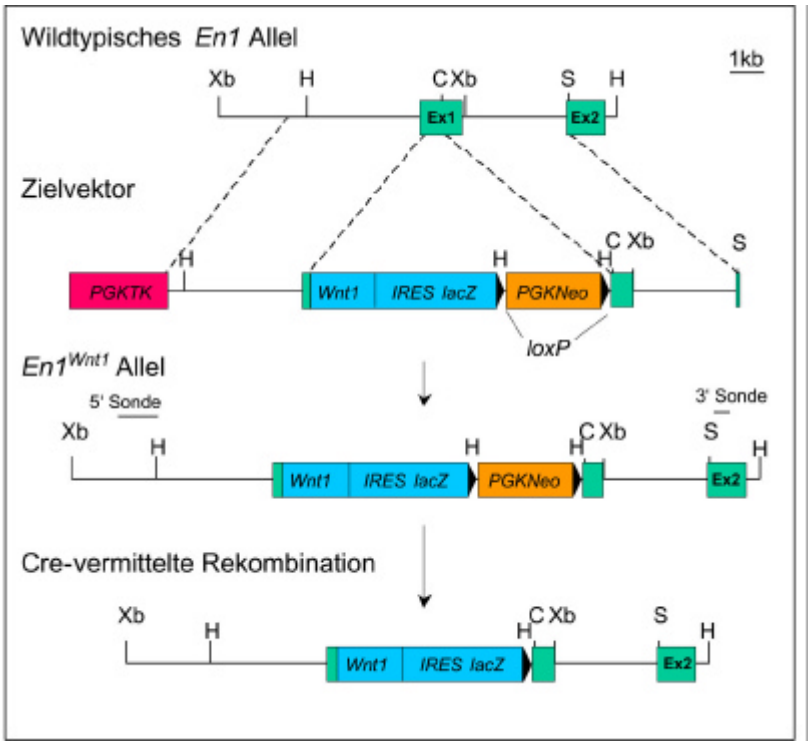

Abbildung 3: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Zielvektors mit dem genomischen *Engrailed-1* Locus. 5'-Arm und 3'-Arm sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Nach homologer Rekombination wird die Expression von *Wnt1* und *lacZ* durch den *Engrailed-1* Promotor reguliert. Die von zwei *loxP*-Sequenzen (schwarze Dreiecke) flankierte *PGKNeo*-Kassette kann durch Cre-Rekombinase-Behandlung entfernt werden. Die für die Southern-Blot Analyse verwendeten 5'- und 3'-Sonden sind durch schwarze Striche dargestellt. Ex, Exon; *IRES*, Interne Ribosomeneintrittsstelle; *PGKNeo*, Neomycinresistenzgen mit *PGK*-Promotor; *PGKTK*, Thymidinkinasegen mit *PGK*-Promotor. Restriktionsschnittstellen: C, *ClaI*; H, *HindIII*; S, *SacI*; Xb, *XbaI*.

Das linearisierte Konstrukt wurde in embryonale Stammzellen der Linie R1, die aus der Sublinie (129/Sv x 129/SvJ)F1 stammten, elektroporiert. Nach der Positiv-Selektion mit G418

und der Negativ-Selektion mit Gangcyclovir wurde zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zell Klone zunächst eine Southernblotanalyse mit einer 3'-externen Sonde durchgeführt. Dazu wurde die aus den ES-Zellen isolierte genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten. Als Sonde wurde das radioaktiv markierte etwa 850 bp große *EcoRI – SalI* Fragment des Plasmids ESEN-1 verwendet (Abbildung 4 A). Klone, die neben der Wildtyp-Bande (9 kb) auch noch die rekombinante Bande (5 kb) aufwiesen, wurden zusätzlich mit der 5'-Sonde getestet. Hierfür wurde das etwa 1,2 kb große *SacI* Fragment aus dem Plasmid SC-1 isoliert und radioaktiv markiert; die genomische DNA der ES-Zellen wurde für den Southernblot mit *XbaI* geschnitten (Broccoli, V. *et al.*, 1999). Insgesamt wurden 600 ES-Zellklone analysiert, von denen zwei die einer homologen Rekombination entsprechenden Bandenmuster aufwiesen. Zusätzlich zur Southernblotanalyse wurde für die Genotypisierung eine PCR-Analyse mit einem *lacZ*-spezifischen Oligonukleotidpaar durchgeführt. Das amplifizierte *lacZ* Fragment hat eine Größe von 631 Basenpaaren (Abbildung 4 B).

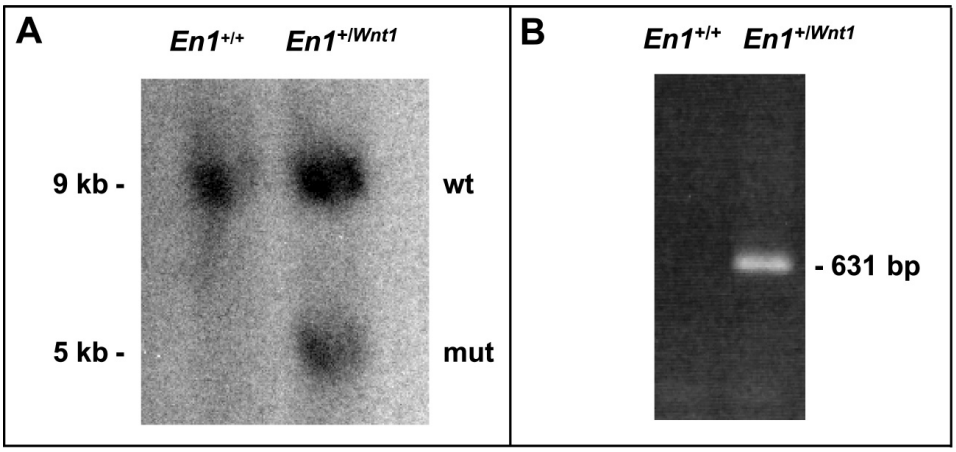

Abbildung 4: Southernblotanalyse unter Verwendung der 3'-Sonde (A) und *lacZ*-PCR (B) von einem wildtypischen ($En1^{+/+}$) und einem homolog rekombinierten ($En1^{+/Wnt1}$) ES-Zell Klon. Nähere Beschreibung im Text.

3.1.3 Etablierung der transgenen Mauslinie

Homolog rekombinierte ES-Zellen wurden in Blastozysten von C57BL/6N Spenderweibchen injiziert. Die so behandelten Blastozysten wurden durch einen Embryotransfer in die Uteri scheinschwangerer CD1–Ammentiere eingebracht. Anhand der Fellfarbe der auf diese Weise erzeugten Nachkommen konnte abgeschätzt werden, zu welchem Anteil die rekombinanten ES-Zellen zu den Chimären beigetragen haben. Sechs Chimären, deren Fellfarbe überwiegend (>90%) Agouti war, wurden mit Mäusen des Stammes C57BL/6N verpaart um Nachkommen der ersten Filialgeneration (F1) zu erhalten. Diese wurden durch Southernblotanalyse und *lacZ* PCR auf Keimbahntransmission der Mutation hin getestet. Es wurden fünf Nachkommen der

Filialgeneration eins (F1) identifiziert, die die Mutation (*En1*$^{+/Wnt1}$) trugen. Die *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse erwiesen sich als gesund und lebensfähig, und es konnte eine stabile Mauslinie etabliert werden. Dazu wurden die transgenen Mäuse durch Verpaarung mit C57BL/6N-Mäusen weiter zurückgekreuzt.

Die Erstanalyse ergab, dass *En1*$^{+/Wnt1}$-Mäuse kleiner waren als ihre Artgenossen und ein reduziertes Gewicht aufwiesen (Abbildung 5). Außerdem hatten die transgenen Tiere sporadische epileptische Anfälle. Auffällig war weiterhin ein ungewöhnliches Verhalten, wenn die Mäuse am Schwanz hochgehalten wurden. Normale C57BL/6N-Mäuse bewegen und winden sich sehr stark in dieser Situation, während *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse sich kaum bewegten und ihre Vorderpfoten gebetsartig zusammenhielten (Daten nicht gezeigt).

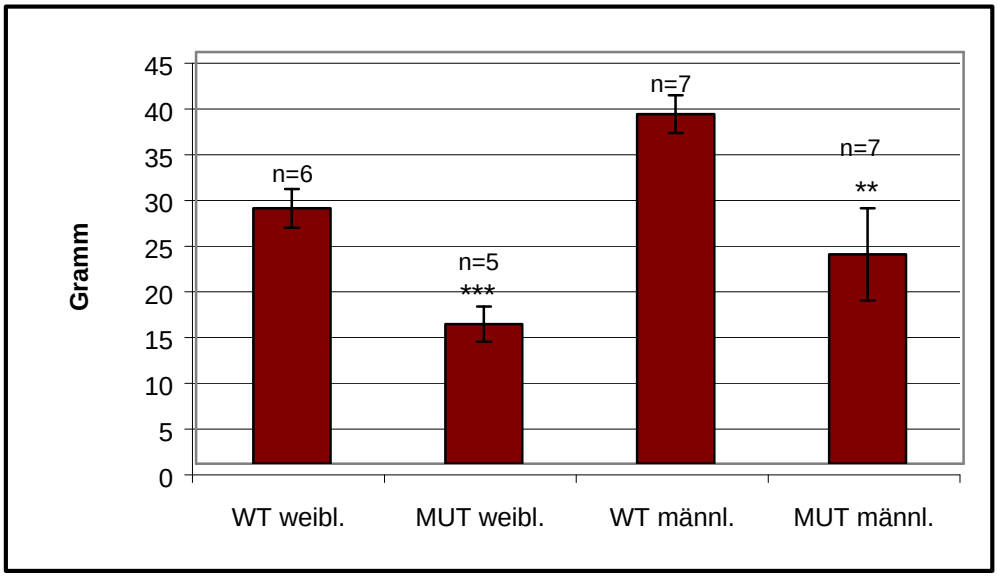

Abbildung 5: Gewichtsvergleich von 3 Monate alten *En1*$^{+/+}$ (WT) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (MUT) Mäusen. Für dieses Experiment wurden die Körpergewichte von 6 wildtypischen und 5 transgenen Weibchen sowie von jeweils 7 wildtypischen und transgenen Männchen im Alter von 12 Wochen bestimmt. Der t-Test ergab für beide Geschlechter einen signifikanten Gewichtsunterschied.

3.2 Untersuchung der Funktionsfähigkeit des Transgens

Zunächst wurde die Funktionsfähigkeit des *Knock-In* Allels überprüft. Der eindeutigste Beweis für das Vorhandensein des ektopisch exprimierten Wnt1-Proteins wäre der immunhistochemische Nachweis des Faktors. Da zum Zeitpunkt der Analyse jedoch kein anti-Wnt1-Antikörper verfügbar war, wurden andere Strategien angewandt. Erstens wurden *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryonen und an Gewebeschnitten durchgeführt um ektopische *Wnt1*-Transkripte nachzuweisen. Zweitens wurde die enzymatische Aktivität der β-Galaktosidase, deren cDNA zusätzlich zur *Wnt1*-cDNA unter die Kontrolle des endogenen *En1*-Promoters gebracht worden war, nachgewiesen. Drittens wurde die ektopische Aktivierung der kanonischen Wnt-Signaltransduktionskaskade anhand der intrazellulären Translokation von β-catenin studiert. β-catenin ist ein Protein, das bei Abwesenheit von Wnt-Signalen in phosphorylierter Form existiert und dadurch dem Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau zugänglich ist. Durch Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges wird β-catenin jedoch stabilisiert und kann in den Zellkern translozieren, wo es als Koaktivator für Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie dient.

3.2.1 Nachweis des zusätzlichen *Wnt1* Transkriptes in der *En1* Expressionsdomäne

Als Nachweis der ektopischen Expression von *Wnt1* während der Entwicklung und in adulten Tieren wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Als Sonde dienten Digoxigenin-markierte *antisense*-Transkripte von *Wnt1* cDNA-Fragmenten. Abbildung 6 A und D zeigen die Expression des *Wnt1*-Gens in einem 9.5 Tage alten ganzen $En1^{+/+}$ Embryo. Zu diesem Zeitpunkt wird das Gen in einem engen Ring am kaudalen Ende des Mittelhirns (rote Pfeile), in der ventralen mesencephalen Flexur sowie in der dorsalen Mittellinie des Vorder- und Mittelhirns und des Rückenmarks exprimiert. Im Vergleich dazu wird *En1* zu diesem Zeitpunkt in einem breiten Ring über die Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg exprimiert (Abbildung 6 B, E). Weitere Expressions-domänen von *En1* sind die sich entwickelnden Somiten und die Extremitätenanlagen (Abbildung 6 B, E).

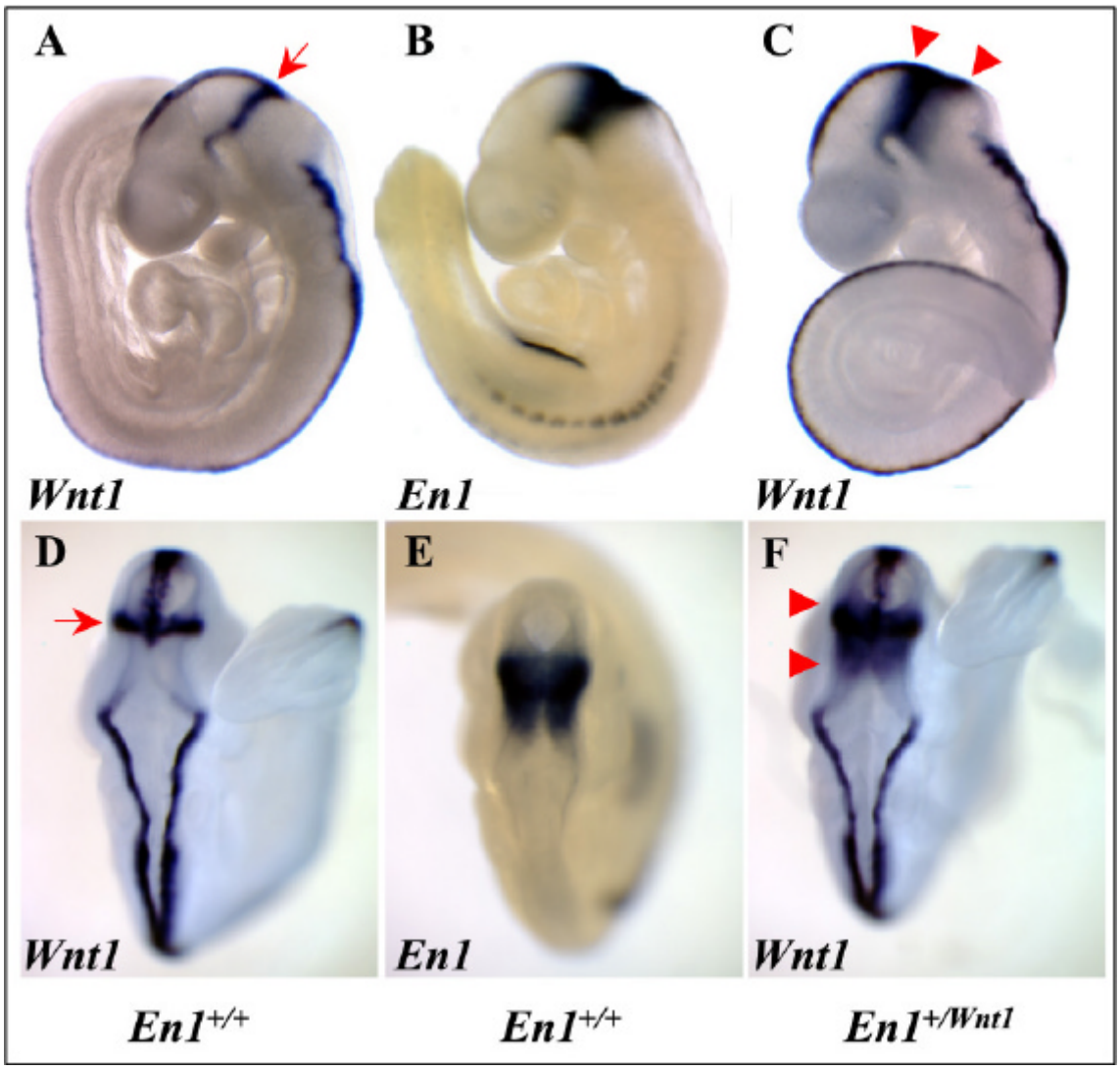

Abbildung 6: *In situ* Hybridisierung an ganzen, 9.5 Tage alten Embryonen mit einer *Wnt1-antisense* Sonde. A, B, D, E $En1^{+/+}$ Embryonen; C, F $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen. A, B, C seitliche Ansicht, D, E, F dorsale Ansicht. Die roten Pfeile bzw. Pfeilköpfe kennzeichnen die *Wnt1* Expressionsdomäne.

In $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen ist zu diesem Zeitpunkt eine deutliche, der Expression von *En1* entsprechende Verbreiterung der *Wnt1* Expressionsdomäne zu erkennen (rote Pfeilköpfe in Abbildung 6 C, F). Durch die Methode der *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen ließ sich die ektopische Expression in den Somiten und den Anlagen der Gliedmaßen, vermutlich auf Grund zu schwacher Expression, nicht sichtbar machen. Durch radioaktive *in situ* Hybridisierung an Schnitten konnte die ektopische Expression jedoch auch in diesen *En1* Expressionsdomänen nachgewiesen werden (s. Abbildung 7).

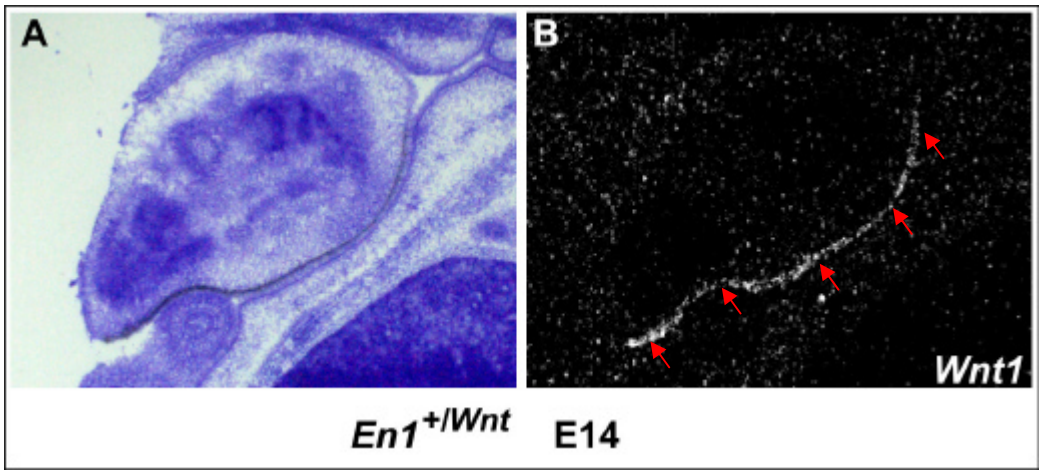

Abbildung 7: Nachweis der ektopischen Expression von *Wnt1* in den Extremitätenanlagen *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen mittels radioaktiver *in situ* Hybridisierung. Abgebildet ist eine Hellfeld-(A) und eine Dunkelfeld-(B) Detailaufnahme eines mit Kresylviolett gegengefärbten koronalen Schnittes einer Extremität eines 14 Tage alten *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryos. Zur Detektion des *Wnt1* Transkriptes wurde eine radioaktiv markierte *Wnt1 antisense* Sonde verwendet. Die roten Pfeile deuten auf die *Wnt1*-Expressionsdomäne.

In 16 Tage alten *En1*$^{+/+}$ Embryonen wurde *Wnt1*-Expression nur noch in einem dünnen Streifen entlang der Rautenlippe (*rhombic lip*) detektiert. Die Analyse mehrerer konsekutiver Schnitte ergab eine Expressionsdomäne, die sich aus der inferioren germinalen Trigone (GT), die der oberen Rautenlippe entspricht, sowie einem Teilbereich der unteren Rautenlippe, dem posterioren präcerebellären Neuroepithelium, zusammensetzt (Abbildung 8 A, B). In *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen wurde zu dem gleichen Zeitpunkt eine starke ektopische *Wnt1* Expression im Bereich der germinativen Zone des 4. Ventrikels detektiert (Abbildung 8 C, D). In adulten *En1*$^{+/+}$ Tieren konnte keine Expression in der MHR festgestellt werden, während *Wnt1* in *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren auch zu diesem Zeitpunkt in der *En1* Expressionsdomäne exprimiert wurde (Abbildung 9 A-L). Die Hybridisierung der *En1 antisense* Sonde erzeugte in der *En1* Expressionsdomäne auf *En1*$^{+/Wnt1}$ Gehirnschnitten deutlich stärkere Signale als auf *En1*$^{+/+}$ Gehirnschnitten (Abbildung 9 B, C, E, F). Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *En1* durch die ektopische Expression von *Wnt1* verstärkt wird.

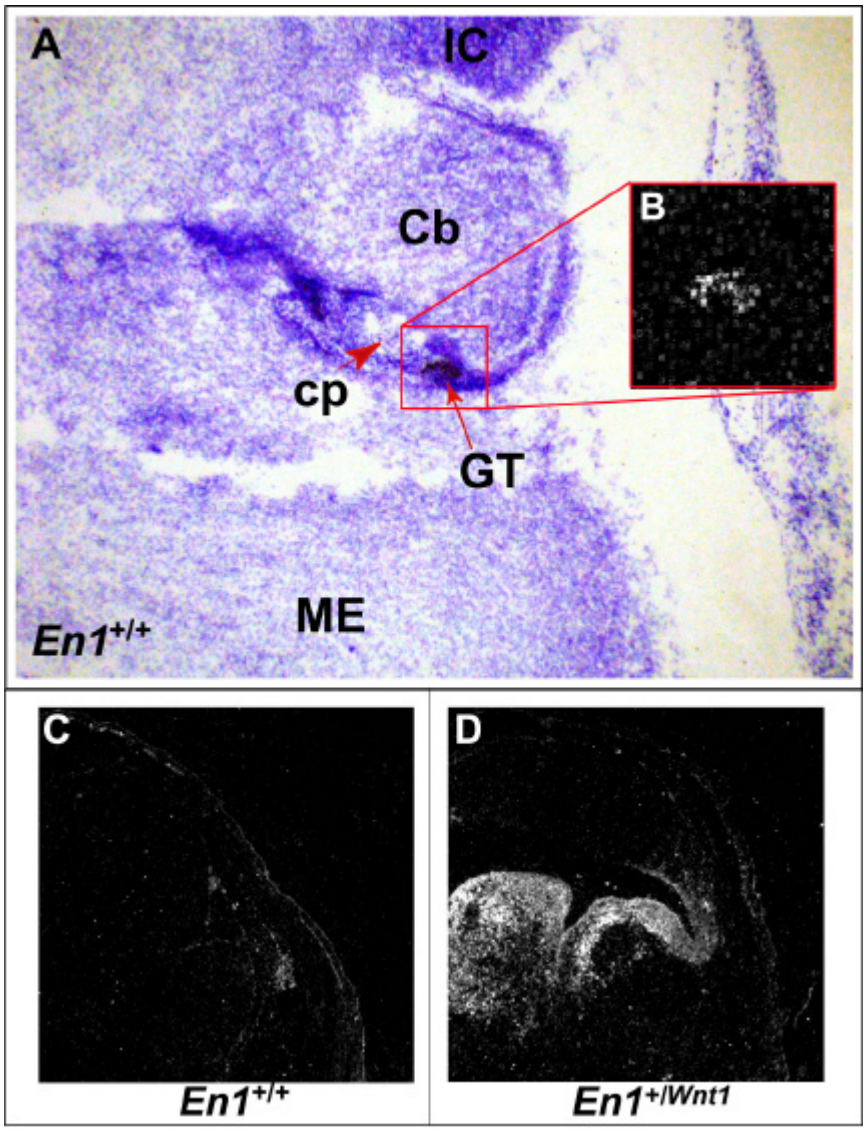

Abbildung 8: *Wnt1* Expression in 16 Tage alten Mausembryonen. A zeigt eine Kresylviolettfärbung an einem Sagittalschnitt eines 16 Tage alten $En1^{+/+}$ Embryos. In der Hellfeld-Übersichtsaufnahme ist die dorsale MHR zu erkennen. Bei B handelt es sich um eine Dunkelfeld-Detailaufnahme der mit einer Wnt1-*antisense* Sonde durchgeführten *in situ* Hybridisierung an dem gleichen Schnitt. Die halbmondförmige Expression in der inneren germinalen Trigore, die der oberen Rautenlippe entspricht, ist deutlich zu erkennen. C, D *in situ* Hybridisierungen an koronalen Schnitten von E16 Embryonen mit einer *Wnt1 antisense* Sonde. GT, germinale Trigore. IC, inferior colliculus. Cb, Cerebellum. cp, Choroid Plexus. ME, Medulla.

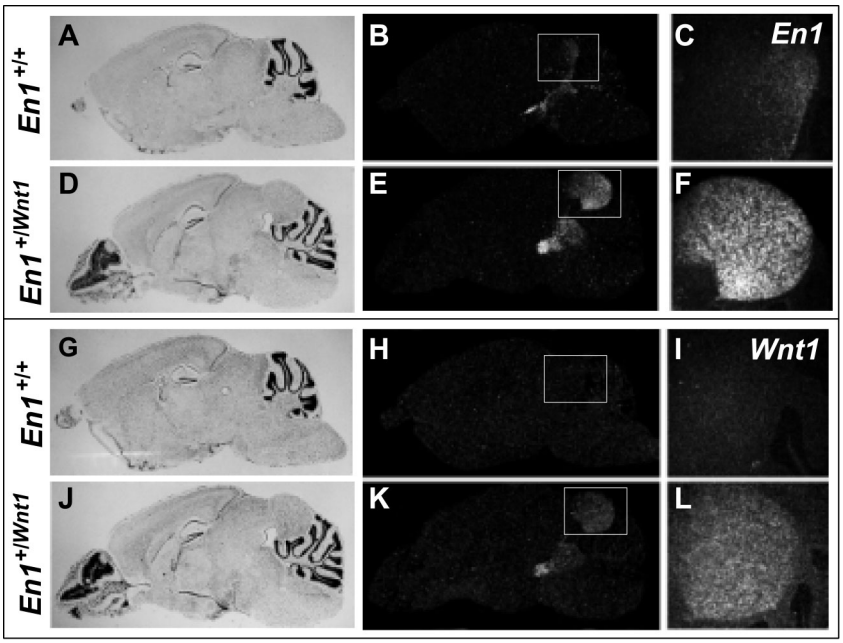

Abbildung 9: *In situ* Hybridisierungen an sagittalen Schnitten von adulten Hirnen unter Verwendung von *En1 antisense* (A-F) und *Wnt1 antisense* (G-L) Sonden. Man beachte die stärkeren Signale bei dem $En1^{+/Wnt1}$ Präparat im Vergleich zu dem $En1^{+/+}$ Präparat bei der Hybridisierung mit *En1 antisense* Sonde (vgl. B, C mit E, F). A, D, G, J Hellfeldaufnahmen; B, E, H, K Dunkelfeld Übersichtsaufnahmen; C, F, I, L Detailaufnahmen des IC.

3.2.2 Nachweis der b-Galaktosidaseaktivität in $En1^{+/Wnt1}$ Mäusen

Als weitere Nachweismethode für die Funktionsfähigkeit des Transgens wurden β-Galaktosidasefärbungen an $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen durchgeführt. Da die Expression dieses Enzyms in den transgenen Tieren von den gleichen regulatorischen Elementen kontrolliert wird wie die Expression der zusätzlichen *Wnt1*-Kopie, konnte von der enzymatischen Aktivität der β-Galaktosidase auch auf die ektopische Expression von *Wnt1* zurückgeschlossen werden. In 9.5, 10.5 und 12.5 Tage alten $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen sowie in Gehirnen 14.5 und 16 Tage alter $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen konnte im Bereich der Mittel-/Hinterhirnregion eine deutliche Farbreaktion beobachtet werden (Abbildung 10 A). Auch die Methode der β-Galaktosidase-färbung war nicht sensitiv genug, um die Expression in den Somiten oder den Extremitäten sichtbar zu machen.

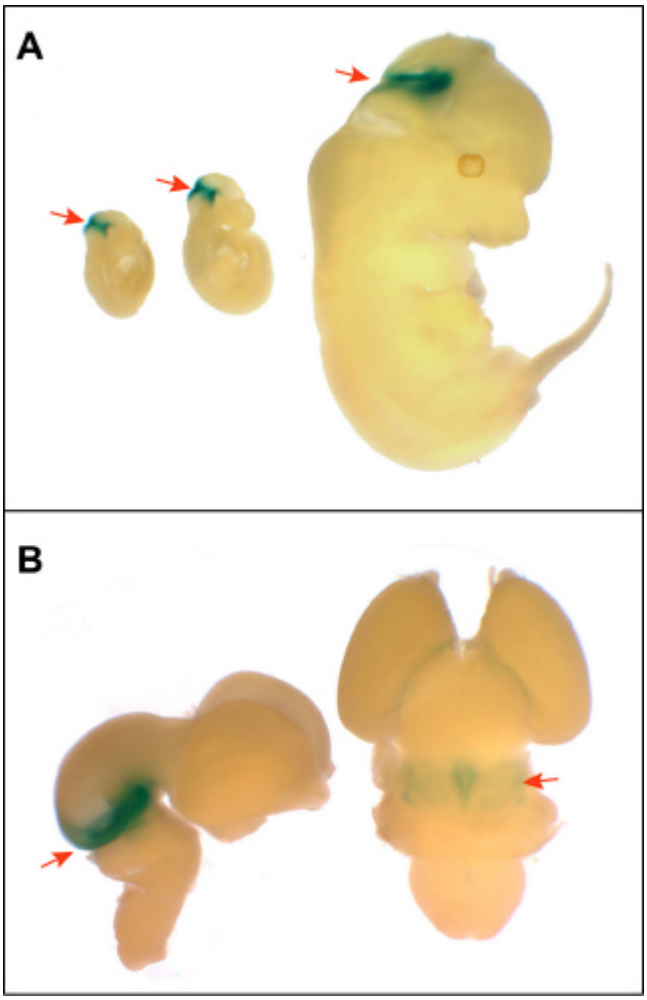

Abbildung 10: β-Galaktosidasefärbung an ganzen *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen (A) und Gehirnen (B). A 9.5, 10.5 und 12.5 Tage alte Embryonen (v.l.n.r.). An den Mittel-/Hinterhirnregionen sind deutliche Blaufärbungen zu erkennen (Pfeile). Die Expressionsdomäne der β-Galaktosidase reicht sowohl rostral als auch kaudal über die Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg und entspricht in diesem Bereich der *En1* Expressions-domäne. B links, Lateralansicht des Gehirns eines 14.5 Tage alten Embryos. Rechts, Dorsalansicht des Gehirns eines 16 Tage alten Embryos. Der dorsale Bereich des Mittelhirnes wurde aufpräpariert um den Blick auf die ventrale Expressionsdomäne zu ermöglichen. β-Galaktosidaseaktivität war auch hier nachweisbar (Pfeile).

3.2.3 Nachweis der ektopischen Aktivierung der kanonischen Wnt Signaltransduktionskaskade

Ein deutlicher Hinweis für die Aktivität des ektopisch exprimierten Wnt1 Proteins ist der Nachweis der ektopischen Aktivierung einer Wnt-Signaltransduktionskaskade. In der vorliegenden Arbeit wurden der kanonische und der Ca^{2+}-Signaltransduktionsweg untersucht.

Die am besten geeignete Nachweismethode der ektopischen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges ist die immunhistochemische Analyse der intrazellulären Lokalisation des β-catenin Proteins. In Abwesenheit von Wnt1 bewirkt die GSK3-β vermittelte Phosphorylierung von β-catenin dessen Degradation. Bei Anwesenheit von Wnt1 ist GSK3-β inaktiv. Die unphosphorylierte Form von β-catenin ist stabil und akkumuliert im Zellkern, wo

sie als transkriptioneller Kofaktor von TCF / LEF die Genexpression reguliert. (Behrens, J. *et al.*, 1996; Huber, O. *et al.*, 1996; Aberle, H. *et al.*, 1997). Färbungen mit dem ß-catenin Antikörper an adulten IC Schnitten ergaben, dass ß-catenin in der *En1*$^{+/Wnt1}$ Maus im Zellkern von Neuronen akkumuliert, während Neurone im Wildtyp keine nukleäre Lokalisation dieses Proteins aufwiesen (Abbildung 11 A, B). Es konnten keine Gliazellen gefunden werden, in denen ß-catenin ektopisch im Zellkern akkumulierte.

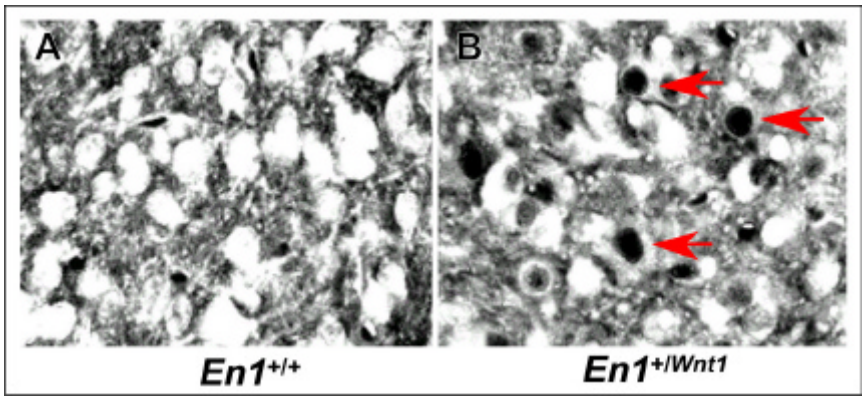

Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung an Mittelhirnschnitten adulter *En1*$^{+/+}$ (A) und *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse (B) unter Verwendung eines anti-β-catenin Antikörpers. Die dargestellten Ausschnitte repräsentieren Detailaufnahmen aus der Region der inferioren colliculi. Die Pfeile deuten auf solche Neurone, in denen β-catenin deutlich sichtbar in den Kernen lokalisiert ist.

Die Aktivierung des Ca^{2+}-Signaltransduktionsweges wurde unter Verwendung eines Antikörpers gegen die phosphorylierte Form der Proteinkinase C untersucht (Medina, A. *et al.*, 2000). An sagittalen Schnitten adulter *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Gehirne konnte auf diese Weise jedoch keine ektopische Aktivierung des Ca^{2+}-Signaltransduktionsweges in der MHR von *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch *in situ* Hybridisierungen, β-Galaktosidase-färbungen und Nachweis der ektopischen Aktivierung des kanonischen Wnt Signaltrans-duktionsweges belegt werden konnte, dass die erzeugte Mauslinie funktionales Wnt1-Protein in gewünschter Weise ektopisch in der En1 Expressionsdomäne exprimiert.

3.3 Untersuchung der Musterbildung während der frühen Mittel- und Hinterhirnentwicklung

Als nächstes wurde untersucht, ob Wnt1 während der Entwicklung der MHR an der Positionierung und Aktivität des Mittel-/Hinterhirnorganisators beteiligt ist. Der MHO liefert während der Entwicklung des Nervensystems Positionsinformationen entlang der anterior-posterior Achse, die für die Ausbildung der Grenze zwischen Mittelhirn und Hinterhirn erforderlich sind. Gene, die spezifisch an der sich entwickelnden Mittel-/Hinterhirngrenze

exprimiert werden, sind möglicherweise an dieser Funktion des MHO beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass eine kaudale Überexpression von *Otx2* eine korrespondierende Verschiebung der Position der Mittel-/Hinterhirngrenze zur Folge hatte. Zudem kam es zu einer Vergrößerung der inferioren colliculi sowie zu gravierenden morphologischen Veränderungen des Kleinhirns, wie z.B. dem Fehlen der anterioren Vermis und einem veränderten Faltungsmuster der Kleinhirnhemisphären (Broccoli, V. *et al.*, 1999). Andererseits konnte eine nach rostral erweiterte *Gbx2*-Expressiondomäne die Mittel-/Hinterhirngrenze nach anterior verschieben (Millet, S. *et al.*, 1999). Die spezifische Expression von *Wnt1* an der sich entwickelnden Mittel-/Hinterhirngrenze und der teilweise oder völlige Verlust des Mittel- und Hinterhirns in *Wnt1 Knockout*-Mäusen legt die Vermutung nahe, dass auch *Wnt1* an der Funktion des MHO beteiligt sein könnte. Um zu prüfen, ob *Wnt1* die Musterbildung während der frühen Mittel- und Hinterhirnentwicklung beeinflußt, wurde die Expression von Marker-Genen für die Mittel- und Hinterhirnregion durch *in situ* Hybridisierungen an ganzen 9.5 Tage alten Embryonen untersucht. Keines der untersuchten Gene wurde in der gesamten Domäne, in der *Wnt1* überexprimiert wurde, ektopisch induziert (Abbildung 12). Subtile Veränderungen in den Expressionsdomänen einzelner Gene konnten jedoch beobachtet werden. So ist die Expressionsdomäne von *En1* in $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen im Bereich des ventralen Hinterhirns verbreitert (Abbildung 12 E, rote Pfeilspitzen). Dieses Ergebnis deutet auf einen aktivierenden oder aktivitätserhaltenden Effekt von *Wnt1* auf die *En1* Expression hin. Veränderungen der Genexpressionsdomänen von Otx2 und Gbx2 konnten durch Ganzkörper- *in situ* Hybridisierungen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12 A, B). Die Expression von *Fgf8* wird in Hühnern durch ektopische Expression von *Wnt1* induziert (Matsunaga, E. *et al.*, 2002). Die Veränderung der *Fgf8*-Expressionsdomäne in $En1^{+/Wnt1}$ Mausembryonen scheint jedoch so subtil zu sein, dass sie in Ganzkörper-Hybridisierungen von 9.5 Tage alten Embryonen kaum detektierbar ist (Abbildung 12 C). Die Expression von *Pax2* wird durch die ektopische Expression von *Wnt1* im ventralen Bereich leicht verstärkt (vgl. rote Pfeilspitzen in Abbildung 12 D).

Da jedoch weder *Otx2*, *Gbx2*, *Fgf8*, *Pax2* noch *En2* in der gesamten Domäne, in der *En1* überexprimiert wurde, induziert wurden, scheint die Expression dieser Faktoren nicht ausschließlich von W*nt1* reguliert zu werden. Die Kompetenz spezifischer Geweberegionen spielt dabei wohl eine bedeutende Rolle, und *Wnt1* ist nicht ausreichend, um die Kompetenz der gesamten Mittel-/Hinterhirnregion zu verändern. Die Veränderungen, die durch die ektopische Expression von *Wnt1* hervorgerufen werden, sind hingegen so subtil, dass dieser Faktor zwar eine Rolle bei der Feinabstimmung der Mittel-/Hinterhirn-Musterbildung und Spezifikation

spielen könnte, jedoch kaum maßgeblich an der Festlegung der Gewebeidentität der Mittel- und Hinterhirnregion beteiligt ist.

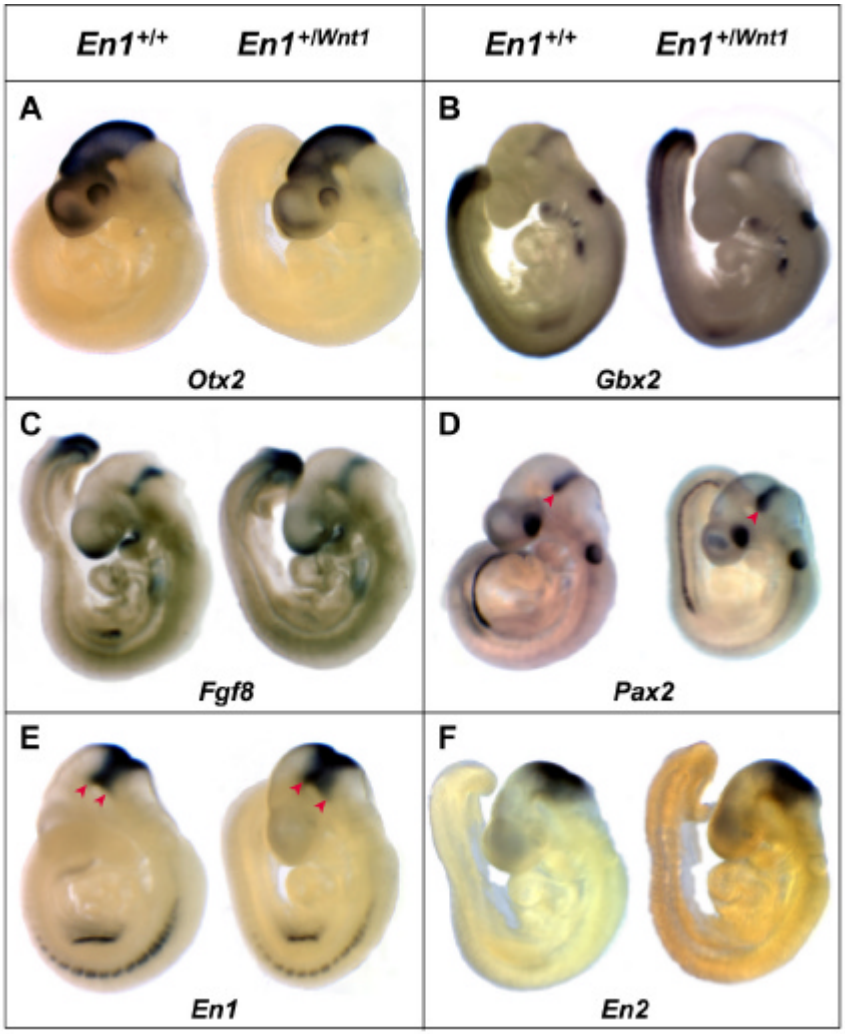

Abbildung 12: *In situ* Hybridisierungen an 9.5 Tage alten, ganzen Mausembryonen mit antisense-Sonden für Marker-Gene der Mittel-/Hinterhirnregion. In der linken Spalte sind jeweils wildtypische Embryonen abgebildet, in der rechten Spalte $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen. Es wurden *antisense*-Sonden für *Otx2* (A), *Gbx2* (B), *Fgf8* (C), *Pax2* (D), *En1* (E) und *En2* (F) verwendet. Die roten Pfeilspitzen in (E) deuten auf den ventralen Bereich der *En1* Expressionsdomäne, der in $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen verbreitert ist. In (D) deuten die Pfeilspitzen auf den ventralen Bereich der Pax2-Expressionsdomäne, der in $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen leicht vergrößert ist.

3.4 *LEF1*-Expression wird in $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen vorübergehend ektopisch induziert

Der kanonische Wnt1 Signaltransduktionsweg reguliert Genexpression über die zur HMG (*high mobility group*)-Familie DNA-bindender Proteine gehörenden Transkriptionsfaktoren TCF/LEF. Da die Genexpression von Komponenten eines Signaltransduktionsweges nicht selten durch die Aktivierung des Signaltransduktionsweges, an dem sie selbst teilhaben, beeinflußt wird, wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren TCF1, TCF3 und LEF1 in wildtypischen und *Wnt1* überexprimierenden Embryonen analysiert. *TCF1* und *TCF3* zeigten

kein verändertes Expressionsmuster (Daten nicht gezeigt). Die Expressionsdomäne von *LEF1* hingegen war in *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen erweitert. In 9.5 Tage alten Embryonen ist *LEF1* normalerweise in der Schwanzknospe und den Extremitätenanlagen stark exprimiert. Hinzu kommen schwächere Expressionsbereiche in den Somiten, den Kiemenbögen sowie dem Vorder- und Mittelhirn (Abbildung 13 A). In 11.5 Tage alten Embryonen wird *LEF1* im Vorder- und Mittelhirn stark exprimiert, und eine deutliche Expressionsgrenze zwischen Mittel- und Hinterhirn ist erkennbar (Abbildung 13 B). Weiterhin befindet sich im ventralen Hinterhirn von 11.5 Tage alten Embryonen eine Expressionsdomäne. In *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen wird *LEF1* zusätzlich im dorsalen Hinterhirn exprimiert (Abbildung 13 A, B; vgl. rote Pfeile). Dies entspricht dem *En1* Expressionsbereich, in dem *Wnt1* ektopisch im Hinterhirn exprimiert wird (vgl. Abbildung 6). In älteren Stadien (E14.5, E16.5) konnte die ektopische Expression von *LEF1* nicht mehr festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

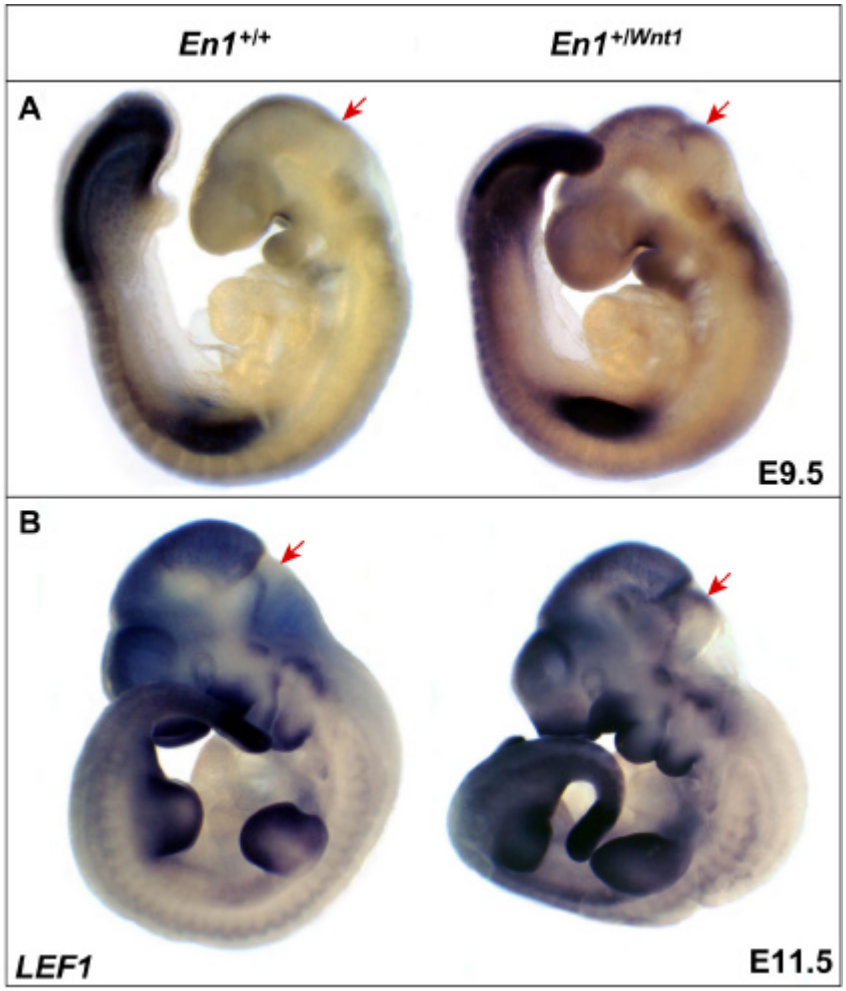

Abbildung 13: Das Expressionsmuster von *LEF1* in 9.5 (A) und 11.5 (B) Tage alten ganzen Embryonen. Auf der linken Seite sind *En1*$^{+/+}$ Embryonen abgebildet, auf der rechten Seite *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen. Die roten Pfeile deuten auf das sich entwickelnde dorsale Hinterhirn, in dem sich die *LEF1* Expressionsdomäne zwischen den beiden Genotypen vorübergehend unterscheidet.

3.5 Phänotypische Charakterisierung der adulten *En1*$^{+/Wnt1}$ Maus

Die frühe Musterbildung im Mittel- und Hinternhirnbereich scheint durch ektopische Expression von *Wnt1* nicht oder nur sehr subtil verändert zu werden, wie die Analyse der Expressionsdomänen von Markergenen gezeigt hat. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass *Wnt1* als permissiver Faktor vor allem in die Aufrechterhaltung der MHR involviert sein könnte. Dies ist nicht oder zumindest nicht ausschließlich der Fall, wie die nachfolgende Analyse des adulten Phänotyps der *En1*$^{+/Wnt1}$ Maus zeigt.

3.5.1 Die inferioren colliculi sind deutlich vergrößert

Die inferioren colliculi (IC) sind vor allem in die Verarbeitung akustischer Reize involviert. Dabei dienen die IC als Integrations- und Schaltstationen zu höheren auditorischen Gebieten. Veränderungen des akustischen Reizes wie z.B. Tonhöhe oder Lautstärke haben eine räumliche Entsprechung in den IC, die auch als Tonotopie bezeichnet wird. Anatomisch bestehen die IC aus drei morphologisch unterscheidbaren Kernen, dem zentralen Kern (*central nucleus*), dem äußeren Kern (*external nucleus*) und dem perizentralen Kern (*pericentral nucleus*).

Adulte Gehirne von *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen weisen eine sehr deutliche Vergrößerung der IC auf. Diese Vergrößerung ist eindrucksvoll an dorsalen Aufsichten auf adulte, ganze Gehirne zu erkennen (Abbildung 14). Durch stereologische Auswertung von Gehirnschnitten wurde ermittelt, dass die Volumina der IC von adulten *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen im Vergleich zu den IC von *En1*$^{+/+}$ Mäusen etwa 4,8fach erhöht sind (t-test: $p<0{,}001$).

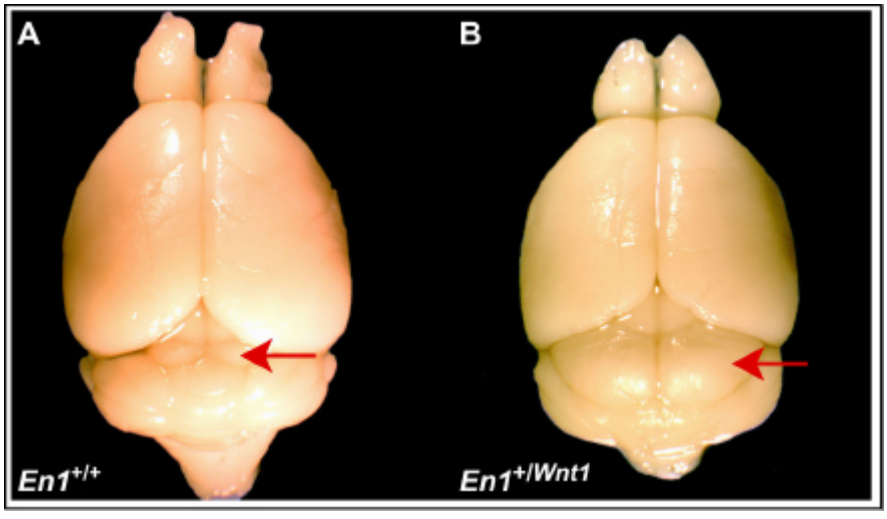

Abbildung 14: Die inferioren colliculi (IC) sind in transgenen Mäusen stark vergrößert. Dorsale Sicht auf adulte Mausgehirne von *En1*$^{+/+}$ (A) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (B) Mäusen. Die roten Pfeile weisen auf die Positionen der IC.

3.5.2 Histologische und immunhistochemische Untersuchung der Mittel- / Hinterhirnregion

Es wurde eine detaillierte morphologische Analyse der Veränderungen im adulten Gehirn durchgeführt, um den Funktionsmechanismus von Wnt1 während der Entwicklung, der zu diesem substantiellen Phänotyp geführt hat, besser zu verstehen. Dazu wurden Gehirne von adulten *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen präpariert, geschnitten und histologisch und immunhistochemisch untersucht.

3.5.3 Gallyas Myelinfärbungen

Durch Gallyas Myelinfärbungen an sagittalen Schnitten wird deutlich, dass andere Gehirnstrukturen mit Ausnahme der IC in ihrer Größe und Morphologie weitgehend unverändert geblieben sind (Abbildung 15 A, B). Lediglich die Cortices von *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen wirken im Vergleich zu denen von *En1*$^{+/+}$ Tieren etwas verkleinert (s. Abbildung 14, Abbildung 15). Dies ist vermutlich ein sekundärer Effekt aufgrund der starken Raumforderung der IC. Die superioren colliculi (SC), die den rostralen Anteil des dorsalen Mittelhirns darstellen, die ventralen Mittelhirnbereiche und das Cerebellum wirken unverändert. Weiterhin ist zu erkennen, dass es keine offensichtlichen Unterschiede in den Verläufen der Nervenfasern zwischen *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren gibt. Aus den Gallyas-Färbungen ergeben sich keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein neurofibrillärer *tangles* (Abbildung 15 A, B und Daten nicht gezeigt; Lewis, J. *et al.*, 2000).

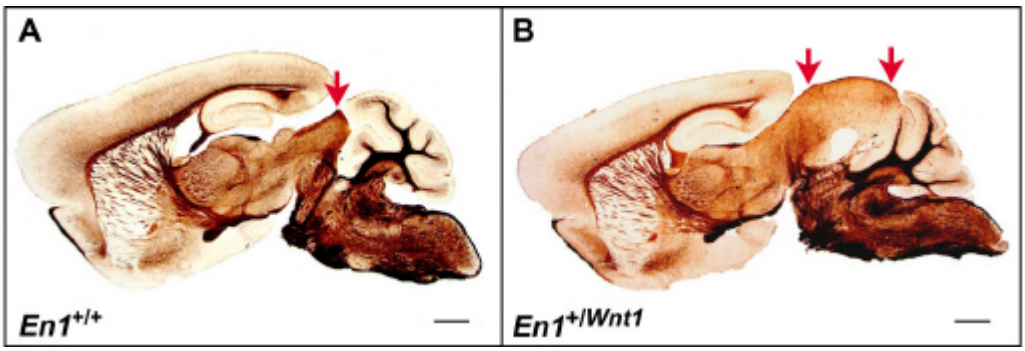

Abbildung 15: Gallyas Myelinfärbung an sagittalen Schnitten von adulten *En1*$^{+/+}$ (A) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (B) Mausgehirnen. Die roten Pfeile weisen in A auf die Position des IC; in B begrenzen die roten Pfeile die Ausdehnung des vergrößerten IC. Die Maßstäbe entsprechen 1 mm.

3.5.3.1 Färbungen für die Kalzium-bindenden Proteine Calbindin-D28k, Parvalbumin und Calretinin

Die Kalzium-bindenden Proteine Calbindin-D28k, Parvalbumin und Calretinin werden in unterschiedlichen Populationen von Neuronen in weiten Teilen des Nervensystems exprimiert und eignen sich wegen ihrer teilweise komplementären Expressionsmuster zur Analyse der zytoarchitektonischen Feinstrukturen von Gehirnarealen. Calbindin wird vor allem in Neuronen mit dünnen, nicht-myelinisierten Axonen exprimiert, während Parvalbumin hauptsächlich in Neuronen mit dicken, myelinisierten Axonen detektiert werden kann (Celio, M. R., 1990). Bei Parvalbumin-positiven Neuronen handelt es sich in erster Linie um inhibitorische GABAerge Interneurone (Solbach, S. *et al.*, 1991). Calretinin wird im zentralen Nervensystem am stärksten in Retinaneuronen und auditorischen Neuronen exprimiert (Rogers, J. H., 1987). Anti-Calbindinfärbungen machen Sublaminae der superioren colliculi (SC) sichtbar (Cork, R. J. *et al.*, 1998). Starke Immunreaktivität findet sich in Neuronen der *superficial gray layer* (SGL) und *optic layer* (OL), der *intermediate gray layer* (IGL) sowie des *periaqueductal gray* (PAG). Die Calbindinfärbungen an sagittalen Schnitten von $En1^{+/+}$ und $En1^{+/Wnt1}$ Gehirnen zeigen keine Veränderungen in den Schicht-Strukturen der SC (Abbildung 16 A, B). In den IC von $En1^{+/+}$ Mäusen befinden sich nur sehr wenige Calbindin-positive Neurone, von denen die meisten außerhalb des zentralen Kerns lokalisiert sind. Die IC von $En1^{+/Wnt1}$ Tieren sind zwar erheblich vergrößert; das Muster der Anti-Calbindinfärbung entspricht jedoch weitgehend dem des Wildtyps. Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch die Größenzunahme des IC die histologische Organisation des IC nicht beeinflußt wird.

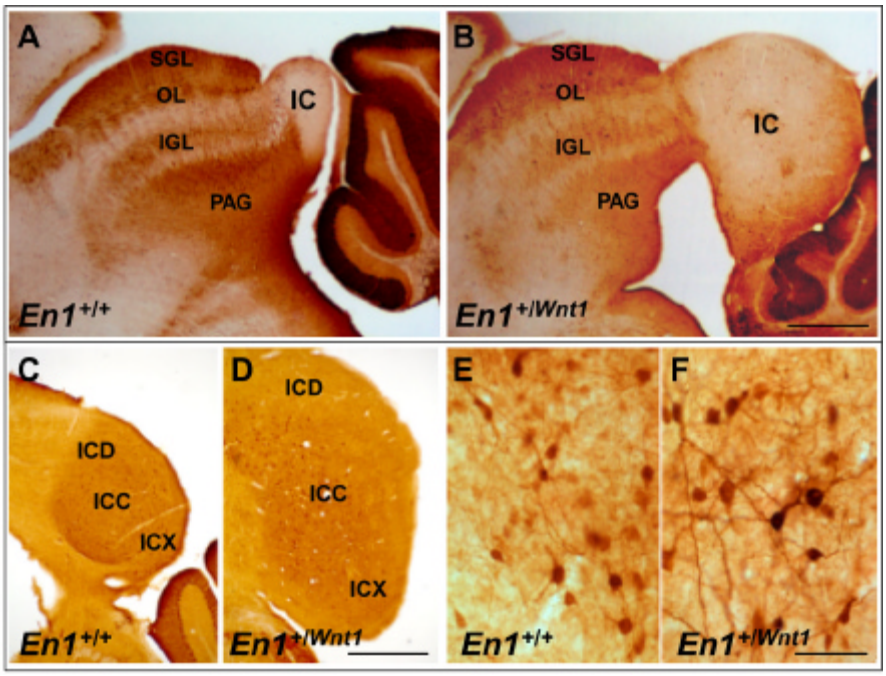

Abbildung 16: Feinstruktur der superioren colliculi (SC) und inferioren colliculi (IC) dargestellt durch Calbindin-D28k (A, B), Parvalbumin (C, D) und Calretinin (E, F) Antikörperfärbungen an sagittalen (A, B) und koronalen (C-F) Schnitten von drei Monate alten $En1^{+/+}$ und $En1^{+/Wnt1}$ Mäusen. Die Größe sowie die Schichtung und Feinstruktur der SC erscheint unverändert (vgl. A, B). Drei Schichten Calbindin-positiver Neurone lassen sich unterscheiden: Eine Schicht in der *superficial gray layer* (SGL) und der *optic layer* (OL) sowie je eine Bande in der *intermediate gray layer* (IGL) und dem *periaqueductal gray* (PAG). Der IC in (B) ist stark vergrößert, jedoch ist das Gesamt-Färbemuster und somit die histologische Organisation des $En1^{+/Wnt1}$ - IC vergleichbar mit dem des Wildtyps. Parvalbumin Immunreaktivität in den IC ist vor allem in den zentralen Kernen (ICC) von Wildtyp und Mutante zu finden (C, D). ICX, externer Kern; ICD, dorsaler Kern. Die Anti-Parvalbumin (C, D) und Anti-Calretininfärbungen (E, F) zeigen, dass die histologische und zelluläre Organisation des IC durch die zusätzliche *Wnt1* Expression nicht verändert wird. Die Maßstäbe entsprechen einer Länge von 1 mm (A-D) bzw. 100 µm (E, F).

Der zentrale Kern (ICC) des wildtypischen IC weist eine hohe Dichte an Parvalbumin exprimierenden Neuronen auf, während in dem externen Kern (ICX) und dem perizentralen oder dorsalen Kern (ICD) nur vereinzelte Parvalbumin-positive Neurone vorkommen (Coleman, J. R. *et al.*, 1992). Wie in Abbildung 16 C und D zu erkennen ist, ist die Verteilung Parvalbumin exprimierender Neurone in den vergrößerten IC der $En1^{+/Wnt1}$ Mäuse im Vergleich zu $En1^{+/+}$ Mäusen unverändert. Calretinin wird im Gegensatz zu Parvalbumin kaum in Neuronen des ICC exprimiert, während eine starke Calretinin-Immunreaktivität in den perizentralen Bereichen des IC zu finden ist (Daten nicht gezeigt; siehe auch Zettel, M. L. *et al.*, 1997).

Anti-Calretininfärbungen an koronalen Schnitten von adulten $En1^{+/+}$ und $En1^{+/Wnt1}$ Mäusen unterstützen die Annahme, dass neben der histologischen auch die zelluläre Organisation der IC im Wesentlichen gleich geblieben ist (Abbildung 16 E, F).

3.5.4 Größenzunahme der Neurone der inferioren colliculi

Adulte *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse weisen neben einer Vergrößerung der IC auch eine dramatische Zunahme der Zellgröße von Neuronen auf (Abbildung 17 A, B). Die größten dieser Neurone haben eine Ballon-artige Erscheinung.

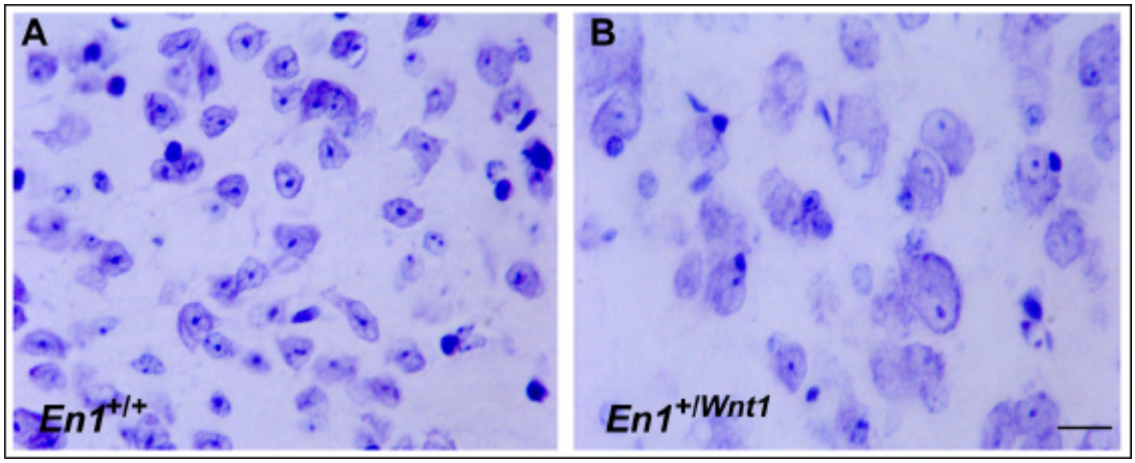

Abbildung 17: Größenzunahme der Neurone in den IC adulter *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse. Gezeigt sind Kresylviolettfärbungen an Schnitten von 12 Monate alten *En1*$^{+/+}$ (A) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (B) Mäusen. In diesem Alter sind die Volumina der Neurone in den IC transgener Tiere durchschnittlich 3,6fach vergrößert im Vergleich zu IC-Neuronen des Wildtyps (je n=6). Der Maßstab entspricht 25 µm.

3.5.4.1 Immunhistochemische Charakterisierung der vergrößerten Neurone

Um die vergrößerten Neurone zu charakterisieren, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen an Schnitten von zwölf Monate alten Mutanten und Kontrolltieren durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob die vergrößerten Zellen ausdifferenziert sind oder ob es sich um undifferenzierte Vorläuferzellen handelt.

Der monoklonale Antikörper TUJ1 ist immunreaktiv gegen Neuronen-spezifisches β-Tubulin (beta III). Beta III Tubulin ist ein früher Marker für neuronale Differenzierung (Memberg, S. P. *et al.*, 1995). Die Expression dieses Tubulins beginnt während oder unmittelbar nach der letzten Teilung einer sich differenzierenden neuronalen Vorläuferzelle und besteht im adulten ZNS fort (Lee, M. K. *et al.*, 1990). Die vergrößerten Zellen sind TUJ1 immunreaktiv (Abbildung 18 A).

Das Neurofilament-Protein (70kDa/200kDa) wird vor allem in differenzierten Neuronen exprimiert (Carden, M. J. *et al.*, 1987; Mungale, S. D. *et al.*, 1988). Die Fortsätze der vergrößerten Neurone sind Neurofilament-positiv (Abbildung 18 B). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei den vergrößerten Zellen um differenzierte Neurone handelt. Weiterhin stehen die vergrößerten Neurone über synaptische Kontakte mit anderen Neuronen in

Verbindung, wie durch die Antikörperfärbung gegen Synaptophysin, eines Membranproteins in synaptischen Vesikeln, gezeigt werden konnte (Abbildung 18 C; Knaus, P. *et al.*, 1986).

Die Intermediärfilamentproteine Nestin und Vimentin können aufgrund ihrer Expressionsmuster im zentralen Nervensystem als Marker für Differenzierungsstadien und Zelltypen verwendet werden. Die Expression von Nestin beginnt schon vor der Geburt und ist beschränkt auf verschiedene Vorläuferzellen neuroepithelialen Ursprungs (Dahlstrand, J. *et al.*, 1995). Vimentin ist ebenfalls ein Marker für Vorläuferzellen im zentralen Nervensystem, wird jedoch auch in differenzierten Astroglia exprimiert (Pixley, S. K. *et al.*, 1984; Ghosh, M., 2002). Weder Nestin noch Vimentin weisen an Gehirnschnitten von adulten $En1^{+/Wnt1}$ Tieren eine verstärkte Immunreaktivität auf (Abbildung 18 D, E). Dies deutet darauf hin, dass die ektopische Expression von *Wnt1* in der MHR nicht dazu führt, dass neuronale Vorläuferzellen an einer terminalen Differenzierung gehindert werden.

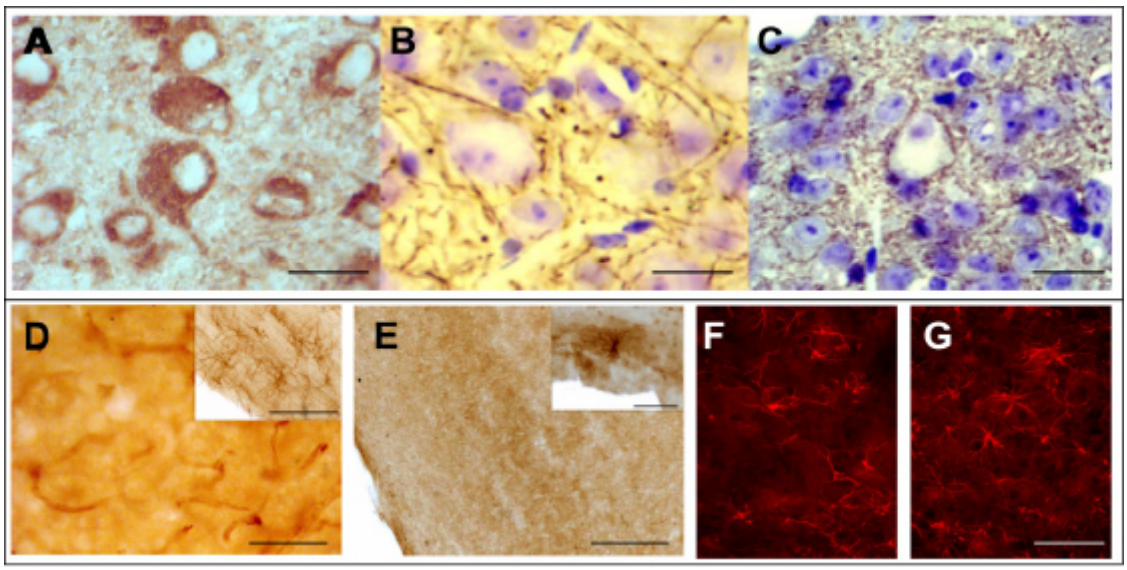

Abbildung 18: Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen in den inferioren colliculi von adulten $En1^{+/Wnt1}$ Tieren. A TUJ-Färbung. B Neurofilament-Färbung mit Kresylviolett-gegenfärbung. C Synaptophysin-Färbung mit Kresylviolettgegenfärbung. D Nestinfärbung. Die Blutgefäße sind immunreaktiv, jedoch konnten keine Nestin-positiven Neurone in den IC gefunden werden. Das eingefügte Bild zeigt immunreaktive Neurone im ventralen Myelencephalon von dem gleichen Schnitt als Positivkontrolle. E, Vimentinfärbung. Die Zellen in den IC der transgenen Tiere exprimieren kein Vimentin. Das eingefügte Bild zeigt eine Detailansicht einer immunreaktiven Zelle aus dem Bereich des 3. Ventrikels (gleiches Präparat). F, G Fluoreszenzaufnahmen von mit α-GFAP-Antikörpern und Texas-Red gekoppelten sekundären Antikörpern behandelten IC-Präparaten von adulten $En1^{+/+}$ (F) und $En1^{+/Wnt1}$ (G) Mäusen. Die Gliazellen in der Mutante zeigen eine leicht verstärkte Reaktivität gegen GFAP. Die Maßstäbe entsprechen 25 µm (A-C), 100 µm (D), 200 µm (E), 50 µm (E, kleines Bild sowie F und G).

GFAP wird vornehmlich in reifen Astrozyten synthetisiert und kann daher als Differenzierungs-marker von Gliazellen betrachtet werden (Eng, L. F. *et al.*, 2000). Nestin, Vimentin und GFAP

werden außerdem von Astrozyten nach einer Verletzung des Zentralnervensystems oder als Reaktion auf ein Trauma vermehrt exprimiert (Calvo, J. L. *et al.*, 1991; Clarke, S. R. *et al.*, 1994; Eng, L. F. *et al.*, 2000). Diese charakteristische Reaktion von Astrozyten wird auch als Astrogliose bezeichnet wird. Die etwas verstärkte GFAP Immunreaktivität in den Astrozyten von *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen (Abbildung 18 F, G) legt die Vermutung nahe, dass die Mutanten eine leicht Astrogliose haben. Diese könnte z.B. durch die sporadisch auftretenden epileptischen Anfälle verursacht werden.

3.5.4.2 Zeitverlauf der Größenzunahme der Neurone in den inferioren colliculi

Um die Entstehung der vergrößerten Neurone zu verstehen, wurden die Volumina der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten *post natum* bestimmt. In *En1*$^{+/+}$ Mäusen konnte keine Größenzunahme der IC Neurone beobachtet werden. Drei Monate alte *En1*$^{+/+}$ Mäuse hatten eine IC Neuronengröße von 978 µm^3 (± 69 S.E.M.); sechs Monate alte Tiere wiesen ein durchschnittliches IC Neuronenvolumen von 964 µm^3 (± 30 S.E.M.) auf und zwölf Monate alte Mäuse eines von 862 µm^3 (± 57 S.E.M.). Dagegen konnte eine graduelle Volumenzunahme in *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren gemessen werden. 28 Tage alte Mäuse wiesen qualitativ noch kein verändertes Volumen auf (Daten nicht gezeigt). In drei Monate alten *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen hatten die IC Neurone eine durchschnittliche Größe von 1632 µm^3 (± 32 S.E.M.). Das Volumen der Neurone nahm in sechs Monate alten Mäusen zu auf 1979 µm^3 (± 135 S.E.M.), und in zwölf Monate alten Tieren auf 3093 µm^3 (± 617 S.E.M.). Der Unterschied in der Neuronengröße war zu allen drei Zeitpunkten hochsignifikant. Die t-Tests ergaben bei drei Monate alten Tieren p=0,008, bei sechs Monate alten Tieren p=0,005 und bei 12 Monate alten Tieren 0,010 (s. Abbildung 19).
Die Größe der Gliazellen in den IC ist in *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen nicht verändert und beträgt im Mittel 118 µm^3 (± 4 S.E.M.) in zwölf Monate alten Kontrolltieren bzw. 119 µm^3 (± 10 S.E.M.) in zwölf Monate alten *En1*$^{+/Wnt1}$-Mäusen.

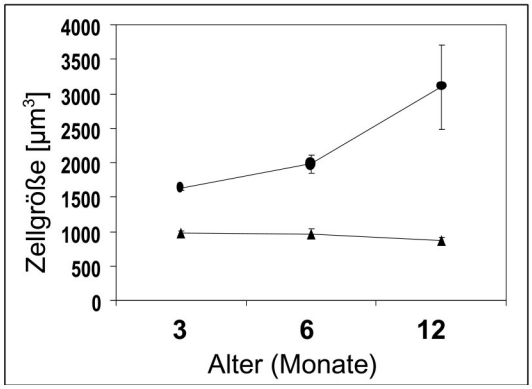

Abbildung 19: Volumenbestimmung der Neurone der inferioren colliculi (IC) von drei Monate, sechs Monate und zwölf Monate alten *En1*$^{+/+}$ (gefüllte Dreiecke) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (gefüllte Kreise) Mäusen. Für die Zellzählungen wurden Kresylviolett-Färbungen an sagittalen Schnitten verwendet.

3.5.4.3 Elektronenmikroskopische Detailaufnahme der Neurone

Um auszuschließen, dass die Vergrößerung der Neurone auf pathologische intrazelluläre Prozesse zurückzuführen ist, wurden elektronmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten dorsaler Mittelhirngewebe adulter *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse angefertigt. Mit Hilfe eines Transmissions-Elektronenmikroskops wurden die Zellen auf Vesikeleinschlüsse, Veränderungen in der Morphologie oder der Anzahl der Organellen und Zellkompartimente, Synapsenbildung sowie stärkere Veränderungen des Zytoskeletts überprüft. Es wurden keine Auffälligkeiten in den vergrößerten Neuronen festgestellt (Abbildung 20).

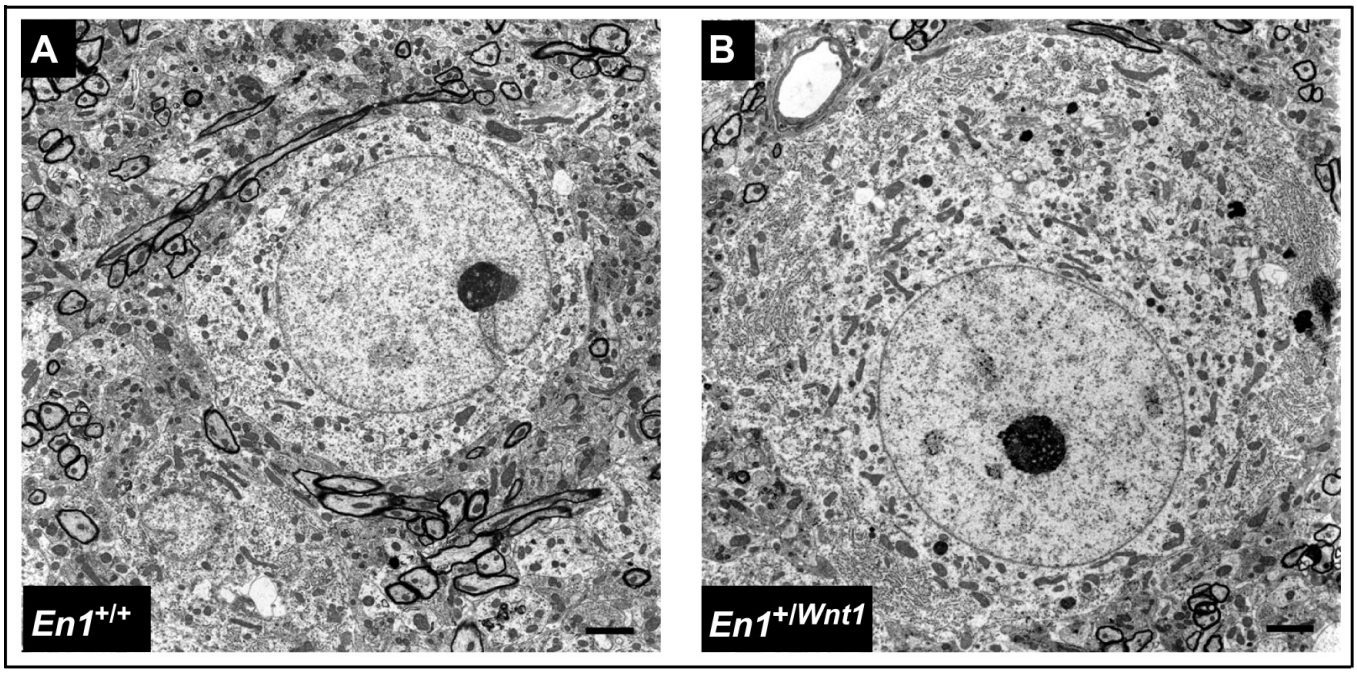

Abbildung 20: Repräsentative tranmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme von Neuronen aus den IC adulter *En1*$^{+/+}$ (A) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (B) Mäuse. Die Maßstäbe entsprechen 2 µm.

3.5.4.4 Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes von aus IC Gewebe isolierten Zellkernen

Zellgröße und DNA-Gehalt des Zellkerns sind häufig korreliert, wobei eine Erhöhung der Ploidie eine Vergrößerung der Zellen zur Folge hat (Szarski, H., 1976; Henery, C. C. *et al.*, 1992). Während normale somatische Zellen diploid (2n) sind, kann es unter bestimmten Bedingungen zu einer Erhöhung der Ploidie kommen, z.B. durch Entzündungen, erhöhten Stoffwechsel, Alterung usw. (Hanselmann, R. G. *et al.*, 2001). Tetraploidie (4n) ist nicht selten Anzeichen einer malignen Entwicklung eines Gewebes, und Tumorzellen enthalten häufig mehr als die gewöhnliche Anzahl von Chromosomen. Da *Wnt1* als Onkogen angesehen wird und missregulierte Wnt-Signaltransduktion bei der Entstehung von Tumoren, z.B. Brusttumoren, eine bedeutende Rolle spielt (Smalley, M. J. *et al.*, 1999), könnte die Vergrößerung der Neurone im IC von *Wnt1* überexprimierenden Mäusen zurückzuführen sein auf eine Vermehrung des DNA-Gehaltes der Zellkerne. Falls eine solche Beobachtung gemacht werden könnte, könnte dies auch auf eine maligne Entwicklung im IC hindeuten.

Um dies zu überprüfen, wurden Zellkerne aus den IC ein Jahr alter $En1^{+/Wnt1}$ und $En1^{+/+}$ Mäuse isoliert. Die DNA wurde mit Propidiumiodid angefärbt und eine durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehaltes durchgeführt (Abbildung 21). Dabei konnten keine Abweichungen vom normalen diploiden Chromosomensatz in $En1^{+/Wnt1}$ Tieren festgestellt werden.

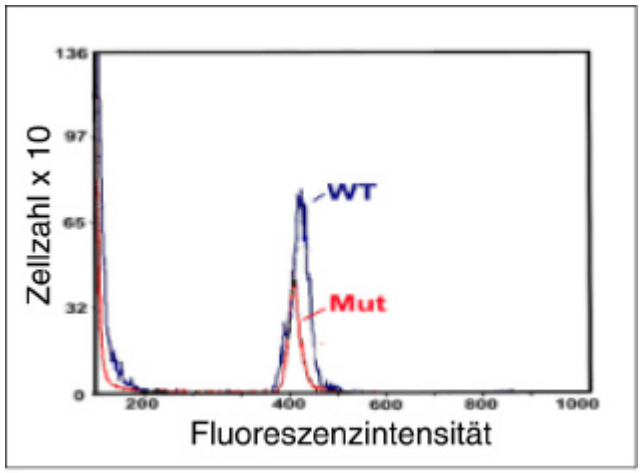

Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehaltes von Zellkernen, die aus den IC von ein Jahr alten $En1^{+/+}$ (WT, blau) und $En1^{+/Wnt1}$ (Mut, rot) Mäusen isoliert wurden. Die Zellkerne haben einen DNA-Gehalt von 2n.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Vergrößerung der Neurone im IC von *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren nicht mit pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht werde konnte. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Größenzunahme der Neurone auf eine physiologische Funktion des ektopisch exprimierten *Wnt1* zurückzuführen ist.

3.6 Untersuchungen zur Entstehung des *En1*$^{+/Wnt1}$ Phänotyps

In der bisherigen Arbeit wurde gezeigt, dass *Wnt1* während der Embryonalentwicklung die Position und Aktivität des MHO nicht beeinflußt, jedoch einen starken Einfluss auf die Größe des adulten IC sowie auf die neuronale Zellgröße innerhalb des IC hat. Als nächstes wurde die Entstehung des adulten Phänotyps untersucht. Die starke Vergrößerung des IC kann nicht einzig durch die Volumenzunahme der Neurone erklärt werden, da die Vergrößerung des IC schon zu einem Zeitpunkt beobachtet werden kann, an dem die Neurone noch eine normale Größe aufweisen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Vergrößerung des IC auf verstärkte Zellteilungsaktivität im dorsalen Mittelhirn zurückzuführen sein könnte.

3.6.1 Berechnung des BrdU Markierungsindex der germinativen Schicht von 16 Tage alten Embryonen

Die Zellteilungsaktivität im sich entwickelnden IC ist bei 16 Tage alten Embryonen sehr hoch. Aus diesem Grunde wurde dieser Zeitpunkt gewählt, um einen Vergleich zwischen der Zellteilungsaktivität in *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen durchzuführen. Dazu wurden schwangere Muttertiere am 16. Schwangerschaftstag kumulativ durch intraperitoneale Injektion mit einer BrdU-Lösung behandelt. Das Thymidinanalogon BrdU gelangte über den Kreislauf des Muttertieres in die Embryonen und konnte dort in die genomische DNA solcher Zellen eingebaut werden, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der S-Phase befanden. Von den Gehirnen der behandelten Tiere wurden koronale Schnitte angefertigt, die anschließend wie im Methodenteil beschrieben immunhistochemisch aufbereitet wurden. In *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen wurde eine deutlich erhöhte Proliferation festgestellt (Abbildung 22). Während die mittlere Proliferationsrate an der Basis des Mittelhirnvesikels bei Wildtypen bei 46% lag, waren in Mutanten 65% der Zellen BrdU positiv. Dieses Ergebnis beweist, dass die Größenzunahme des IC in *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren zum Teil auf einer lokal verstärkten Zellteilungsaktivität beruht.

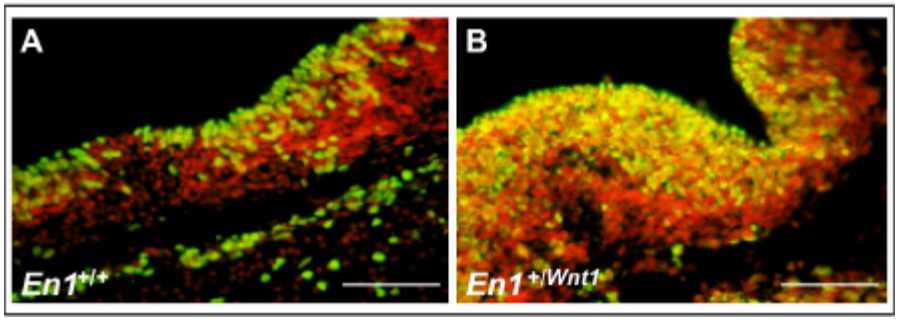

Abbildung 22: Aufnahmen von 4 µm dicken, koronalen Schnitten zeigen die Basis der Mittelhirnvesikel von 16 Tage alten *En1*$^{+/+}$ (A) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (B) Embryonen nach sechstündiger kumulativer BrdU-Inkorporation. Zellen, die sich während dieser Zeit in der S-Phase befanden, erscheinen grün. Die Gegenfärbung erfolgte mit Propidiumiodid (rot). Im Wildtyp haben etwa 46% der Zellen BrdU aufgenommen, während in der Mutante etwa 65% BrdU-positiv waren. Der Maßstab entspricht 100 µm.

3.6.2 Durchflusszytometrische Bestimmung Zellzyklusparameter von 16 Tage alten Embryonen

Für die verstärkte Proliferation in der sich entwickelnden Mittelhirnregion sind drei prinzipiell verschiedene Erklärungen denkbar. Erstens könnte *Wnt1* solche Zellen, die sich ohne entsprechendes ektopisches Signal nicht mehr teilten, sogenannte quieszente Zellen, wieder zu Zellteilungen anregen. In diesem Falle übernähme *Wnt1* die Funktion eines klassischen Mitogens. Zweitens könnte der Austritt der Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus verzögert werden, und drittens könnte *Wnt1* solche Zellen, die sich ohnehin in einem proliferativen Zustand befinden, zu beschleunigter Zellteilung anregen. In diesem Fall übernähme *Wnt1* die Funktion eines Proliferationsverstärkers, bzw. eines Wachstumsfaktors im engeren Sinne. Diese Hypothese ist sehr attraktiv, da sie gleichzeitig eine Erklärung für die Vergrößerung der Neurone in den IC adulter *En1*$^{+/Wnt1}$ Tiere lieferte.

Zellteilung und Zellwachstum sind bei Säugetieren eng gekoppelt, und das Erreichen einer kritische Zellmasse wird als Vorbedingung für eine Progression des Zellzyklus einer Zelle von G1 in die S-Phase angesehen (Conlon, I. *et al.*, 1999). Somit könnte ein beschleunigtes Zellwachstum zu schnellerem Erreichen der kritischen Masse führen und auf diese Weise die Zellzykluslänge verkürzen. Denkbar ist auch eine Kombination dieser drei Effekte. Um diese Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden zwei durchflusszytometrische Verfahren angewandt, durch die die Zellzyklusparameter bestimmt werden konnten. Zunächst wurde durch kumulative BrdU-Markierung unterschiedlicher Dauer von 16 Tage alten Embryonen ein Markierungsindex für Zellen aus der Mittelhirnregion erstellt. An einem Diagramm, in dem die Markierungsdauer gegen den Markierungsindex (das ist das Verhältnis der Zahl der markierten Zellen zu der Zahl aller untersuchten Zellen) bzw. den Prozentsatz der markierten Zellen aufgetragen wird, können verschiedene Zellzyklusparameter unmittelbar abgelesen werden

(Abbildung 23 A, vgl. Smith, C. M. *et al.*, 1998). Bei konstanter Proliferationsrate ergibt sich im Idealfall eine Sättigungskurve, die zunächst linear ansteigt und sich schließlich einem Maximalwert annähert. Der Markierungsindex L_{i0} zum Zeitpunkt t=0 repräsentiert den Anteil der Zellen, die sich, unter der Grundannahme einer konstanten Zellteilungsaktivität, während des Experiments zu jedem Zeitpunkt in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Der Sättigungswert GF (*Growth Fraction*) der Kurve gibt den Anteil mitotisch aktiver Zellen bezogen auf die gesamte untersuchte Zellpopulation wieder. Mit Hilfe der in Abbildung 23 dargestellten Formel kann aus dem Zeitpunkt, an dem die Kurve den Sättigungswert erreicht, sowie den an dem Diagramm abzulesenden Parametern GF und L_{i0}, die mittlere Zellzykluslänge T_C bestimmt werden.

Weiterhin kann durch die durchflusszytometrische Analyse der Anteil der Zellen, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befinden, bestimmt werden (Abbildung 23 B). Dabei wird Propidiumiodid (PI) als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. PI interkaliert wie auch Ethidiumbromid zwischen die DNA-Doppelstränge, so dass sich die Fluoreszenzintensität proportional zu dem DNA-Gehalt eines Zellkerns verhält. Postmitotische Zellen sowie Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, sind diploid, d.h. sie enthalten (bei Mäusen) 40 Chromosomen (vgl. Abbildung 21). Der DNA-Gehalt der Zellen – und somit auch deren PI-Fluoreszenzintensität – nimmt während der S-Phase (Synthese-Phase) langsam zu, und erreicht während der G2/M-Phase den Maximalwert. Zu diesem Zeitpunkt hat sich der ursprüngliche DNA-Gehalt der Zellen verdoppelt. Nach Beendigung der M-Phase (Mitose-Phase) haben sich die Zellen einmal geteilt, wodurch der DNA-Gehalt wieder auf den ursprünglichen Wert absinkt.

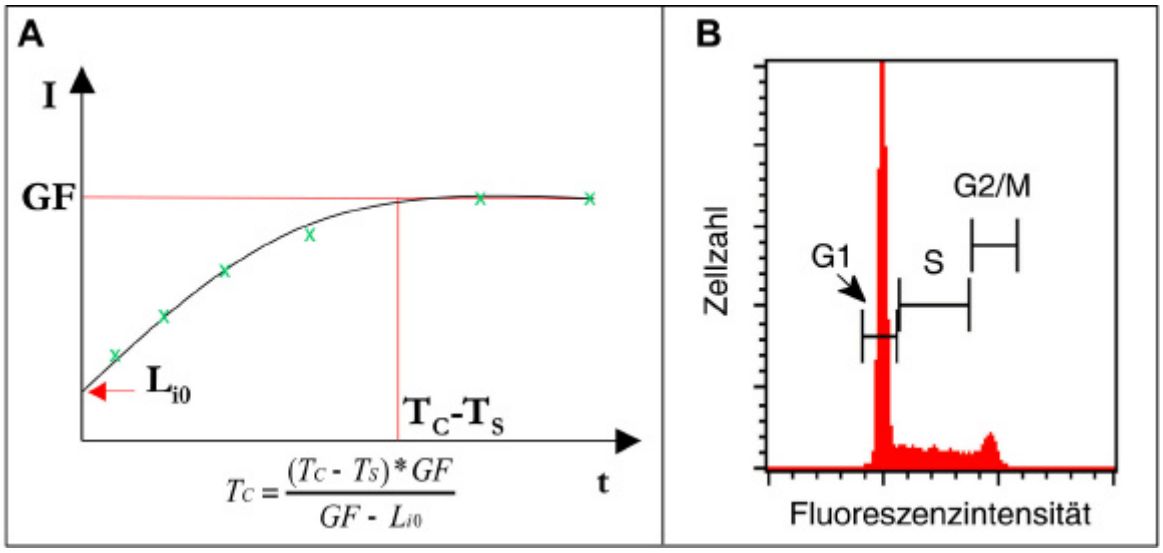

Abbildung 23: Zellzyklusparameter. A Darstellung der Zellzyklusparameter, die durch Auftragung des Markierungsindex (I) gegen die Markierungsdauer (t) ermittelt werden können. Aus dem Diagramm sind der Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamtheit aller

untersuchten Zellen (*growth fraction*, GF), der Anteil der Zellen, die sich zum Zeitpunkt null in der S-Phase befinden (L_{i0}), sowie der Wert der mittleren Zellzykluslänge (T_C) abzüglich der mittleren S-Phasenlänge (T_S) ablesbar. Die mittlere Zellzykluslänge lässt sich durch Einsetzen der aus dem Diagramm ermittelten Werte in die angegebene Formel feststellen. B Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse des DNA-Gehaltes von Zellkernen. Vor der Analyse werden die Zellkerne mit Propidiumiodid (PI) behandelt, dessen Fluoreszenzintensität sich proportional zu dem DNA-Gehalt der Zellkerne verhält. Durch Auftragung der PI-Fluoreszenzintensität gegen die Zahl der Zellkerne kann die relative Länge der einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt werden.

Für das Experiment wurden 12 trächtige Mäuse am 16. Tag der Schwangerschaft für 4, 8, 12, 16, 20 oder 30 h mit BrdU behandelt, wobei alle vier Stunden eine intraperitoneale Injektion mit der BrdU-Lösung erfolgte. Die letzte Injektion erfolgte unabhängig von der Gesamt-markierungsdauer 30 Min vor Ende der Dauermarkierung. Die Zellen des Mittelhirnvesikels der Embryonen wurden isoliert, mit fluoreszierendem Anti-BrdU Antikörper behandelt und in einem Durchflusszytometer analysiert. Zusätzlich wurde die Zahl der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Messung in der S-Phase befanden, durch Messung der PI-Fluoreszenz bestimmt. Die Messwerte wurden in Form von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardabweichungen gegen die Markierungsdauer aufgetragen (Abbildung 24). Aus den Daten wurde abgeschätzt, dass die maximale BrdU-Inkorporation sowohl in den *En1*$^{+/+}$ als auch in den *En1*$^{+/Wnt1}$ Proben nach 16 bis 20 Stunden erreicht wurde, so dass für die Regressionsgeraden die Messwerte bis einschließlich den 16 h Messungen verwendet wurden. Die Werte für GF wurden aus der Grafik bestimmt und betragen 7,8% (*En1*$^{+/+}$) und 18,0% (*En1*$^{+/Wnt1}$). Die Formeln für die Regressionsgeraden lauten:

$f(x) = 0{,}38 * x + 0{,}98$ (*En1*$^{+/+}$)
$f(x) = 0{,}92 * x + 2{,}82$ (*En1*$^{+/Wnt1}$)

Die Markierungsdauer zu dem Zeitpunkt, an dem der maximale Markierungsindex GF erreicht wurde, entspricht der Zellzykluslänge T_C abzüglich der S-Phasen-Länge T_S. Aus den Formeln für die Regressionsgeraden sowie den GF-Werten folgt (T_C-T_S) = 17,9 h (*En1*$^{+/+}$) und (T_C-T_S) = 16,5 h (*En1*$^{+/Wnt1}$). Schließlich kann die mittlere Zellzykluslänge berechnet werden:

(*En1*$^{+/+}$) $$T_C = \frac{(T_C - T_S) * GF}{GF - L_{i0}} = \frac{17{,}9h * 7{,}8\%}{7{,}8\% - 0{,}98\%} = 20{,}5h$$

(*En1*$^{+/Wnt1}$) $$T_C = \frac{(T_C - T_S) * GF}{GF - L_{i0}} = \frac{16{,}5h * 18{,}0\%}{18{,}0\% - 2{,}82\%} = 19{,}6h$$

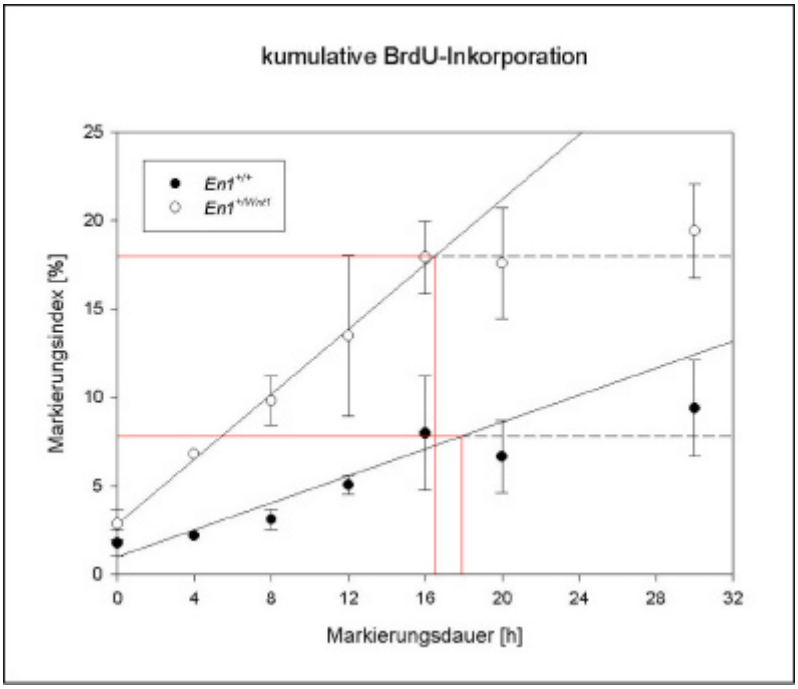

Abbildung 24: Diagramm zur Bestimmung der Zellzyklusparameter von Mittelhirnzellen 16 Tage alter *En1*$^{+/+}$ (gefüllte Kreise) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (nicht gefüllte Kreise) Embryonen. Nähere Angaben im Text.

Der Unterschied zwischen den ermittelten Zellzykluslängen beträgt 0,9 h. Diese Differenz in der Zellzykluslänge ist vermutlich zu gering, um als einzige Ursache für den beobachteten Phänotyp verantwortlich zu sein. Dynamische Veränderungen der Zellzykluslänge im Bereich der MHR während der Entwicklung können allerdings nicht ausgeschlossen werden, und kürzere Zellzykluslängen zu früheren Zeitpunkten als dem hier untersuchten könnten als Erklärung für den beobachteten Phänotyp ausreichen.

In Abbildung 25 sind die ermittelten relativen Anteile der Zellzyklusphasen an dem gesamten Zellzyklus für die Zellen, die aus den Mittelhirnvesikeln von 16 Tage alten Embryonen isoliert wurden, dargestellt. Es befinden sich 1,9% aller Zellen der Wildtypen in der S-Phase, während sich in Mutanten 3,0% der Zellen in der S-Phase befinden. Der Anteil der IC-Zellen, die sich bei E16 in der G2/M-Phase befinden, ist bei *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren gleich. Somit geht die Vergrößerung des Anteils der Zellen in der S-Phase auf Kosten des Anteils der Zellen, die sich in de G1- bzw. G0-Phase des Zellzyklus befinden. Dies deutet auf einen beschleunigten Übergang von der G1 in die S-Phase oder einen verringerten Anteil von Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, hin.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung der Zellzykluslänge an der verstärkten Proliferation in der Mittelhirnregion von *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen beteiligt ist. Möglicherweise, jedoch nicht zwingend, reicht dieser Effekt von Wnt1 als Erklärung für die verstärkte Proliferation aus. Eine mögliche mitogene Aktivität von Wnt1 in bezug auf neurale

Vorläuferzellen kann nicht ausgeschlossen werden, und weitere Studien sind notwendig, um diese Frage zu klären.

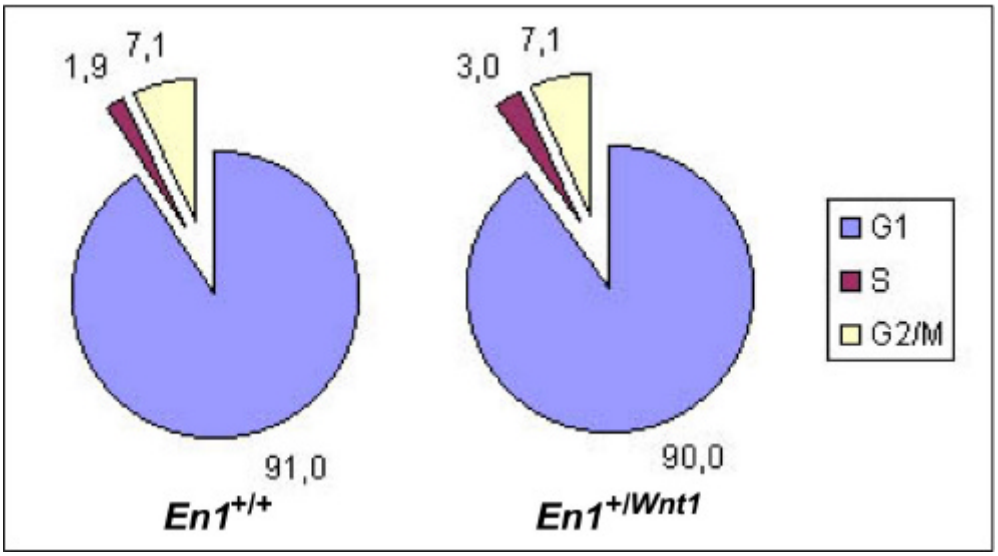

Abbildung 25: Zellzyklusanalyse der Zellen aus den IC von 16 Tage alten *En1*$^{+/+}$ (linkes Kreisdiagramm) und *En1*$^{+/Wnt1}$ (rechtes Kreisdiagramm) Embryonen. Für die Analyse wurden 32 wildtypische und 34 transgene Embryos verwendet. Die Zahlen in den Diagrammen sind Prozentangaben und beziehen sich auf die Anteile der Zellzyklusphasen G0/G1 (blau), S (weinrot) und G2/M (gelb) bezogen auf den gesamten Zellzyklus.

3.6.3 Die proliferationsfördernde Wirkung von *Wnt1* betrifft neurale Vorläuferzellen

Um zu ermitteln, ob gliale oder neuronale Vorläuferzellen durch unterschiedlich starke Proliferation auf das ektopische *Wnt1* Signal reagieren, wurde die Zahl der Neurone bzw. Gliazellen innerhalb der inferioren colliculi je eines wildtypischen und eines transgenen adulten Tieres anhand von kresylviolettgefärbten Gewebeschnitten pro Flächeneinheit bestimmt. Dabei konnten qualitativ keine wesentlichen Unterschiede in der Zahl der Neurone bzw. Gliazellen pro Flächeneinheit festgestellt werden (Abbildung 26). Dieses Ergebnis legt nahe, dass *Wnt1* die Proliferation von neuralen Vorläuferzellen, die in ihrem Schicksal noch nicht festgelegt sind, verstärkt, oder gliale und neuronale Vorläuferzellen gleichermaßen beeinflußt. Als zusätzlicher Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme kann die anhand von BrdU Inkorporationsexperimenten gewonnene Erkenntnis gelten, dass die von *Wnt1* hervorgerufene verstärkte Proliferation vor allem in der germinativen Zone des mesenchephalen Vesikels auftritt, in der sich neurale Vorläuferzellen befinden.

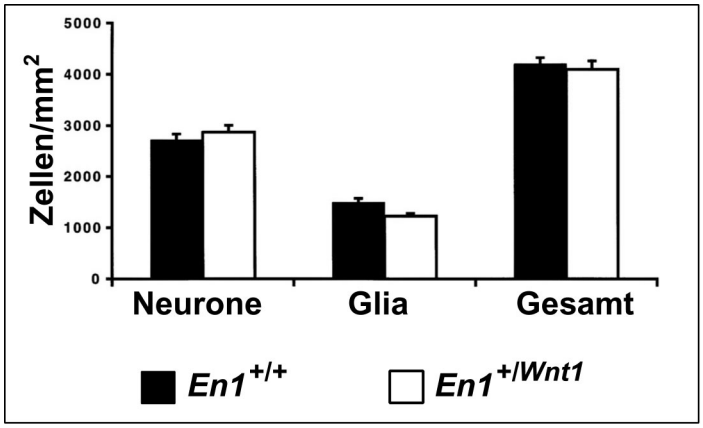

Abbildung 26: Die Zahl der Neurone bzw. Gliazellen pro mm^2 ist in der *En1*$^{+/Wnt1}$ Maus nicht verändert im Vergleich zur *En1*$^{+/+}$ Maus. Für die Zählungen wurden kresylviolett-gefärbte Gewebeschnitte der IC-Region einer adulten *En1*$^{+/+}$ und einer *En1*$^{+/Wnt1}$ Maus verwendet.

3.6.4 Cyclin D1 wird in *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen ektopische exprimiert

Cyclin D1 wurde *in vitro* als Zielgen der kanonischen Wnt-Signaltransduktion charakterisiert (Tetsu, O. *et al.*, 1999; Shtutman, M. *et al.*, 1999). D-Cycline spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus, und eine Überexpression von *Cyclin D1* führt zu verstärkter Proliferation von Brustgewebe bis hin zu Brusttumoren (Wang, T. C. *et al.*, 1994). Um zu überprüfen, ob die Expression dieses Zellzyklusregulators von Wnt1 abhängt und somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung des *En1*$^{+/Wnt1}$ Phänotyps spielen könnte, wurden Expressionsstudien durch *in situ* Hybridisierungen mit *Cyclin D1 antisense*-Sonden an wildtypischen und transgenen Tieren durchgeführt. Wie in Abbildung 27 A und B zu erkennen ist, wird *Cyclin D1* in den proliferativen Zonen des Mittelhirns 16 Tage alter *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen sehr viel stärker exprimiert als in gleichaltrigen wildtypischen Tieren. In anderen Bereichen des Mittelhirns, in denen *Wnt1* ebenfalls ektopisch exprimiert wird (vgl. Abbildung 9 B), konnte keine erhöhte *Cyclin D1* Expression festgestellt werden. In adulten Tieren wurde eine verstärkte Expression von *Cyclin D1* ausschließlich in den IC von transgenen Tieren beobachtet. Ventrale Strukturen oder Hinterhirnbereiche zeigten keine Induktion oder Steigerung der *Cyclin D1* Genexpression (Abbildung 27 C-F).

Somit kann gesagt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von *Wnt1* und *Cyclin D1* in der MHR existiert und somit *Cyclin D1* zur Funktion von *Wnt1* während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung beitragen könnte.

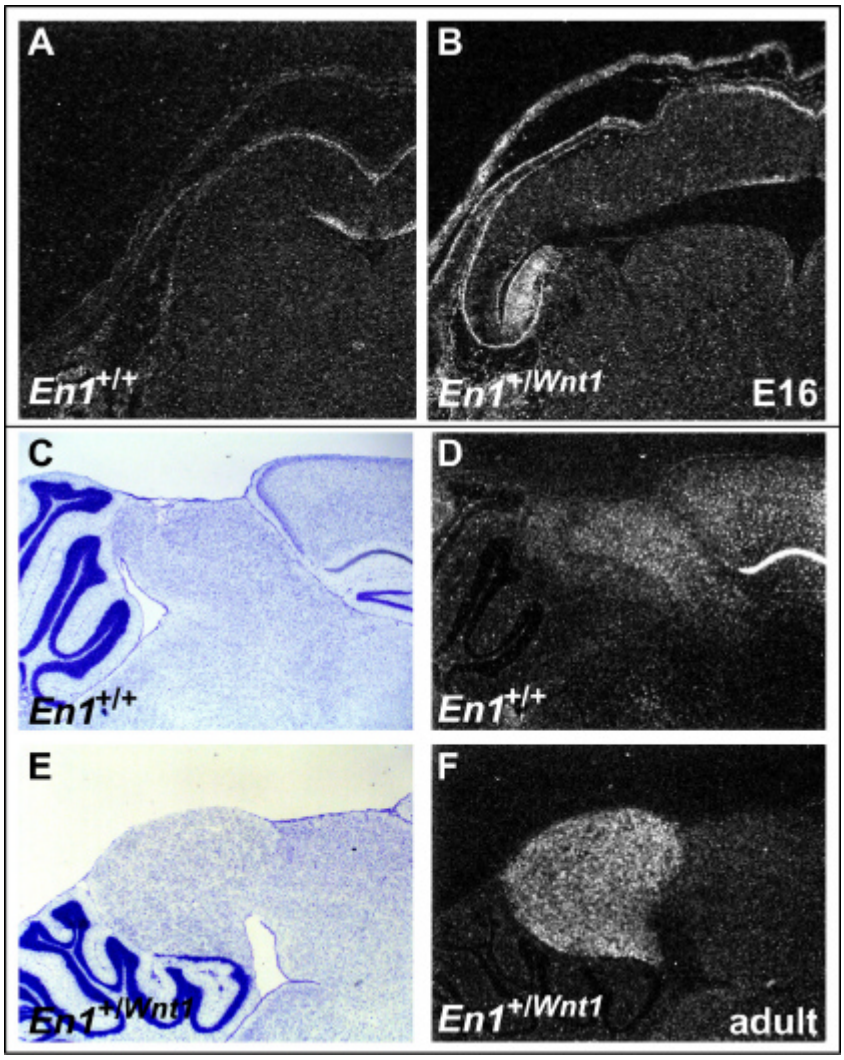

Abbildung 27: Expression von *Cyclin D1* während der Entwicklung und in adulten Tieren. *In situ* Hybridisierungen mit *Cyclin D1 antisense* Sonden an Koronalschnitten von 16 Tage alten Embryonen (A, B) und an Sagittalschnitten adulter Tiere (C-F). A, B, D, F Dunkelfeld-aufnahmen; C, E Hellfeldaufnahmen. In $En1^{+/Wnt1}$ Tieren wird *Cyclin D1* während der Entwicklung verstärkt in der proliferativen Zone des Mittelhirns exprimiert. In adulten Tieren ist eine verstärkte *Cyclin D1* Expression in den IC festzustellen.

3.6.5 Auswirkungen der ektopischen *Wnt1* Expression auf das Hinterhirn

Auch im Hinterhirn konnten während der Entwicklung und in adulten Tieren Veränderungen durch die ektopische Expression von *Wnt1* beobachtet werden. Verglichen mit dem enormen Überproliferationseffekt im dorsalen Mittelhirn sind die beobachteten Effekte im Hinterhirn jedoch sehr gering. Es wurde bereits an anderer Stelle gezeigt, dass im rostralen Hinterhirn während der Embryonalentwicklung eine transiente Expression von LEF1 in $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen festgestellt werden konnte, die in $En1^{+/+}$ Embryonen nicht vorhanden ist (Abbildung 13). Zudem wurde in frühen Embryonalstadien (E10-E15) eine Vergrößerung der lateralen Region des ventro-rostralen Hinterhirns beobachtet, die zu späteren Zeitpunkten nicht mehr erkennbar war (Abbildung 28 A, B).

An Horizontalschnitten von *En1*$^{+/Wnt1}$ Gehirnen adulter Tiere wurde eine leicht wellenförmige Verformung der Folien der anterioren Bereiche der Vermis des Cerebellums deutlich. Vermutlich reflektiert die Form der morphologischen Veränderungen in der Vermis das Expressionsmuster von *En1*, das im Cerebellum während der späten Embryonalentwicklung und postnatal in rostro-kaudalen, parallel verlaufenden Domänen exprimiert wird.

Somit konnte gezeigt werden, dass auch das Hinterhirn auf räumlich und zeitlich begrenzte Weise *Wnt1*-responsiv ist, auch wenn die phänotypische Ausprägung des Effektes von *Wnt1* im Hinterhirn viel subtiler ist als die im dorsalen Mittelhirn.

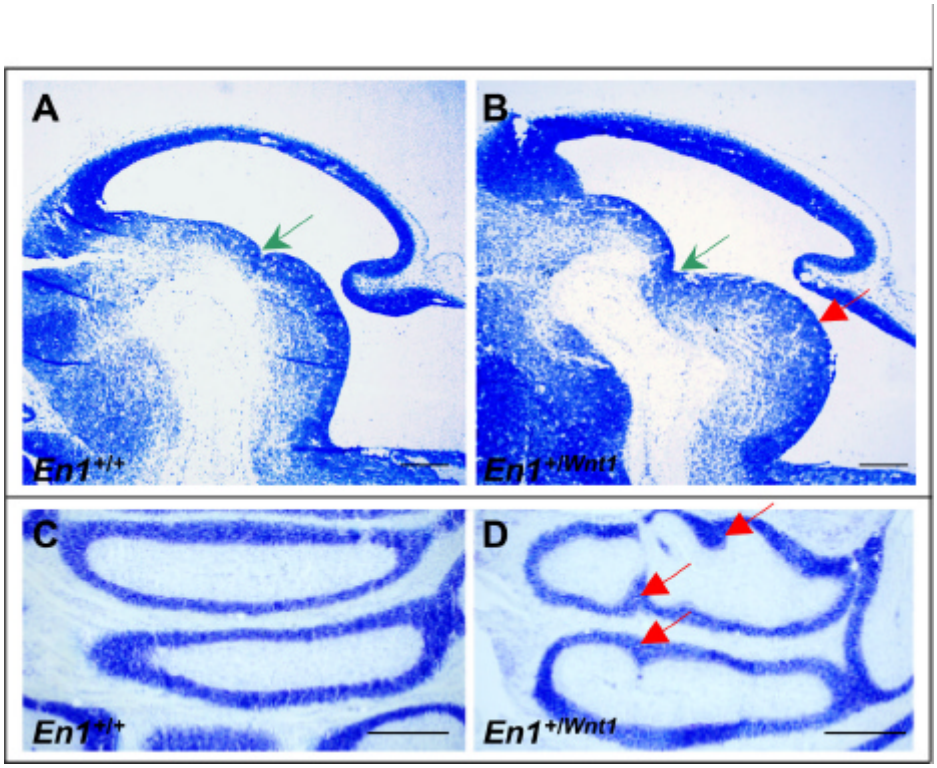

Abbildung 28: Morphologische Veränderungen im Hinterhirn von *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen. A, B Kresylviolett gefärbte Sagittalschnitte von 12.5 Tage alten Embryonen. Die grünen Pfeile deuten auf die Position der Mittel-/Hinterhirngrenze, der rote Pfeil deutet auf die lateral vergrößerte ventrale Hinterhirnregion. C, D Kresylviolet gefärbte Horizontalschnitte der anterioren Vermis adulter Mäuse. Die roten Pfeile deuten auf die wellenförmige Verformung der anterioren Schichtstrukturen. Die Maßstäbe entsprechen 250 µm (A, B) bzw. 500 µm (C, D).

3.7 Gendosiseffekt der proliferationsverstärkenden Wirkung von *Wnt1* und partielle Aufhebung des *En1 Knockout* Phänotyps in *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäusen

Um zu untersuchen, ob es eine Gendosisabhängigkeit der proliferationsfördernden Wirkung von *Wnt1* in der MHR gibt, wurden *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse mit Mäusen der *Deleter*-Linie verpaart. Durch die Einkreuzung von *Deleter*-Mäusen, die das Cre-Rekombinaseenzym in Keimzellen exprimieren (Schwenk, F. *et al.*, 1995), konnte die von *loxP*-Rekombinasestellen flankierte

PGK-Neomycin-Genkassette aus dem transgenen *En1* Genort entfernt werden. Dadurch wurde die Expressionsstärke des Transgens etwa zweifach verstärkt (Broccoli, V. *et al.*, 1999).

En1$^{+/Wnt1aneo}$ Mäuse, in denen die *Neomycin*-Kassette entfernt wurde, sind nicht lebensfähig. Sie werden zwar geboren, sterben aber meist noch am selben Tage. Aus diesem Grunde konnte keine *En1*$^{+/Wnt1aneo}$ Mauslinie etabliert werden.

In Abbildung 29 A ist deutlich zu erkennen, dass die verstärkte Expression von *Wnt1* in der Mittel-/Hinterhirnregion enorme Auswirkung auf die Größe des Mittelhirns von Neugeborenen (Stadium P0) hat. Schon das Gehirn von *En1*$^{+/Wnt1}$ P0 Mäusen weist eine starke Vergrößerung des dorso-kaudalen Mittelhirns auf. Bei *En1*$^{+/Wnt1aneo}$ P0 Mäusen ist der Effekt so ausgeprägt, dass das Mittelhirn fast die gleiche Größe wie der Cortex erreicht. Der dorso-kaudale Mittelhirnbereich wächst dabei lateral zu wulstartigen Strukturen aus.

Durch zwei *Knock-In* Allele kann die *Wnt1*-Gendosis ebenfalls erhöht werden. Die Auswertung des Phänotyps wird allerdings dadurch erschwert, dass gleichzeitig mit der verstärkten Expression von *Wnt1* in *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Tieren auch ein Verlust der *En1* Expression einhergeht. Dieses Experiment ist dennoch sinnvoll, da überprüft werden kann, ob eine vermehrte Synthese von *Wnt1* den Verlust von *En1* ausgleichen kann. Im umgekehrten Fall, also einer Überexpression von *En1* in *Wnt1*$^{-/-}$ Mäusen, konnte bereits gezeigt werden, dass der *Wnt1 Knockout* Phänotyp wenigstens teilweise aufgehoben wurde (Danielian, P. S. *et al.*, 1996). *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäuse werden zwar geboren, sind jedoch, genau wie *En1*$^{+/Wnt1aneo}$ Tiere, nicht lebensfähig. Der Extremitäten-Phänotyp, der von *En1*$^{-/-}$ Mäusen beschrieben wurde, war auch in *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Neugeborenen festzustellen. Es konnten Fusionen von Fingern oder die Ausbildung zusätzlicher Finger beobachtet werden, die aus der Handinnenfläche herauswuchsen, sowie Missbildungen des Sternums (Daten nicht gezeigt), wie dies schon für *En1*$^{-/-}$ Tiere beschrieben wurde (Wurst, W. *et al.*, 1994). Diese Dorsalisierung der Extremitäten konnte durch die verstärkte Expression von *Wnt1* nicht aufgehoben werden. Erstaunlicherweise wiesen die *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Tiere jedoch keinen Verlust der Mittel-/Hinterhirnregion auf, wie dies bei dem völligen Fehlen der *En1* Expression zu erwarten gewesen wäre. Im Gegenteil, die Neugeborenen besaßen sogar eine größere Mittelhirnregion als *En1*$^{+/Wnt1}$ Tiere gleichen Alters (Abbildung 29 A, B).

Eine detailliertere Analyse des *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Phänotyps ist notwendig, um die hinter diesem „*Rescue*"-Experiment liegende genetische Interaktion von *En1* und *Wnt1* zu verstehen.

Abbildung 29: Gendosiseffekt und teilweise Aufhebung des *En1*$^{-/-}$ Phänotyps in neugeborenen *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäusen. A dorsale Sicht auf Gehirne von neugeborenen *En1*$^{+/+}$, *En1*$^{+/Wnt1}$, *En1*$^{+/Wnt1aneo}$ und *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäusen. Der proliferationsverstärkende Effekt von *Wnt1* ist dosisabhängig, wie an der progressiven Vergößerung des kaudalen Mittelhirns von *En1*$^{+/+}$, *En1*$^{+/Wnt1}$ und *En1*$^{+/Wnt1aneo}$ zu erkennen ist. B kresylviolett-gefärbte, koronale Schnitte von Gehirnen neugeborener *En1*$^{+/+}$, *En1*$^{+/Wnt1}$ und *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäuse. *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäuse zeigen keinen Verlust der Mittel-/Hinterhirnregion.

3.7.1.1 Ein Allel ist zur Aufhebung des *En1 Knockout* Phänotyps nicht ausreichend: Der *En1*$^{lacZ/Wnt1}$ Phänotyp

Offenbar reicht die *Wnt1* Gendosis in *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Tieren aus, um den Verlust der Mittel- und Hinterhirnregion zu verhindern. Als nächstes wurde untersucht, ob bereits eine geringere *Wnt1* Dosis zu einer teilweisen Rettung des *En1 Knockout* Phänotyps genügt. Dazu wurden *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse mit einer Mauslinie verpaart, die anstelle eines funktionalen *En1* Allels die kodierende Sequenz von *lacZ* unter der Kontrolle des endogenen *En1* Promotors besaß (Hanks, M. *et al.*, 1995). *En1*$^{lacZ/Wnt1}$ Mäuse waren nicht lebensfähig und starben kurz nach der Geburt oder nach wenigen Tagen. Der Mittel-/Hinterhirnphänotyp wurde an Neugeborenen untersucht. Dabei zeigte sich ein sehr variabler Phänotyp, der von einem nahezu vollständigen Verlust der Mittel-/Hinterhirnregion (vgl. Abbildung 31 B) bis hin zu einem weitgehenden Erhalt der inferioren colliculi und des Cerebellums reichte. Der Extremitäten-Phänotyp wurde in keinem der untersuchten Fälle aufgehoben. Ein Beispiel für eine *En1*$^{lacZ/Wnt1}$ P0 Maus mit recht weitgehendem Erhalt der MHR ist in Abbildung 30 G-I dargestellt. Zum Vergleich wurden auch *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Neugeborene untersucht. Die Nissl-Färbung zeigt deutlich, dass in der *En1*$^{lacZ/Wnt1}$ P0 Maus sowohl das Cerebellum als auch die colliculi vorhanden sind. Die

inferioren colliculi sind jedoch stark verkleinert. Um zu untersuchen, ob sich eine deutliche Grenze zwischen colliculi und Cerebellum ausgebildet hatte, wurden *Ephrin A5 in situs* durchgeführt. *Ephrin A5* wird auf charakteristische Weise in einem Gradienten in den inferioren und superioren colliculi exprimiert (Abbildung 30 B). Die Expression dieses Gens ist in der untersuchten $En1^{lacZ/Wnt1}$ Maus unverändert (Abbildung 30 H), was darauf hin deutet, dass die Musterbildung in der Region nicht gestört sein könnte. Auch Nestin-Färbungen unterstützen diese Hypothese, da in den Mutanten Immunreaktivität in gleichen Regionen der inferioren colliculi und des Cerebellums aufzufinden ist wie im Wildtyp (Abbildung 30 C, F, I). Sagittalschnitte anderer $En1^{lacZ/Wnt1}$ P0 Mäuse sind in Abbildung 31 abgebildet. Der Phänotyp reicht von einem Verlust der inferioren colliculi (A) zu einem Verlust der IC und starker Reduktion des Cerebellums (B) und erinnert in ihrem Phänotyp sehr stark an den von $En1^{-/-}$ Mäusen (Wurst, W. *et al.*, 1994). Trotz des sehr variablen Phänotyps, der möglicherweise von dem genetischen Hintergrund der Tiere abhängt, kann gesagt werden, dass $En1^{lacZ/Wnt1}$ Mäuse im Mittel einen weniger stark ausgeprägten Verlust der MHR aufweisen als $En1^{-/-}$ Mäuse, jedoch wäre es übertrieben und unangebracht, von einer Wiederherstellung des normalen Phänotyps zu sprechen. Weiterhin sei darauf hingewiesen, dass eine detailliertere Analyse notwendig ist, einschließlich einer Analyse der frühen Musterbildung an der Mittel-/Hinterhirngrenze, um ein tiefes Verständnis der für die Entstehung des Phänotyps von $En1^{lacZ/Wnt1}$-Mäusen verantwortlichen biologischen Prozesse zu erlangen.

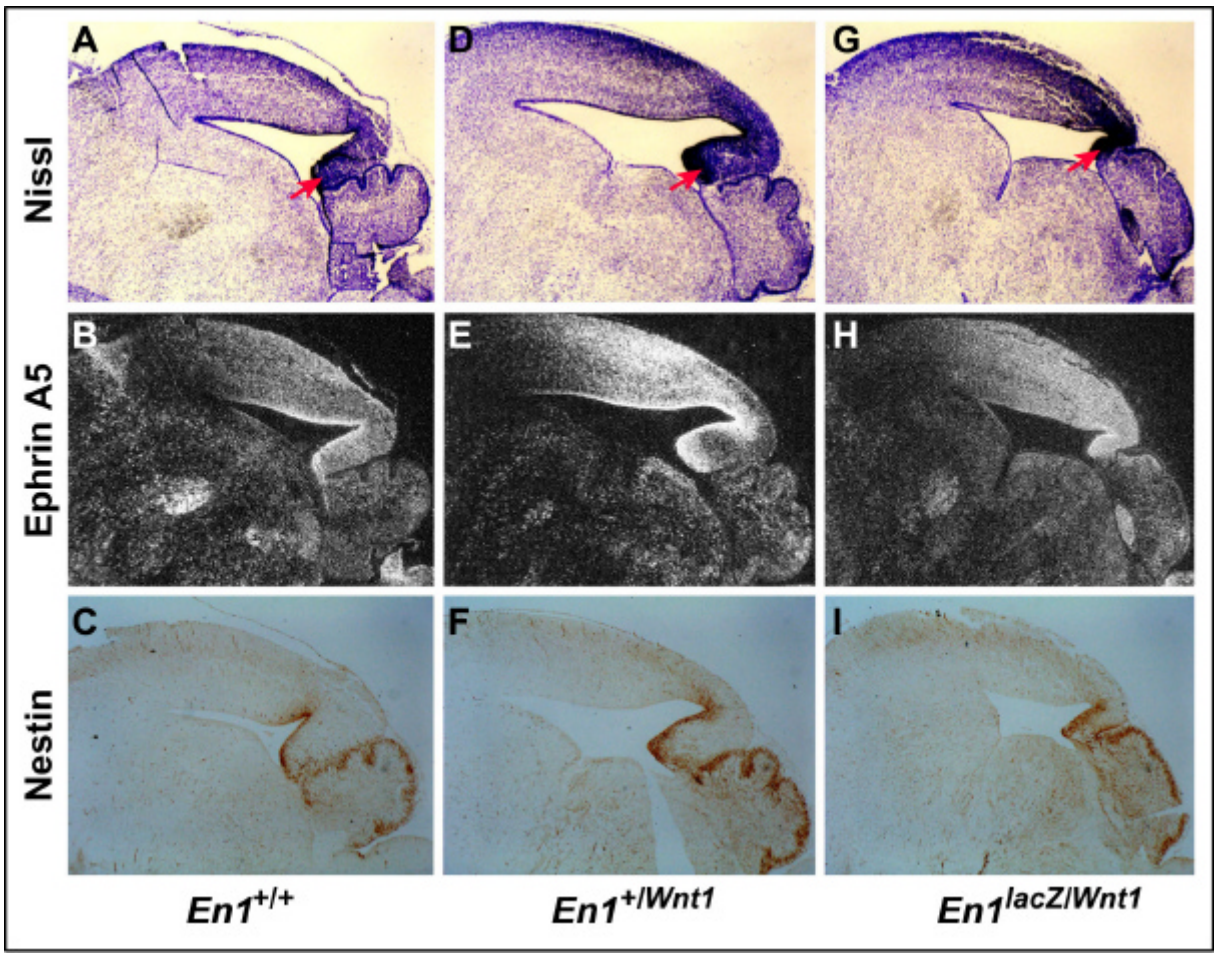

Abbildung 30: Eine erste Analyse des *En1*$^{lacz/Wnt1}$ Phänotyps an medio-sagittalen Gehirnschnitten von neugeborenen Mäusen. A, D, G Hellfeldaufnahmen der durch Nissl-Färbung gegengefärbten mit *Ephrin A5 antisense* Sonde durchgeführten radioaktiven *in situ* Hybridisierungen, die in B, E und H im Dunkelfeld abgebildet sind. C, F, I Nestin-Färbungen. A-C Schnitte von *En1*$^{+/+}$ Gehirnen; D-F Schnitte von *En1*$^{+/Wnt1}$ Gehirnen; G-I Schnitte von *En1*$^{lacz/Wnt1}$ Gehirnen. Die roten Pfeile weisen auf die inferioren colliculi.

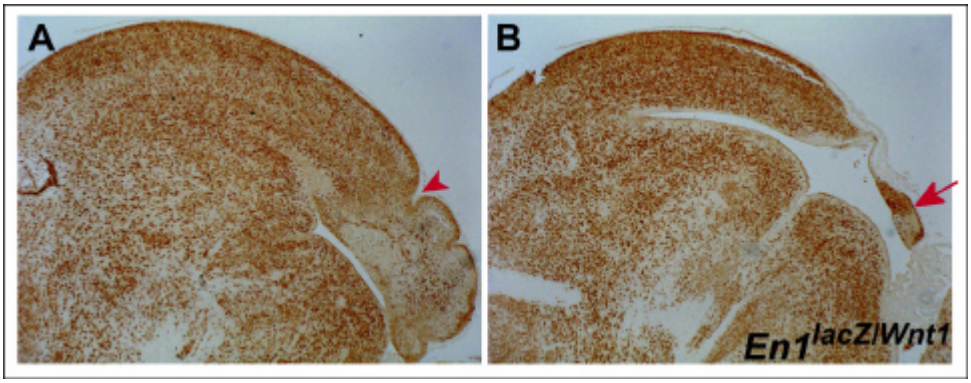

Abbildung 31: NeuN-Färbung an sagittalen Schnitten neugeborener *En1*$^{lacZ/Wnt1}$ Embryonen. Dem Tier in (A) fehlen die inferioren colliculi (roter Pfeilkopf). Die Mutante in (B) hat zudem ein stark reduziertes Cerebellum (roter Pfeil). Der Choroid Plexus ist normal ausgebildet.

4 Diskussion

Die Musterbildung des zunächst unsegmentierten Neuralrohres entlang der anterior-posterior Körperachse wird wenigstens teilweise durch lokale Signalzentren, sogenannte Organisatoren, gesteuert. Ein wichtiges und bereits recht detailliert untersuchtes Signalzentrum ist der Mittel-/Hinterhirnorganisator (MHO) (Wurst, W. *et al.*, 2001; Rhinn, M. *et al.*, 2001; Martinez, S., 2001; Liu, A. *et al.*, 2001b). Einer der Faktoren, die im Bereich des MHO exprimiert werden, ist das sezernierte Glykoprotein Wnt1. Aufgrund einer stark reduzierten oder sogar völlig fehlenden Mittel-/Hinterhirnregion in Tieren ohne funktionstüchtiges *Wnt1* Gen wurde es für möglich gehalten, dass dieses Gen zur Aktivität des MHO wesentlich beiträgt (McMahon, A. P. *et al.*, 1990; Thomas, K. R. *et al.*, 1990). Die genaue Art und Weise der Funktion von *Wnt1* ließ sich jedoch aus diesen *Knockout* Experimenten nicht eindeutig ableiten. Aus diesem Grunde wurde die Bedeutung von *Wnt1* für die Entwicklung der Mittel-/Hinterhirnregion anhand eines *Knock-In* Experimentes untersucht. Durch das Ersetzen des Homeoboxgenes *En1* mit der kodierenden Sequenz von *Wnt1* sowie einer *IRES lacZ* Genkassette wurde ein verändertes *En1* Allel geschaffen, das nun *Wnt1* in der *En1* Expressionsdomäne exprimierte. Aufgrund der Tatsache, dass heterozygote Mäuse mit nur einem funktionstüchtigen *En1* Allel keinen Phänotyp aufweisen (Wurst, W. *et al.*, 1994), konnten $En1^{+/Wnt1}$ Mäuse zur Analyse der *Wnt1*-Funktion während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung herangezogen werden. Durch diesen Ansatz konnte gezeigt werden, dass *Wnt1* nicht primär an der Musterbildungsaktivität des MHO beteiligt ist, sondern vielmehr über die Regulation des Wachstums bzw. der Proliferation neuraler Vorläuferzellen den Erhalt und die Größe des dorsalen Mittelhirngewebes bestimmt.

4.1 Erzeugung der transgenen Mauslinie

In der vorliegenden Arbeit wurde die kodierende Sequenz des Maus *Wnt1*-Gens unter die Kontrolle des endogenen *En1* Promotors gebracht.

$En1^{+/Wnt1}$ Mäuse haben im Vergleich zu wildtypischen Artgenossen ein signifikant reduziertes Gewicht. Hier kann spekuliert werden, ob die Überexpression von *Wnt1* in der MHR die neuroendokrinen Mechanismen, die der Regulation der Körpergewicht-Homöostase einer Maus zu Grunde liegen, zu beeinflussen vermag. Suggestiv ist die Konvergenz der Insulin-Signaltransduktion, die in die Regulation des Körpergewichts involviert ist, mit der klassischen Wnt-Signaltransduktion, da die Inaktivierung der Glykogen Synthase Kinase 3β (GSK3β) Bestandteil beider Transduktionskaskaden ist. Allerdings unterscheiden sich die Mechanismen der GSK3β-Inaktivierung von Wnt- und Insulin-Signaltransduktion voneinander (Frame, S. *et al.*, 2001).

En1$^{+/Wnt1}$ Mäuse leiden gelegentlich an spontanen, Epilepsie-ähnlichen Anfällen, in deren Verlauf die Tiere wild im Käfig umherrennen und springen. Ob die ektopische Expression von *Wnt1* primäre Ursache für dieses Verhalten ist, kann nicht ausgeschlossen werden, wenngleich die Möglichkeit, das es sich um einen sekundär auftretenden Effekt handelt, ausgelöst z.B. durch die erhöhte Raumforderung der vergrößerten IC, wohl wahrscheinlicher ist.

4.2 Ektopische Expression von W*nt1* in der *En1* Expressionsdomäne

Durch die gewählte *Knock-In* Strategie konnte die natürliche Expressionsdomäne von *Wnt1* sowohl räumlich als auch zeitlich erweitert werden. Dies konnte auf verschiedene Weise gezeigt werden. Einerseits wurde durch *in situ* Hybridisierungen mit Digoxygenin-markierten *antisense*-Sonden an ganzen, 9.5 Tage alten Embryonen gezeigt, dass *Wnt1* mRNA sowohl nach rostral als auch nach kaudal wie gewünscht über die sich entwickelnde Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg ektopisch synthetisiert wurde. Auch konnte die Aktivität der β-Galaktosidase in dieser *En1*-Domäne durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Dadurch wurde sowohl die ektopische Synthese des *Wnt1-IRES-lacZ* Transkriptes bestätigt, als auch die Funktionsfähigkeit der künstlichen bicistronischen mRNA überprüft. Erstaunlich war die Beobachtung, dass die ektopische Expression des Transgens weder mittels *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen noch durch β-Galaktosidasefärbungen in den übrigen Expressionsdomänen von *En1*, nämlich den Extremitätenanlagen und den Somiten, festgestellt werden konnte. Nur durch die Methode der radioaktiven *in situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten konnte ein schwaches, ektopisches *Wnt1* Signal an den Pfoteninnenseiten von 14 Tage alten Embryonen detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass das Transgen in diesen *En1* Teildomänen nur sehr schwach exprimiert wird. Der Erklärungsversuch, dass die *Wnt1* Gendosis in den Extremitäten und Somiten von *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen zu gering ist, weil *Wnt1* nur von einem Allel exprimiert wird, ist unzureichend, da *En1* unter den gleichen Bedingungen sehr wohl durch *in situ* an ganzen Embryonen nachgewiesen werden kann (vgl. Abbildung 12 E). Es ist daher davon auszugehen, dass durch die Integration des Zielvektors in den *En1* Genort ein *Enhancer*-Element, also ein regulatorischer Genabschnitt, der die Expressionsstärke des Gens steuert, in seiner Funktion beeinträchtigt oder ein *Silencer*-Element, das die Expression des Gens normalerweise abschwächt, in seiner Funktion verstärkt wurde. Dies ist deshalb nicht unwahrscheinlich, weil sich *Enhancer*- und *Silencer*-Elemente nicht selten im ersten Intron eines Gens befinden, und die Entfernung dieser Elemente zum Transkriptionsstart teilweise entscheidend ist für die Funktionsfähigkeit der Steuerelemente. Durch die Integration der *Wnt1-IRES-lacZ* Sequenz sowie der *Neomycin-Phosphotransferase*-Kassette wurden mehrere

Kilobasen zwischen dem Transkriptionsstart und dem Intron des *En1* Gens eingefügt, wodurch möglicherweise ein Steuerelement in seiner Funktion gestört wurde. Für die Untersuchungen an der sich entwickelnden Mittel-/Hinterhirngrenze hat die schwache Expression des Transgens in den Extremitätenanlagen und Somiten jedoch keine Bedeutung, vielmehr werden auf diese Weise potentiell gesundheitsbeeinträchtigende oder sogar letale Veränderungen der Wirbelsäule und Extremitäten vermieden.

Es konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression von *Wnt1* in der MHR auch in späteren Embryonalstadien und in adulten Tieren aufrechterhalten bleibt. Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit, die Funktion von *Wnt1* nicht nur während der frühen Entwicklung des zentralen Nervensystems, sondern im adulten Gehirn zu studieren.

Ein direkter Nachweis des ektopisch exprimierten Wnt1 Glykoproteins ist nicht möglich, da kein spezifischer Antikörper verfügbar ist. An Schnitten von adulten Mausgehirnen konnte jedoch die Aktivität des ektopisch exprimierten *Wnt1* Gens indirekt durch einen Nachweis der Aktivierung des klassischen *Wnt* Signaltransduktionsweges gezeigt werden. β-catenin, ein Schlüsselmolekül in der Signalweiterleitung des klassischen Wnt-Signalweges, befindet sich in den Neuronen der inferioren colliculi adulter $En1^{+/Wnt1}$ Mäuse in den Zellkernen, während dies in $En1^{+/+}$ Mäusen nicht der Fall ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass (1) das ektopisch synthetisierte *Wnt1* Transkript durch *in situ* Hybridisierungen nachgewiesen wurde, (2) die Translatierbarkeit dieses Transkriptes durch den Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität gezeigt werden konnte und (3) die ektopische Aktivierung des klassischen Wnt-Signaltransduktionsweges in den inferioren colliculi adulter $En1^{+/Wnt1}$ Mäuse festgestellt wurde und somit davon ausgegangen werden kann, dass das *Knock-In* Allel in gewünschter Weise funktionsfähig ist.

4.3 Die Positionierung des MHO wird durch eine Verschiebung der *Wnt1* Expressionsdomäne nicht verändert

Mutanten, in denen die Expressionsdomäne des Homeoboxgenes *Otx2* nach kaudal verschoben wurde, weisen eine entsprechende Verschiebung des MHO und nachfolgend auch der Mittel-/Hinterhirngrenze auf (Broccoli, V. *et al.*, 1999). Eine Verschiebung der Expressionsdomäne des Homeoboxgens *Gbx2* nach rostral führt ebenfalls zu einer korrespondierenden Positionsänderung des MHO (Millet, S. *et al.*, 1999).

Falls *Wnt1* in die Positionierung des MHO involviert ist, sollte die ektopische Expression von *Wnt1* zu einem ähnlichen Ergebnis führen. Durch *in situ* Hybridisierungen an ganzen, 9.5 Tage alten $En1^{+/+}$ und $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen konnte gezeigt werden, dass die Genexpressions-

domänen von keinem der untersuchten MHO spezifischen Markergene in dem gesamten Bereich, in dem *Wnt1* überexprimiert wurde, ektopisch induziert ist (Abbildung 12). Allerdings konnten subtile Veränderungen in dem Expressionsmuster von *Pax2* beobachtet werden. Die *Pax2* Mittel-/Hinterhirn-Expressionsdomäne in 9.5 Tage alten wildtypischen Embryonen besteht aus einem engen Ring unmittelbar an der Mittel-/Hinterhirngrenze. In $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen konnte hingegen eine leicht verstärkte Expression von *Pax2* im ventralen Bereich beobachtet werden (Abbildung 12 D).

Weiterhin scheint die *En1*-Expressionsdomäne in der ventralen MHR leicht vergrößert zu sein (s. Abbildung 12 E). Die Beobachtung der verbreiterten *En1*-Expressionsdomäne lässt darauf schließen, dass die Expression von *En1* durch *Wnt1* induziert oder aufrechterhalten wird. Für die Annahme, dass *Wnt1* und *En1* auf genetischer Ebene in Wechselwirkung stehen, gibt es bereits eine Reihe von Hinweisen. Erstens wurde ein schrittweiser Rückgang der *En1* Expression in $Wnt1^{-/-}$ Embryonen beschrieben (McMahon, A. P. *et al.*, 1992). Zweitens konnte der $Wnt1^{-/-}$ Phänotyp durch Überexpression von *En1* in der *Wnt1* Domäne teilweise verhindert werden (Danielian, P. S. *et al.*, 1996). Drittens ist auch in *Drosophila* das *Wnt1* ortholog *wingless* notwendig, um die Expression von *engrailed* in benachbarten Zellen aufrechtzuerhalten (Bejsovec, A. *et al.*, 1991). In der vorliegenden Arbeit konnten außerdem in *in situ* Hybridisierungen auf Schnitten unter Verwendung radioaktiver *En1 antisense* Sonden regelmäßig stärkere Signale in $En1^{+/Wnt1}$ Präparaten als in $En1^{+/+}$ Präparaten beobachtet werden (s. Abbildung 9 D, E, G, H und Daten nicht gezeigt).

Durch die Methode der Ganzkörper- *in situ* Hybridisierung an 9.5 Tage alten $En1^{+/+}$ und $En1^{+/Wnt1}$ Mausembryonen konnte keine Veränderung der *Fgf8*-Expressionsdomäne beobachtet werden. Vergleichbare *Wnt1*-Missexpressionsexperimente mit Hühnerembryonen kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während unter Verwendung eines retroviralen Systems keine Veränderungen in der Expression von *Fgf8* und anderen Mittel-/Hinterhirn Markergenen beobachtet werden konnten (Adams, K. A. *et al.*, 2000), wurde in einer neueren Studie, bei der die Elektroporationstechnik verwendet wurde, eine dramatische Vergrößerung der *Fgf8* Expressionsdomäne festgestellt (Matsunaga, E. *et al.*, 2002).

Eine detaillierte Untersuchung mit $En1^{+/Wnt1}$ Embryonen ist notwendig, in der unter Verwendung einer sensitiveren Nachweismethode wie z.B. der radioaktiven *in situ* Hybridisierung an Schnitten, möglichen subtilen Veränderungen auf den Grund gegangen wird.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass sich die Entwicklung der MHR in Hühnern und in Mäusen, so ähnlich sie auf den ersten Blick erscheinen mag, doch auch substantiell unterscheiden könnte. Ein Hinweis darauf liefert z.B. ein Vergleich der Zeitpunkte, an dem

einzelne Gene während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung an- bzw. ausgeschaltet werden; dort gibt es z.T. sehr deutliche Unterschiede, die Abweichungen in den zugrundeliegenden genetischen Netzwerken reflektieren könnten (Rhinn, M. *et al.*, 2001).

Die Expression von *Otx2* und *Gbx2* wird zu dem untersuchten Zeitpunkt nicht von *Wnt1* beeinflußt. Dies ist eine wichtige Beobachtung, da der MHO seine zentrale Funktionen, nämlich die Ausbildung der Mittel-/Hinterhirngrenze sowie die Festlegung der Gewebeidentität gerade in diesen frühen Entwicklungsstadien ausübt. Die experimentelle Verschiebung der Expressionsdomänen von *Otx2* und *Gbx2* zeigte, dass die *Wnt1* Expression den künstlich erzeugten neuen Expressionsgrenzen von *Otx2* und *Gbx2* folgte, woraus geschlossen werden kann, dass sich *Wnt1* im genetischen Netzwerk hierarchisch unterhalb dieser beiden Homeoboxgene befindet und von ihnen, direkt oder indirekt, kontrolliert wird. Möglicherweise könnte *Wnt1* zu einem früheren Zeitpunkt die Positionierung der Mittel-/Hinterhirngrenze beeinflussen. Da *En1* in der Maus nicht vor *Wnt1* induziert wird (Rhinn, M. *et al.*, 2001), kann diese Frage durch den in dieser Arbeit gewählten Ansatz nicht geklärt werden. *Otx2*, *Gbx2* und *Pax2* werden früher als *Wnt1* und *En1* exprimiert (Rhinn, M. *et al.*, 2001) und könnten die Position des MHO festlegen, noch bevor *Wnt1* aktiv ist. Für die normale Mausentwicklung hätte die potentielle Fähigkeit von *Wnt1*, die Position des MHO zu einem früheren Zeitpunkt, als es normalerweise exprimiert wird, zu beeinflussen, jedoch keine Bedeutung.

In Mausembryonen führte die experimentelle Missexpression von *Wnt1* im Rückenmark zu keiner gestörten Musterbildung (Dickinson, M. E. *et al.*, 1994; Megason, S. G. *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse gehen konform mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten, da auch in der MHR die Musterbildung durch ektopische Expression von *Wnt1* nicht bzw. nur subtil gestört zu sein scheint.

Zusammenfassend ist daher davon auszugehen, dass *Wnt1* trotz eines Expressionsmusters, das eine wesentliche Beteiligung an der Aktivität des MHO nahe legt, wohl vor allem als eine Art permissiver Faktor eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der gesamten Region spielt, sowie an der Feinabstimmung der Expressionsdomänen von Mittel-/Hinterhirn Markergenen beteiligt ist.

4.4 *Wnt1* verstärkt die Proliferation in der Mittel-/Hinterhirnregion

Neuere Untersuchungen legen nahe, dass *Wnt1* als Mitogen wirkt. Die ektopische Expression von *Wnt1* im Rückenmark von Mäuseembryonen resultierte in einer verstärkten Proliferation von neuralen Vorläuferzellen, vor allem in dorsalen Bereichen (Dickinson, M. E. *et al.*, 1994; Megason, S. G. *et al.*, 2002). Im Vogelmodell konnte auch während der Vorderhirnentwicklung durch ektopische Expression von *Wnt1* eine verstärkte Proliferation hervorgerufen werden. Ein

vergleichbarer Effekt wurde in der Mittelhirnregion jedoch nicht festgestellt (Adams, K. A. *et al.*, 2000).

Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass *Wnt1* die Proliferation in der MHR von Mäuseembryonen verstärkt. Der dorsale Bereich des Mittelhirns ist dabei von der proliferationsfördernden Wirkung stärker betroffen als der ventrale Bereich oder das Hinterhirn. Die verstärkte Zellteilungsaktivität während der Embryonalentwicklung führt zu einer extremen Vergrößerung der inferioren colliculi in adulten Tieren (s. Abbildung 14, Abbildung 15). Die Gewebeidentität von Mittel- und Hinterhirn sowie von inferioren und superioren colliculi wird dadurch nicht verändert, wie durch immunhistochemische Analyse gezeigt werden konnte.

Aufgrund der Tatsache, dass das Verhältnis von Neuronen zu Gliazellen in den vergrößerten IC im Vergleich zu dem Verhältnis in normalen IC nicht verändert ist, kann zurückgeschlossen werden, dass die proliferationsfördernde Wirkung von *Wnt1* neurale Vorläuferzellen, die in ihrem Schicksal noch nicht festgelegt sind, oder neuronale und gliale Vorläuferzellen in gleichem Maße betrifft.

Die proliferationsfördernde Wirkung von *Wnt1* ist dosisabhängig. Dieser Zusammenhang wurde durch Größenvergleich der Mittelhirnregion von Neugeborenen $En1^{+/+}$, $En1^{+/Wnt1}$ sowie $En1^{+/Wnt1aNeo}$ Mäusen dokumentiert. Die expressionsreprimierende Wirkung der *PGK-Neomycin-Phosphotransferase*-Genkassette auf benachbarte Gene ist gut dokumentiert (Olson, E. N. *et al.*, 1996; Pham, C. T. *et al.*, 1996; Floss, T. *et al.*, 1996; Broccoli, V. *et al.*, 1999). Dieser Umstand wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des *Wnt1* Gendosiseffekts zu Nutze gemacht. Der ursprüngliche Zielvektor enthält neben der *Wnt1-IRES-lacZ* Kassette auch eine *PGK-Neomycin-Phosphotransferase* (*PGK-Neo*) Kassette (s. Abbildung 2). Diese wird von zwei *loxP*-Rekombinaseschnittstellen flankiert. Durch das Einkreuzen einer Mauslinie, die das *Cre*-Rekombinasegen ubiquitär exprimierte, konnten Allele erzeugt werden, die keine *PGK-Neo* Kassette enthielten ($En1^{+/Wnt1aNeo}$). Transgene Tiere ohne die *PGK-Neo* Genkassette wurden geboren, starben aber bald nach der Geburt, so dass keine Mauslinie dieses Genotyps etabliert werden konnte. Das Mittelhirn von Neugeborenen dieses Genotyps ist im Vergleich zu dem von $En1^{+/Wnt1}$ Tieren gleichen Alters noch einmal drastisch vergrößert. Diese Beobachtung sowie die Letalität der Tiere zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Gendosis und Phänotyp auf. Unter dem Vorbehalt, dass das Fehlen von *En1* zu dem Phänotyp beitragen könnte, kann auch das vergrößerte Mittelhirn von $En1^{Wnt1/Wnt1}$ P0 Mäusen als Hinweis für die Gendosisabhängigkeit herangezogen werden. Da der Phänotyp von $En1^{-/-}$ Tieren aus einer starken Reduktion oder völligem Verlust der MHR besteht, ist es unwahrscheinlich, dass

der *En1 Knockout* in Zusammenhang steht mit der durch ektopisches *Wnt1* erzeugten verstärkten Proliferation. Es ist vorstellbar, dass es in *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäusen während der Entwicklung zu einer starken positiven Rückkopplung kommt durch ektopisches Wnt1, das in der *En1* Expressionsdomäne den *En1* Promotor aktiviert. Mäuse, die heterozygot für *Wnt1* sind (*Wnt1*$^{+/-}$), entwickeln sich normal (McMahon, A. P. *et al.*, 1990; Thomas, K. R. *et al.*, 1990). Bei einer reinen, linearen Dosisabhängigkeit wäre bei reduzierter *Wnt1*-Produktion eine geringere Proliferation zu erwarten gewesen. Obwohl dies in *Wnt1*$^{+/-}$ Tieren nicht detailliert untersucht wurde, deutet das Fehlen eines ausgeprägten Phänotyps darauf hin, dass genügend *Wnt1* für eine normale Entwicklung gebildet wird. Somit kann gesagt werden, dass die von *Wnt1* verursachte Verstärkung der Proliferation in der MHR dosisabhängig ist, jedoch eine geringe Menge an *Wnt1* für eine normale Entwicklung ausreicht.

Die proliferationsfördernde Wirkung von *Wnt1* ist gewebespezifisch. Während das dorsale Mittelhirn sehr stark von der vermehrten Proliferation betroffen ist, bleibt die Zellteilungsaktivität in ventralen Mittelhirnstrukturen weitgehend unverändert. Das ventrale Hinterhirn weist eine zeitlich begrenzte erhöhte Proliferation auf, und auch das Cerebellum ist bei weitem weniger betroffen als die inferioren colliculi des Mittelhirns. In Tieren mit stark erhöhter *Wnt1* Dosis, wie bei den *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Neugeborenen, ist auch das ventrale Mittelhirn vergrößert (vgl. Abbildung 29). Dieses Ergebnis zeigt auch, dass die Komponenten des beteiligten *Wnt*-Signaltransduktionsweges im ventralen Bereich vorhanden sein müssen. Möglicherweise wird hier die Aktivität von *Wnt1* jedoch durch Inhibitoren blockiert, und die Beobachtung der Aufhebung dieser Inhibition durch erhöhte Dosen von *Wnt1* könnte durch einen Titrationseffekt erklärt werden. Es sind bereits eine ganze Reihe von Faktoren beschrieben worden, die die Wnt-Signaltransduktion inhibieren können. Darunter sind sezernierte Proteine, die eine Domäne beinhalten, die eine hohe Homologie zu der Cystein-reichen Liganden-Bindedomäne (CRD) des Frizzled Rezeptors haben (Frzb/sFRP, *Secreted Frizzled Related Proteins*), oder Dickkopf (Dkk), der mit dem Korezeptor LRP/arrow interagieren. Als übergeordneter Regulator für die Inhibition des Wnt-Signalweges im ventralen Neuralrohr kommt Sonic hedgehog (Shh) in Frage. Die ektopische Expression von *Shh* im dorsalen Mittelhirn von Hühnchenembryonen erzeugte neben der Repression von Genen, die für die normale Entwicklung dieser Region notwendig sind, einschließlich *Wnt1*, eine starke Unterdrückung der Proliferation (Watanabe, Y. *et al.*, 2000). Da *Shh* während der gesamten Entwicklung des embryonalen zentralen Nervensystems in der ventralen Mittellinie exprimiert wird, könnte es in dieser Region antagonistisch zur Wnt-Signaltransduktion wirken. Für diese Hypothese spricht ebenfalls, dass auch im Rückenmark ein von dorsal nach ventral schwächer

werdender Gradient der Wnt1-Responsivität in bezug auf die proliferationsverstärkende Wirkung vorhanden ist (Dickinson, M. E. *et al.*, 1994; Megason, S. G. *et al.*, 2002). Allerdings kommen auch andere Erklärungen für den Proliferationsgradienten in Frage. So könnten auch Wnt5a oder –7a, die beide auch im ventralen Mittel- und Hinterhirn exprimiert werden (Parr, B. A. *et al.*, 1993), die Wnt1 Signaltransduktion blockieren. Dass Proteine der Wnt5a-Klasse die Signaltransduktion der Proteine der Wnt1-Klasse prinzipiell blockieren können, wurde in *Xenopus* gezeigt (Torres, M. A. *et al.*, 1996). Eine Klärung der Frage, welcher dieser Mechanismen tatsächlich für die geringe Proliferations-Antwort des ventralen ZNS auf *Wnt1*-Signale verantwortlich ist, bedarf weiterer Experimente.

Interessanterweise setzte eine deutliche Verstärkung der Proliferation durch die ektopische Expression von *Wnt1* erst in etwa 13 Tage alten Embryonen ein, obwohl der Ligand bereits in 8 Tage alten Embryonen überexprimiert wurde. Dies könnte bedeuten, dass während der frühen Embryonalentwicklung ein anderer Faktor als Wnt1 die Proliferationsrate limitiert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass zu frühen Zeitpunkten während der Entwicklung die Zellteilungsaktivität bereits ihr Maximum erreicht haben könnte und eine weitere Steigerung aus zellbiologischen Gründen nicht möglich ist. Weiterhin könnte die Funktion von Wnt1 während der frühen Embryogenese durch Inhibitoren oder durch strikte Kontrolle der nachgeschalteten Signaltransduktion sehr stringent reguliert werden. Ein Überschuss an Wnt1 könnte in diesen Fällen die Proliferation nicht zusätzlich verstärken.

Ein sehr interessanter Befund ist, dass Wnt1 keine ektopische Proliferation in der MHR induzieren konnte. Wnt1 verstärkte die Zellteilungsaktivität in Regionen, in denen ohnehin Proliferation stattfand. So wird Wnt1 in 16 Tage alten Embryonen in weiten Teilen der sich entwickelnden inferioren colliculi und großen Teilen des ventralen Mittelhirns exprimiert. Dennoch wurde nur in der germinativen Zone des IC eine verstärkte Proliferation beobachtet. Weiterhin wird *Wnt1* in den transgenen Tieren über das normale Expressionszeitfenster hinaus exprimiert. Während *Wnt1* in wildtypischen Mäusen bereits pränatal nicht mehr exprimiert wird, findet in $En1^{+/Wnt1}$ Tieren *Wnt1* Expression bis in das Erwachsenenalter statt. In adulten Tieren konnten jedoch selbst nach mehrtägiger BrdU-Behandlung keine Zellteilungen in der MHR beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zudem wurden in adulten $En1^{+/Wnt1}$ keine Gehirntumoren festgestellt, was darauf hindeutet, dass durch ektopisches Wnt1 terminal differenzierte Zellen nicht wieder zu Zellteilungen angeregt werden können.

En1 wird während der späten Embryogenese und postnatal in der Vermis des Cerebellums in einem streifenförmigen Muster exprimiert. Kurz vor und nach der Geburt findet in der extragranulären Schicht des Cerebellums starke Proliferation statt. Da *Wnt1* in der Vermis von

En1$^{+/Wnt1}$ Tieren entsprechend der *En1* Expressionsdomäne streifenförmig exprimiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die leicht ondulierende Erscheinung dieser Schicht in den transgenen Tieren durch lokale Überproliferation derjenigen Zellen, in denen die *Wnt1*-Signaltransduktion ektopisch aktiviert wurde.

Cyclin D1 ist ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges, wie durch *in vitro* Studien gezeigt wurde (Tetsu, O. *et al.*, 1999; Shtutman, M. *et al.*, 1999). Außerdem wurde ein klarer Zusammenhang zwischen der Überexpression des Zellzyklusregulators *Cyclin D1* und verstärkter Proliferation und der Entstehung von Brusttumoren gezeigt (Wang, T. C. *et al.*, 1994). Auch in *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren findet eine verstärkte *Cyclin D1* Expression statt. In 16 Tage alten Embryonen ist die erhöhte Aktivität des *Cyclin D1* Gens jedoch auf die proliferativen Bereiche der MHR beschränkt. Dies könnte bedeuten, dass die Überaktivierung dieses Gens eine Folge der verstärkten Proliferation ist und somit nur indirekt von der ektopischen *Wnt1* Expression abhängt. In den IC adulter *En1*$^{+/Wnt1}$ Tiere, in denen keine Zellteilungsaktivität vorhanden ist, ist jedoch auch eine Überaktivierung des *Cyclin D1* Gens zu beobachten. Daher ist für adulte *En1*$^{+/Wnt1}$ Tiere die Erklärung, dass der Zellzyklusregulator lediglich aufgrund der erhöhten Proliferation überexprimiert wird, sicherlich unzutreffend. Daraus kann allerdings nicht zurückgeschlossen werden, dass dies auch während der Entwicklung nicht der Fall ist. Viel wahrscheinlicher ist, dass die zeitlichen Veränderungen der ektopischen Expression von *Cyclin D1* eine entwicklungs- bzw. altersabhängige Modulation der Responsivität der MHR auf das Wnt-Signal reflektieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Wnt1 ein Faktor ist, der die Proliferation teilungskompetenter neuraler Vorläuferzellen in der MHR verstärken kann, jedoch nicht in der Lage ist, terminal differenzierte Zellen zu erneuten Teilungen anzuregen. Diese Funktion von Wnt1 ist dosisabhängig und wird vermutlich durch verschiedene inhibitorische oder verstärkende Signale gewebespezifisch moduliert.

4.5 Wnt1 Signaltransduktion während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung

Wie bereits erwähnt gibt es mindestens drei verschiedene Wnt-Signaltransduktionswege. Die als klassischer, kanonischer oder auch als β-catenin-Signalweg bezeichnete Signalweiterleitung beruht auf der Interaktion von Wnt1 mit dem Frizzled/LRP Rezeptorkomplex und der Transduktion des Signals über einen zytoplasmatischen GSK3-β enthaltenden Multiprotein-komplex in den Zellkern. Der Übergang des Signals in den Zellkern wird durch die Stabilisierung und nukleäre Translokation von β-catenin vermittelt. Die Aktivität des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges kann daher an der intrazellulären Lokalisation von

β-catenin erkannt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ektopische Expression von *Wnt1* in der MHR zu einer Akkumulation von β-catenin in den Zellkernen von Neuronen in den inferioren colliculi führt. Der kanonische Wnt-Signalweg ist somit in der MHR aktivierbar. Der Ca^{2+}-Signaltransduktionsweg führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+}-Ionen. Die Aktivierung von PKC kann mit Hilfe eines phosphorylierungs-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Es konnte jedoch zwischen adulten $En1^{+/+}$ und $En1^{+/Wnt1}$ Mäusen keine differentielle Aktivierung der PKC in der MHR festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So konnte durch die konditionale Inaktivierung von β-catenin in der *Wnt1*-Domäne gezeigt werden, dass ein Phänotyp entstand, der dem von $Wnt1^{-/-}$ Mäusen entsprach (Brault, V. *et al.*, 2001). Auch die Inaktivierung von LRP6, dem Korezeptor für Wnts im kanonischen Wnt Signaltransduktionsweg, resultierte in einem vergleichbaren, wenn auch etwas abgeschwächten Mittel-/Hinterhirnphänotyp (Pinson, K. I. *et al.*, 2000). Dieses Ergebnis deutet weiterhin darauf hin, dass Wnt1 während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung in erster Linie endokrin wirkt, da parakrine Mechanismen nicht auf die Präsenz des Korezeptors angewiesen wären. Zusammengenommen kann gesagt werden, dass der kanonischen Wnt-Signaltransduktionskaskade eine wesentliche Bedeutung während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung zukommt.

4.6 Teilweise Aufhebung des *En1-Knockout* Phänotyps durch ektopische Expression von *Wnt1*

Der Mittel-/Hinterhirn-Phänotyp von $En1^{-/-}$ und $Wnt1^{-/-}$ Mäusen ist sehr ähnlich und besteht vor allem aus einem teilweisen oder völligen Verlust der colliculi und des Cerebellums (McMahon, A. P. *et al.*, 1990; Thomas, K. R. *et al.*, 1990; Wurst, W. *et al.*, 1994). Nachdem gezeigt wurde, dass die Expression von *En1* in *Wnt1 Knockout*-Mäusen zwar induziert wird, nicht aber erhalten bleibt (McMahon, A. P. *et al.*, 1992), lag die Vermutung nahe, dass eine der Hauptfunktionen von *Wnt1* die Aufrechterhaltung der *En1* Expression sein könnte. Durch ein Experiment, in dem *En1* anstelle von *Wnt1* in der *Wnt1* Expressionsdomäne exprimiert wurde, konnten zusätzliche Hinweise für die Richtigkeit dieser Hypothese gewonnen werden (Danielian, P. S. *et al.*, 1996). Diese transgenen Tiere zeigten während der frühen Embryonalentwicklung eine teilweise Aufhebung des *Wnt1-Knockout*-Phänotyps. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Mausmodell konnte das Umkehrexperiment durchgeführt werden, nämlich die Expression von *Wnt1* anstelle von *En1* in der *En1* Expressionsdomäne. Verblüffenderweise zeigten $En1^{Wnt1/Wnt1}$ Mäuse tatsächlich eine Aufhebung des Mittel-/Hinterhirnphänotyps, der bei einem völligen Verlust von

En1 zu erwarten wäre. Zwar sind die *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Mäuse nicht lebensfähig, doch werden die Tiere geboren und besitzen sowohl ein Mittelhirn als auch ein Cerebellum. Das Mittelhirn ist entsprechend der erhöhten Wnt1-Dosis erheblich vergrößert, doch konnte an Gewebeschnitten gezeigt werden, dass sowohl die colliculi als auch das Cerebellum vorhanden waren. Die Störungen in der Musterbildung der Extremitäten konnte durch Überexpression von *Wnt1* nicht aufgehoben werden. *En1*$^{Wnt1/Wnt1}$ Tiere wiesen genau wie *En1*$^{-/-}$ Tiere eine Dorsalisierung der Pfoten auf. Außerdem kam es häufig zu Fusionen von Fingern oder zu der Entstehung von zusätzlichen Fingern. Auch die Missbildungen des Sternums wurden nicht aufgehoben. Eine Reduktion der Wnt1-Dosis wurde durch Einkreuzen eines *En1 Knockout*-Allels erzielt. Die *En1*$^{lacZ/Wnt1}$ Mäuse zeigten einen sehr variablen Phänotyp, von einer schwachen Reduktion bis hin zu einem weitgehenden Verlust der MHR. Eine Aufhebung des *Knockout*-Phänotyps wurde bei dieser geringeren Wnt1 Dosis nicht oder nur ansatzweise erreicht. Die unterschiedlich starke Ausprägung des Phänotyps hing wahrscheinlich mit dem variablen genetischen Hintergrund der Elterntiere zusammen. Die *En1 Knockout*-Mauslinie befand sich auf dem genetischen Hintergrund des CD1-Stammes, während die *En1*$^{+/Wnt1}$ Tiere einen C57Bl/6N-Hintergrund aufwiesen. Die Nachkommen aus Verpaarungen dieser beiden Mauslinien hatten daher keinen definierten genetischen Hintergrund, so dass betimmte Gene, sogenannte *Modifier*, den Phänotyp unterschiedlich stark beeinflussen konnten.

Eine Möglichkeit, warum es bei hoher Wnt1 Dosis zu einer Aufhebung des *En1*$^{-/-}$ Phänotyps kommt, könnte eine verstärkte Aktivierung des *En2* Gens sein. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass ein Verlust von *En1* durch eine Überexpression von *En2* zu weiten Teilen kompensiert werden kann (Hanks, M. *et al.*, 1995), sowie dass in Hühnerembryonen *En2* Expression durch ektopisches *Wnt1* induziert werden kann (Sugiyama, S. *et al.*, 1998). Auch Reporter-Experimente mit dem *En2* Promotor von *Xenopus* deuten auf eine direkte Aktivierbarkeit des *En2* Gens durch Wnt Signaltransduktion (McGrew, L. L. *et al.*, 1999). Da *En1* und *En2* während der frühen Embryonalentwicklung sehr ähnliche Expressionsdomänen haben, könnte die Überaktivierung von *En2* durch *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryonen nicht sichtbar gemacht werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Aufhebung des *En1 Knockout*-Phänotyps durch *Wnt1* Überexpression besteht darin, dass die beiden Gene gleiche oder ähnliche Zielgene regulieren könnten. Da bisher für *En1* nur sehr wenige Zielgene bekannt sind, sind weitere Studien erforderlich, um diese Hypothese zu testen.

4.7 Ektopisches Wnt1 beeinflußt das neuronale Zellgrößenwachstum

Eine unerwartete und erstaunliche Beobachtung war die Tatsache, dass viele Neurone in den inferioren colliculi adulter *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse signifikant vergrößerte Zellkörper aufwiesen. Die Größenzunahme erfolgte graduell und wurde ab einem Alter von drei Monaten sichtbar. Die Größenzunahme betraf Neurone, nicht aber Gliazellen. Eine Erklärung hierfür bietet die Beobachtung, dass auch nur in Neuronen adulter *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse nukleäre Lokalisation von β-catenin beobachtet werde konnte. Dies bedeutet, dass in den IC adulter Mäuse vermutlich nur die Neurone in der Lage sind, das Wnt-Signal auf dem klassischen Wnt-Signaltransduktionsweg weiterzuleiten.

Ein klarer Zusammenhang zwischen deregulierter Wnt Signaltransduktion und der Entstehung verschiedener Krebsformen gilt mittlerweile als gesichert. Vor allem Brust- und Darmkrebs werden mit deregulierten Wnt-Signalwegkomponenten in Verbindung gebracht (Nusse, R., 1992; Polakis, P. *et al.*, 1999; Bienz, M. *et al.*, 2000; Polakis, P., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Wnt1 zwar die Proliferation von neuralen Vorläuferzellen verstärkt, jedoch wurde in keinem der untersuchten adulten Tiere ein Gehirntumor festgestellt. Tumorzellen weisen häufig eine veränderte Größe und Morphologie im Vergleich zu gesunden Zellen auf. Diese Erklärungsmöglichkeit für die Größenzunahme der Neurone kann jedoch ausgeschlossen werden, da in keinem Fall tumorartige Gewebeveränderungen in den vergrößerten IC festgestellt wurden. Die vergrößerten Neurone wiesen zudem keine Immunreaktivität gegen verschiedene Tumormarker (Vimentin, Nestin, GFAP) auf. Weiterhin konnte unter Verwendung eines durchflusszytometrischen Verfahrens gezeigt werden, dass die Zellen aus den IC der adulten *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse normalen DNA-Gehalt hatten. Dies ist eine wichtige Beobachtung, da einerseits Tumorzellen häufig Aneuploidien aufweisen und andererseits eine Vergrößerung von Zellen durch einen erhöhten DNA-Gehalt verursacht werden kann (Santamaria, P., 1983; Henery, C. C. *et al.*, 1992).

Die großen Neurone waren TUJ1 und Neurofilament-positiv und hatten synaptische Kontakte, wie elektronenmikroskopisch und durch Synaptophysin-Färbungen gezeigt wurde. Weiterhin konnten durch elektronenmikroskopische Betrachtung der Riesenzellen keine pathologischen Veränderungen wie ungewöhnliche Vesikel oder Membranstrukturen oder pathologisch veränderte Zellorganellen entdeckt werden.

In einigen menschlichen Krankheiten kommt es zu einer Vergrößerung von Neuronen, wie z.B. bei der fokalen kortikalen Dysplasie. Es wurde eine Verbindung zwischen der Vergrößerung der Zellen und einer Störung in der Aktivität von Wnt-Signalkomponenten hergestellt (Cotter, D. *et al.*, 1999). Der Befund vergrößerter Neurone in den IC von adulten *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen steht

in Einklang mit der Annahme, dass Wnt Signaltransduktion in die Entstehung der fokalen kortikalen Dysplasie involviert sein könnte, doch sollte nicht unerwähnt bleiben, dass es sich hier um eine reine Korrelation zu dem Krankheitsbefund handelt und eine tatsächliche Verbindung noch nachgewiesen werden muss.

Eine einleuchtende Erklärung für die kontinuierliche Vergrößerung der Zellen in den *En1*$^{+/Wnt1}$ Tieren scheint die Wachstums-Hypothese zu sein, nach der *Wnt1* das Größenwachstum der betroffenen Zellen verstärkt. Ein durch die *Wnt1* Überexpression bewirkter Eingriff in den Stoffwechsel der betroffenen Zellen könnte zu einem erhöhten Anabolismus führen, der über einen längeren Zeitraum das Größenwachstum der Zelle verursachen könnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Ursachen zu der Vergrößerung der Neurone beitragen, z.B. könnten auch die Epilepsie-ähnlichen Anfälle Auswirkungen auf die Zellmorphologie der Neurone haben. Da die Ballon-artigen Neurone jedoch nur in der Region beobachtet wurden, in der auch *Wnt1* überexprimiert wurde, epileptische Anfälle aber in der Regel große Teile des Gehirns betreffen, kann diese Erklärung als unwahrscheinlich angesehen werden. Als Ursache wäre auch eine Umstrukturierung des Zytoskeletts denkbar.

Es ist nicht viel über die genetische Kontrolle des Zellwachstums bekannt. Allerdings scheinen Zellwachstum und Zellproliferation eng miteinander verbundene Prozesse zu sein. Dieser Zusammenhang wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.8 Die Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation während der Mittel- / Hinterhirnentwicklung

Zellwachstum und Zellproliferation sind zwei unterschiedliche Prozesse, die jedoch oftmals eng miteinander verflochten sind und von wechselseitigen Steuerungsmechanismen reguliert werden. In *Drosophila melanogaster* konnte jedoch durch experimentelles Ausschalten oder Überaktivieren bestimmter Gene gezeigt werden, dass die beiden Prozesse voneinander entkoppelt werden können. So führte die Überaktivierung von *dE2F* in den Imaginalscheiben zu beschleunigten Zellteilungen, ohne dass das Zellwachstum im gleichen Maße verstärkt wurde, wodurch viele kleine Zellen entstanden. Tiere, in denen *CHICO*, das *Drosophila* homolog zu *Insulinrezeptor-Substrat* (*IRS 1-4*) von Wirbeltieren, oder *Drosophila S6-Kinase* (*dS6K*) inaktiviert worden waren, hatten eine verlangsamte Entwicklung und wuchsen zu stark verkleinerten Fliegen, die sich aus kleinen Zellen zusammensetzten, heran (Bohni, R. *et al.*, 1999; Montagne, J. *et al.*, 1999). Andererseits inhibierte die Überaktivierung von *dRBF* Zellteilungen, ohne das Wachstum zu blockieren – es entstanden wenige große Zellen (Neufeld,

T. P. *et al.*, 1998b). Die Inaktivierung von PTEN führte zu einer Vergrößerung von Neuronen (Kwon, C. H. *et al.*, 2001; Backman, S. A. *et al.*, 2001).

Während es sich bei dE2F und dRBF um antagonistisch wirkende Zellzyklusregulatoren handelt, sind CHICO/IRS, PTEN und S6K Teil des Insulin/PI3-Kinase Signaltransduktionsweges (Coelho, C. M. *et al.*, 2000). Die Insulin/PI3K-Signaltransduktion beeinflußt die Translation von 5'TOP mRNAs (Dufner, A. *et al.*, 1999). Das sind mRNAs, die einen Oligopyrimidin-Bereich an ihrem Transkriptionsstartbereich aufweisen und für Proteine des Translationsapparates wie ribosomale Proteine und Translations-Elongationsfaktoren kodieren.

In Säugetierzellen scheinen Zellwachstum und Zellteilung noch enger gekoppelt zu sein. Es wird angenommen, dass in der Regel Zellteilungen erst nach Erreichen einer kritischen Zellgröße erfolgen (Conlon, I. *et al.*, 1999). Dennoch konnte *in vitro* durch Überexpression von Zellzyklusinhibitoren eine Trennung von Zellgrößenwachstum und Zellzyklusprogression auch in Säugetierzellen erreicht werden (Fingar, D. C. *et al.*, 2002). Außerdem wurde berichtet, dass der Wachstumsfaktor GGF (*glial growth factor*) isolierte Ratten-Schwann-Zellen zu Zellteilungen anregen konnte, ohne gleichzeitig das Zellwachstum zu stimulieren (Conlon, I. J. *et al.*, 2001).

In Säugetieren scheinen *Target of Rapamycin* (*mTOR*) sowie die von *mTOR* regulierten *S6-Kinase* (*S6K)* und der *eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4E* (*eIF4E)* wichtige Regulatoren der Zellgröße zu sein (Fingar, D. C. *et al.*, 2002), und eine Untersuchung der Induktion bzw. Aktivität dieser Faktoren in $En1^{+/Wnt1}$ Tieren könnte Aufschluß über den Mechanismus liefern, durch den Wnt1 das Zellwachstum stimuliert.

Interessanterweise führen sowohl die Aktivierung des Wnt Signalweges als auch die Aktivierung der Insulin/PI3K-Signaltransduktion zu einer Abnahme der Glykogen-Synthase Kinase 3β (GSK3β) Aktivität. Obwohl die Regulation der GSK-3β auf verschiedenen Mechanismen beruht (Ding, V. W. *et al.*, 2000), könnte die Überlappung der beiden Signalwege und damit deren Einfluss auf die Zellgröße auf Ebene dieser Kinase stattfinden. Weitere Studien sind notwendig, um den Einfluss von *Wnt1* auf das Wachstum von Zellen sowie mögliche Interaktionen zwischen den Wnt Signaltransduktionswegen, *mTOR* und dem Insulin-Signalweg aufzudecken.

c-myc wurde als Zielgen des Wnt Signaltransduktionsweges identifiziert (He, T. C. *et al.*, 1998) und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Zellgröße in Wirbeltieren (Schuhmacher, M. *et al.*, 1999; Piedra, M. E. *et al.*, 2002). Allerdings scheint *c-myc* nicht die Ursache für die vergrößerten Neurone in $En1^{+/Wnt1}$ Tieren zu sein, da durch *in situ* Hybridisierungen keine

verstärkte Aktivität dieses Gens in der MHR nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.9 Modell zur Funktion von Wnt1 während der Mittel- / Hinterhirnentwicklung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ektopisches Wnt1 während der Embryogenese die Proliferation in der sich entwickelnden dorsalen Mittelhirnregion erhöht. Weiterhin konnte durch BrdU-Inkorporationsexperimente gezeigt werden, dass dieser Effekt wenigstens teilweise auf zellzyklusverkürzende Wirkung von *Wnt1* auf neurale Vorläuferzellen zurückzuführen ist. Die Induktion von *Cyclin D1* während der Entwicklung und in den IC adulter Tiere deutet jedoch darauf hin, dass Wnt1 zusätzlich eine Funktion in Bezug auf die Zellzyklusmaschinerie ausüben könnte.

Eine mit der verstärkten Zellteilungsaktivität einhergehende deutliche progressive Verkleinerung der Zellen konnte nicht beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass *Wnt1* während der Entwicklung das Zellwachstum anregt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich die Zellgröße von Neuronen in den IC adulter Tiere mit fortschreitendem Alter vergrößert. Die zu diesem späten Zeitpunkt auftretende Entkopplung von Zellwachstum und Zellteilung ist höchst wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ausdifferenzierte Neurone, die Dendritenbäume und Axone ausgebildet haben, nicht mehr teilungskompetent sind und selbst mit induzierter Zellzyklusmaschinerie vermutlich keine Mitosen mehr durchführen könnten. Die Größenzunahme der Neurone ist ein Hinweis auf eine wachstumsstimulierende Funktion von Wnt1. Dass dieser Effekt auf Neurone beschränkt ist, kann dadurch erklärt werden, dass in den Gliazellen der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg nicht aktiviert werden kann, wie an der fehlenden nukleären Lokalisation von β-catenin in Gliazellen gezeigt werden konnte. In Abbildung 32 ist die aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten abgeleitete Hypothese zu der Funktion von Wnt1 während der Mittel-/Hinterhirnentwicklung noch einmal in einem Modell dargestellt. Die normale Dosis von Wnt1 verstärkt das Zellwachstum in der Region auf solche Weise, dass eine normale Gewebegröße erreicht wird (Abbildung 32 A). Neben der wachstumsfördernden Funktion hält Wnt1 in der frühen Entwicklung auch die Expression von Genen, die für die Aktivität des MHO notwendig sind, aufrecht, und ist an der Feinregulation der Genexpression von Markergenen beteiligt. Durch die verstärkte Expression von Wnt1 in der MHR von *En1*$^{+/Wnt1}$ Embryonen kommt es vor allem im dorsalen Mittelhirn zu einer Verkürzung der Zellzykluslänge sich teilender Vorläuferzellen, die vermutlich auf ein durch Wnt1 hervorgerufenes beschleunigtes Zellwachstum zurückzuführen ist (Abbildung 32 B). Eine zellteilungsinduzierene, also

mitogene Aktivität von Wnt1 könnte allerdings zu dem beobachteten Phänotyp beitragen. Neurone in den Gehirnen adulter, wildtypischer Mäuse sind postmitotisch und weisen kein Größenwachstum auf (Abbildung 9 C). In adulten *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäusen konnte jedoch ein zwar langsames, jedoch deutliches Größenwachstum der Neurone im dorsalen Mittelhirn beobachtet werden. Die Vergrößerung der Neurone in dem Mittelhirn adulter Tiere kann ebenfalls durch eine zellwachstumsfördernde Wirkung von Wnt1 erklärt werden (Abbildung 32 D).

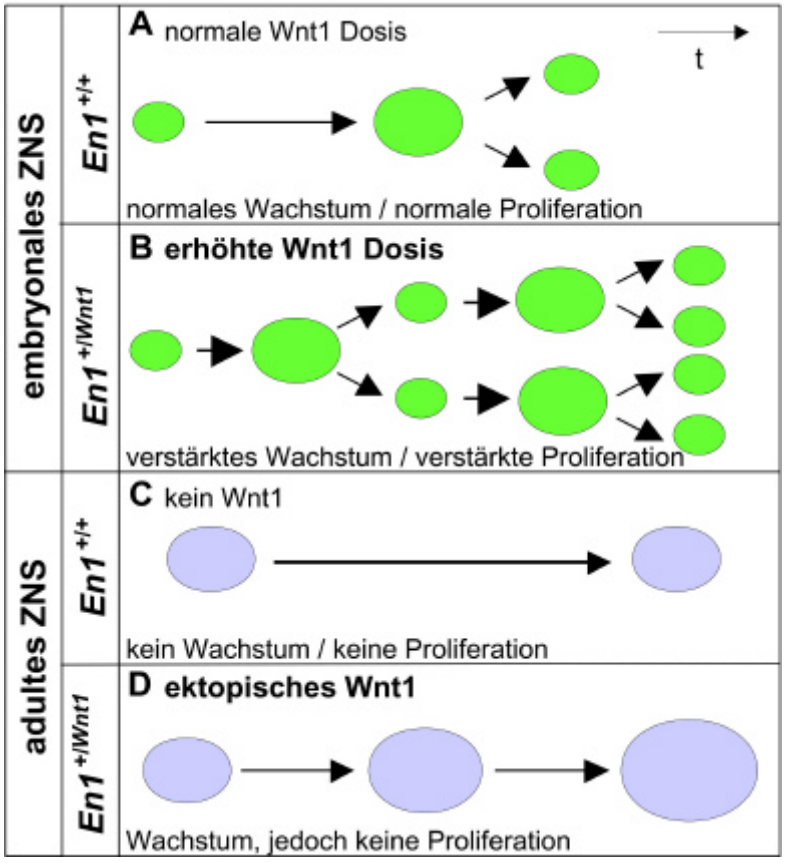

Abbildung 32: Modell zur mitogenen und wachstumsfördernden Funktion von Wnt1 während der Entwicklung und in adulten Tieren. Die Wnt1 Dosis in wildtypischen Tieren führt während der Entwicklung der Mittel-/Hinterhirnregion zu normalem Wachstum und normaler Proliferation (A). Durch ektopische Expression von Wnt1 kommt es zu einer Verkürzung der Zellzykluslänge, die auf ein beschleunigtes Zellwachstum zurückschließen läßt (B). In der Mittel-/Hinterhirnregion von adulten wildtypischen Tieren wird kein Wnt1 exprimiert (C). Durch ektopische Expression von Wnt1 kann jedoch in adulten Tieren neuronales Zellwachstum angeregt werden, das zu progressiv größer werdenen Zellkörpern führt. Die terminal differenzierten Neurone von aldulten Tieren lassen sich jedoch nicht wieder zu Zellteilungen anregen (D).

5 Material

5.1 Geräteliste

Analysewaage	Sartorius, Basic 210-S
Autoklav	Varioklav, Typ 400
Autoradiografiekassetten	Amescham, Hypercassette
Cryostat	Mikrom, 560
Transmissions-Elektronenmikroskop	Zeiss, EM10CR
Elektrophoresekammer (DNS)	MWG-Biotech
Elektrophorese-Netzgeräte	Consort, E443
	Neolab, EL250-90
Elektroporationsgeräte	Biorad, Gene Pulser II (Pulse Controller + Capacity Extender)
Entwicklungsmaschine	Agfa, Curix 60
Evaporatorzentrifuge	Uniequip, Univapo 100H, Unijet II Refrigerated Asperator
Flockeneisautomat	Scotsman, AF 200
Flüssigstickstofftank	MVE Cryogenics, XLC 230
Gefrierschränke (-20°C)	Quelle, Privileg Öko
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus HFU 686 Plus-V14
Geldokumentationsanlage	Herolab (UVT-28M ; ICU1; SU1)
Glaspipetten	Hirschmann
Heizer/Magnetrührer	Ika, RCT basic
Hybridisierungsöfen	MWG-Biotech, Mini 10
	PeqLab, HB-1000
Inkubationsschränke	Memmert, UM 400 und BM 600
Inkubationsschränke (ES-Zellen)	BB6220 (Heraeus)
Kamerasystem	Fuji, Fujifilm HC2000
Kühlschränke (4°C)	Quelle, Privileg
Laborglaswaren	Schott
Mikroschmiede	Bachofer Laboratoriumsgeräte
Mikroskop, inverses	Leica DM-IL
Mikroskope	Leica DNRB
	Leica MZ Apo
	Leica Labovert FS

Mikroskope (Fortsetzung)	Samsung, TDS
	Zeiss AxioZeiss
	Zeiss Axioplan L
	Zeiss Axiolab
Mikrowellengerät	AEG, Micromat
Neubauer-Zählkammer	Brand
Orbitalschüttler	Heidolph, Polymax 1040
	Clay Adam Brand, Nutator
Paraffin-Einbettvorrichtung	Miles Scientific, Tissue Tek
PCR-Geräte	Eppendorf, Master Cycler Gradient
pH-Meßgerät	WTW, pH537
Photometer	Pharmacia, Genequant
Pipettierhilfe	Hirschmann, Pipetus akku
Präzisionspipetten	Witeg, Witoped digital 20, 200, 1000
Präzisionswaage	Sartorius, LC 6201S
Reinstwasser-Aufbereitungsanlage	Millipore, Milli-Q biocel
Schüttler	Braun, Certomat S (für Bakterienkulturen)
	Ika, HS250 basic
Szintilationsmeßgerät	Beckmann-Coulter
Spektrometer	Kontron Biotek
Stereolupe	Leica, Wild M10, M8, MZ8, MZ Apo
Sterilbänke	Nunc, Microflow 51424
Thermomixer	Eppendorf, S436; comfort
Ultramikrotom	Leica RM 2155
UV-DNA/RNA-Crosslinker	Stratagene, UV Stratalinker 1800
Vortex	Ika, Janke u. Kunkel, Vibrofix VF1 Electronic
Wasserbäder	Heto Holten, SBD 50
Zellsortierer	FACSstar^{+} (Becton-Dickinson)
Zentrifugen	Sorvall, RC5C Plus
	Heraeus, Varifuge 3.0R; Biofuge Pico
	Hettich, Universal 30F, EBA 12
Zerfallsmeßgerät (Isotopenzähler)	Scotlab, Easicount 4000

5.2 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma
Gelatine	BDH
Geneticin (G418)	Gibco Life Technologies
Glutamin	Gibco Life Technologies
LIF	Chemicon International
Mitomycin C (MMC)	Sigma
[α-thio^{35}S]-UTP	NEN, Kat.-Nr.: NEG-039H
5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)	Sigma, Roche
Agarose (f. Gelelektrophorese)	Gibco Life Technologies, Biozym
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumnitrat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Ampuwa	Fresenius
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bromphenolblau	Sigma
Deoxycholat	Sigma
Digoxigenin-11-uridin-5´-triphosphat (DIG-11-UTP)	Roche
Dithiotreitol (DTT)	Stratagene
DMSO	Sigma
dNTP (100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	MBI
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Essigsäureanhydrid	Merck
Ethanol abs.	Merck
Ethidiumbromid	ICN
Ethylenglykol	Sigma
Formamid	J.T. Baker
Gelatine	Fluka, BDH
Glucose	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Sigma

Hefeextrakt	Difco
Heparin	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumferricyanid ($K_3Fe(CN)_6$)	Sigma
Kaliumferrocyanid ($K_4Fe(CN)_6 \bullet 3H_2O$)	Sigma
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma
Levamisol	Sigma
Magnesiumchlorid ($MgCl_2 \bullet 4H_2O$)	Merck
Methanol	Merck
Mineralöl	Sigma
Natriumacetat (NaOAc)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumphosphat ($NaH_2PO_4 \bullet H_2O$, Na_2HPO_4)	Sigma
Nonidet P40 (NP-40)	USB / Amersham
P^{32}-dCTP	Amersham
Paraplast X-tra	Sigma
Polyethylenglycol (PEG 8000)	Sigma
Pyridin	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA, 20 mg/ml)	MBI
Salzsäure (HCl)	Merck
Sarcosyl (N-Lauroylsacosine)	Sigma
Spermidine	Sigma
Silbernitrat	Sigma
Sucrose	Sigma
Temed (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin)	Sigma
Triethanolamin	Merck
Tris (Trizma-Base)	Sigma

Triton-X 100	Biorad
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	J.T. Baker
Wolframkieselsäure	Sigma
XGal	Peqlab
Xylol	Merck

5.3 Verwendete Baukastensysteme

ABC-Kit	Vectastain
DNA Maxi Prep Kit	Qiagen
DNA Mini Prep Kit	Qiagen
ECL Detection Kit	Amersham
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham
Gel Extraction Kit	Qiagen
In Situ Cell Death-Detection-Kit	Promega
In Situ Cell Proliferation Kit FLUOS	Roche
Megaprime DNA Labeling Kit	Amersham
MOM-Kit	Vectastain
PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini, Midi Kit	Qiagen

5.4 Allgemein verwendete Lösungen und Stammlösungen

10 x TBS	1 M	Tris-HCl pH 7,5
	1,5 M	NaCl
20 x SSC (*Saline Sodium Citrate*)	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
	pH mit 1 M HCl auf 7,0 einstellen.	
4% Paraformaldehydlösung (PFA)	4%	PFA w/v in PBS
50 x TAE	2 M	Tris-Acetat
	0,05 M	EDTA
Lysispuffer (*Tailbuffer*)	50 mM	KCl
	10 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	0,1 mg/ml	Gelatine
		in H_2O
	autoklavieren. Vor Verwendung zugeben:	
	0,45%	Nonidet P-40

	0,45%	Tween 20
	500 µg/ml	Proteinase K
TBS-T	1 x	TBS
	0,1%	Tween 20
1 x PBS pH 7.2	171 mM	NaCl
	3,4 mM	KCl
	10 mM	Na_2HPO_4
	1,8 mM	KH_2PO_4
Tris – HCl pH 7.0 ; 7.5 ; 8.0 ; 9.5	1 M	Tris base
	pH mit HCl einstellen	

5.5 Lösungen für die Southernblot Analyse

Denaturierungslösung	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Depurinierungslösung	0,2 M	HCl
Hybridisierungspuffer	0,5 M	Natriumphosphatpuffer pH 7,2
	7%	SDS
Neutralisierungslösung	0,5 M	Tris pH 7,4
	1,5 M	NaCl
Strip-Lösung	0,1 x	SSC
	1%	SDS
	15mM	NaCl
Waschlösung I	2 x	SSC
	0,1%	SDS
Waschlösung II	1 x	SSC
	0,1%	SDS
Waschlösung III	0,5 x	SSC
	0,1%	SDS

5.6 Lösungen für den Umgang mit Bakterien

LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g	Bacto-Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1 l	H_2O
	ggf. Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin	
LB-Agar	98,5%	LB-Medium
	1,5%	Bacto-Agar

TSB-Lösung	85%	LB-Medium
	10%	Polyethylenglycol (PEG-3000)
	5%	DMSO
	10 mM	$MgCl_2$
	10 mM	$MgSO_4$

5.7 Zellkultur – Medien und Medienzusätze

DMEM (Dulbeco's modified eagle medium)	Gibco Life Technologies	
Einfriermedium (2 x)	50%	FCS
	30%	ES-Zellkulturmedium
	20%	DMSO
ES-Zellkultur Medium (zwei Wochen verwendbar)	85%	DMEM
	15%	FCS
	2 mM	Glutamin
	1000 U/ml	LIF
FCS ES qualified (Fötales Kälberserum), hitzeinaktiviert (30 min bei 56°C)	Gibco Life Technologies	
Lysispuffer (für Mini-Southernblot)	10 mM	Tris HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA pH 8,0
	10 mM	NaCl
	0,5%	Sarcosyl
	1 mg/ml	Proteinase K (unmittelbar vor der Verwendung
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	Gibco Life Technologies	
PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}	Gibco Life Technologies	
Trypsinlösung (0,05% in Tris/EDTA-Puffer)	ICN	
Wasch-Medium	90%	DMEM
	10%	FCS

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

10 % Blocklösung (ISH)	10%	Ziegenserum (Sigma)
	90%	TBST (ISH)
4% Paraformaldehydlösung (PFA)	4 g	PFA
	100 ml	DEPC-behandeltes PBS
	PFA bei 60°C lösen; pH 6,5-7,5 einstellen (HCl)	
APB (Alkalische Phosphatasepuffer)	100 mM	NaCl
	50 mM	$MgCl_2$

	100 mM	Tris-HCl (pH 9,5)
	0,1%	Tween 20
		in H_2O (Ampuwa)
DEPC-H_2O	0,01%	DEPC in H_2O
	ü.N. bei 37°C Schwenken; 3 x 20 min autoklavieren	
Färbelösung (ISH)	2 mM	Levamisol
	0,1%	Tween 20
		in BM-Purple Substrat (Roche)
	vor Verwendung 5 min bei 1200 x g zentrifugieren; nur Überstand verwenden	
Heparin-Stocklösung	100 mg/ml	in 4 x SSC; Lagerung bei –20°C
Hybridisierungspuffer	50%	Formamid
	25%	20 x SSC
	25%	DEPC-H_2O
	0,1%	Tween 20
	0,05%	Heparin-Stocklösung
	pH 6 einstellen (1 M Zitronensäure)	
PBT	0,1%	Tween 20 in PBS
PFA/GA/PBT	4%	PFA (w/v)
	0,2%	Glutaraldehyd
		in PBT; pH 6-7 einstellen (HCl)
PK-Lösung	20 mM	Tris (pH 7,0)
	1 mM	EDTA (pH 8,0)
RIPA-Lösung	0,05%	SDS (w/v)
	150 mM	NaCl
	1%	Nonidet P40
	0,5%	Deoxycholat (w/v)
	1 mM	EDTA (pH 8,0)
	50 mM	Tris (pH 8,0)
		in DEPC-H_2O
SSC/FA/Tween	50%	Formamid
	10%	20 x SSC
	40%	DEPC-H_2O
	0,1%	Tween 20
10 x TBS (ISH)	250 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1,4 M	NaCl
	26 mM	KCl
TBST (ISH)	0,1%	Tween 20 in 1 x TBS

5.9 Lösungen für die RNA *in situ* Hybridisierung an Paraffinschnitten

Ammoniumacetat-Stocklösung	3 M	NH_4OAc
5 x NTE-Puffer	0,5 M	NaCl
	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	5 mM	EDTA (pH 8,0)
	autoklavieren	
Triethanolamin-Puffer	0,1 M	Triethanolamin
	pH mit HCl auf etwa 8,0 einstellen	

5.10 Lösungen für die Myelinfärbung nach Gallyas

Pyridin / Essigsäureanhydridlösung	2 Vol Pyridin 1 Vol Essigsäureanhydrid Die Lösung sollte mind. 4 Stunden vor Verwendung angesetzt werden.
Inkubationslösung	12,5 mM Ammoniumnitrat 6 mM Silbernitrat pH mit NaOH-Lösung auf 7,5 einstellen Lösung vor Verwendung für einen Tag bei RT im Hellen lagern, dann zwei Tage bei RT im Dunkeln lagern. Die Lösung ist eine Woche haltbar.

<u>Entwickler</u>

Komponente A	470 mM Natriumkarbonat
Komponente B	12 mM Silbernitrat 25 mM Ammoniumnitrat 3,5 mM Wolframkieselsäure
Komponente C	12 mM Silbernitrat 25 mM Ammoniumnitrat 3,5 mM Wolframkieselsäure 0,7% 37%ige PFA-Stammlösung
Entwickler	10 Vol Komponente A 7 Vol Komponente B 3 Vol Komponente C wichtig: in der angegebenen Reihenfolge zugeben.

5.11 Lösungen für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Lösung I	10 mM NaCl 3,4 mM Natriumcitrat

	10 µg/ml	RNase A
	0,03%	NP-40
Lösung II	71,4 µM	Zitronensäure
	0,25 M	Saccharose
Propidiumiodid-Stammlösung	1 mg/ml	Propidiumiodid

5.12 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Shrimp alkaline phosphatase, USB
Klenow-Polymerase	Amersham
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme	Roche, MBI
RNA Polymerasen (SP6, T7, T3; 20 U/µl)	Roche
RNase A	Serva
RNase I	Roche
T4 DNS-Ligase	Roche
Taq Polymerase	MBI

5.13 Antikörper

α-β-catenin (Verdünnung 1:50) monoklonal, Maus IgG (Klon 14)	Beckton Dickinson
α-BrdU Antikörper monoklonal, Maus (Klon BMG 6H8)	Roche
α-Calbindin-D28k (Verdünnung 1:1000) polyklonal, Kaninchen	Swant Swiss Antibodies
α-Calretinin (Verdünnung 1:1000) polyklonal, Kaninchen α Mensch	Swant Swiss Antibodies
α-Digoxigenin-Antikörper, gekoppelt an AP, Fab fragment (Verdünnung 1:5000)	Roche
α-GFAP polyklonal, Taube α Mensch	Santa Cruz
α-GFAP (Verdünnung 1:2000) polyklonal, Kaninchen α Kuh	Dako
α-Maus-Ig-Fluorescein aus Schaf	Roche
α-Nestin	Beckton Dickinson

monoklonal (Klon Rat401), Maus α Ratte	
α-Neurofilament 70/200 kD (Verdünnung 1:200)	Dako
monoklonal (Klon 2F11), Maus α Mensch	
α-Pan-GSK3β (Verdünnung 1:1000)	Upstate Biotechnology
monoklonal IgG, Maus α Fliege	
α-Parvalbumin (Verdünnung 1:1000)	Swant Swiss Antibodies
polyklonal, Kaninchen α Ratte	
α-Phospho-GSK3β (Ser9; Verdünnung 1:1000)	New England Biolabs
polyklonal, Kaninchen	
α-phosphorylated PKC (Verdünnung 1:500)	Upstate Biotechnologies
α-Synaptophysin (Verdünnung 1:20)	Roche
monoklonal (Klon Sy38), Maus α Rind	
α-Vimentin	Dako
monoklonal (Klon V9), Maus α Schwein	
TuJ1 (Verdünnung 1:2000)	RDI
polyklonal, Kaninchen α Ratte	

5.14 Lösungen für die Immunhistochemie

ABC-Reagenz	99,3% PBS 0,33% Reagenz A 0,33% Reagenz B
AK1-Lösung	90% PBS 10% FCS + primärer Antikörper in optimaler Verdünnung (ausgetestet, z.B. 1:500)
AK2-Lösung	90% PBS 10% FCS + sekundärer Antikörper (z.B. biotinylierter α-Maus IgG, Verdünnung 1:250)
Blocklösung	89,95% PBS 10% FCS 0,05% Triton-X 100
DPX	BDH

Einbettmedium (Gefrierschnitte)	Leica Jung, Cat. # 020108926
Kryoprotektionslösung	Glycerin : Ethylenglykol : PBS in einem Volumenverhältnis von 1:1:2
Kresylviolett-Färbelösung	2,5 g Kresylviolett 0,102 g Natriumacetat 1,55 ml Essigsäure ad 500 ml H_2O vor Gebrauch filtrieren

5.15 Lösung zur *in vivo* Markierung proliferierender Zellen mit BrdU

BrdU Markierungsreagenz	1% (w/v) 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) 50 mM NaOH in einer 0,9%igen (isotonischen) NaCl-Lösung.

5.16 Zelllinien

R1	Murine embryonale Stammzellinie aus der Sublinie (129/Sv ´ 129/SvJ)F1 (Nagy, A. *et al.*, 1993)

5.17 *E.coli* Bakterienstämme

DH5α	Gibco Life Technologies
DM1 (dam-negativ)	Gibco Life Technologies

5.18 Vektoren und Plasmide

5.18.1 Gentargeting-Vektoren

Plasmidname	Konstrukt von	Beschreibung/Referenz
En1-3' Shuttle vector	M. Hanks *et al.*	Größe 15,8 kb (Hanks, M. *et al.*, 1995)
ESEN1	J. Guimera	enthält *En1* 700 bp 3' externe Sonde für Southernblot (*EcoRI* / *HindIII* Fragment)
IRES-lacZ vector	A. Mallamaci	enthält das *lacZ* Gen und eine Interne Ribosomen-Eintritsstelle

pBSKS(+)Wnt1	M. Wassef	pBS KS(+) Vektor mit *HindIII* / *XbaI* Fragment der Maus *Wnt1* mRNA
SC1	W.Wurst	enthält *En1* 1,2 kb 5'Sonde für Southernblot (*SacI*-Fragment)

5.18.2 Plasmide zur Herstellung von RNA-Sonden

Plasmidname	Konstrukt von	Beschreibung/Referenz
c-myc	R.N. Eisenman / K. Marcu	1,4 kb cDNA Fragment von Maus *c-myc* in pBS *antisense* Transkript: *Eco RI* / T3 *sense* Transkript: *Hind III*/T7 (Queva, C. *et al.*, 1998)
cyclin D1	C.J. Sherr	1,3 kb *Cyclin-D1* cDNA in pBS *antisense* Transkript: *KpnI* / T3 *sense* Transkript: *SacI* / T7 (Matsushime, H. *et al.*, 1991)
pCMV-Sport2-eIF4E	IMAGE consortium	Enthält ein 1,4 kb Maus-*eIF4E* cDNA Fragment *antisense* Transkript: *Eco RI* / T7 *sense* Transkript: *NotI* / SP6 IMAGE ID: 600222
En1-5' Probe	K. Shughart	*antisense* Transkript: *Hind III* / T7 *sense* Transkript: *Bam HI* / T3
En2-3'UTR (ISH)	A.L. Joyner	0,8 kb Maus-*En2* cDNA-Fragment in pBS *antiense* Transkript: *ClaI* / T7 *sense* Transkript: *SacII* / T3 (Joyner, A. L. *et al.*, 1987)
Ephrin A5	U. Drescher	Enthält ein 0,93 kb Maus-*EphrinA5* cDNA Fragment *antisense* Transkript: *SalI* / T7 *sense* Transkript : *XbaI* / T3 (Zarbalis, K. *et al.*, 2000)
Fgf8	S. Martinez	*antisense* Transkript: *PstI* / T7 *sense* Transkript: *SmaI* / T3

		(Tanaka, A. *et al.*, 1992)
Gbx2	G.R. Martin	1 kb Maus-*Gbx2* cDNA-Fragment in pBS *antisense* Transkript: *HindIII* / T7 *sense* Transkript: *ApaI* / T3 (Wassarman, K. M. *et al.*, 1997)
Gli-3'Nde / LEF-1	R. Grosschedl	Enthält ein Maus-*Lef* cDNA Fragment (ohne HMG Domäne) *antisense* Transkript: *Eco RI* / T3
Otx2	A. Simeone	Enthält Maus-*Otx2* cDNA *antisense* Transkript: *EcoRI* / Sp6
pBS 31-1 (Pax2)	H. Fisckenscher/G. Dressler/ P.Gruss	Enthält ein 500 bp Maus-*Pax2* cDNA Fragment *antisense* Transkript: *BamHI* / T3 *sense* Transkript: *EcoRI* / T7
pBSKS+Wnt1	M. Wassef	Enthält die Maus-*Wnt1* cDNA (1,8 kb) in pBS antisense Transkript: HindIII / T7 *sense* Transkript: *XbaI* / T3
Hh-10.1 Shh	D. Epstein/B.St.Jaques/ A. McMahon	Enthält ein 640 bp Maus-*Shh* cDNA Fragment *antisense* Transkript: *HindIII* / T3
BS-TCF-1	R. Grosschedl	Maus-*TCF-1* cDNA Fragment in pBS-SK *antisense* Transkript *XbaI* / T7
TCF-4	R. Grosschedl	Ein 433 bp *TCF4* Maus-TCF4 cDNA Fragment in pBS *antisense* Transkript: *XhoI* / T7 *sense* Transkript: *Eco RI* / T3
pBS-Wnt1 Sal/MW	P. Danielian / A. McMahon	Enthält ein 670 bp Maus-*Wnt1*-3'UTR cDNA Fragment in pBS *antisense* Transkript: *Eco RI* / T7
Wnt1-5'(SISH)	K. Shughart	Enthält ein 450 bp Maus-Wnt1 5-' cDNA Fragment *antisense* Transkript: *HindIII* / SP6

5.19 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Bedingungen	Produktgröße
CreA	5'-GATGCAACGAGTGATGAGGTTCGC-3'	94°C 30 sek 58°C 30 sek 35 x 72°C 40 sek	496 bp (Bakteriophage P1 *Cre* Gen)
CreB	5'-ACCCTGATCCTGGCAATTTCGGC-3'		
En1Ex1deletion-3'fwd	5'-CGCACCACCAACTTTTTCATCG-3'	94°C 30 sek 58°C 30 sek 35 x 72°C 20 sek	239 bp (*En1 wt* Allel)
En1Ex1-nondel-rev	5'-CAGTTCGCATCTGGAGCACAC-3'		
GAPDH3R	5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	94°C 30 sek 58°C 30 sek 35 x 72°C 40 sek	687 bp (*GAPDH* Gen)
GAPDH1D	5'-CTTCATTGACCTCAACTACATGG-3'		
UlacZ	5'-GGTGGCGCTGGATGGTAA-3'	94°C 30 sek 58°C 30 sek 35 x 72°C 40 sek	631 bp (*LacZ* Gen)
LlacZ	5'-CGCCATTTGACCACTACC-3'		
Wnt1Ex3fwd	5'-AAACAGCGTTCATCTTCGCAAT-3'	94°C 30 sek 58°C 30 sek 35 x 72°C 40 sek	423 bp ; 880 bp (*Wnt1* cDNA/*Knock-In* Allel ; genom. Locus)
Wnt1Ex4revnestedII	5'-TGCTGCCTCGGTTGCCGTAAA-3'		

5.20 DNA-Sonden

Als 5'-Sonde zur Identifizierung homolog rekombinierter DNA wurde das 1,2 kb große *Sac I* Fragment aus dem Vektor SC1 verwendet. Die genomische DNA wurde für die Southernblotanalyse mit *Xba I* fragmentiert. Die etwa 850 bp große 3'-Sonde wurde durch Restriktionsverdau des Plasmides ESEN1 mit *EcoR I* und *Sal I* gewonnen. Die genomische DNA wurde für die Detektion der homologen Rekombination am 3' Ende mit *Hind III* geschnitten.

5.21 Mauslinien

C3H — Inzuchtstamm mit Fellfarbe Agouti. Bezogen über Charles River Laboratories und GSF-interne Zucht.

C57Bl/6N — Inzuchtstamm mit Fellfarbe Schwarz. Bezogen über Charles River Laboratories und GSF-interne Zucht.

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

Deleter — Mauslinie, die das *Cre*-Rekombinasegen des Bakteriophagen P1 unter Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors exprimiert (Schwenk, F. *et al.*, 1995). Die Mauslinie wurde auf den 129/SvJ Hintergrund zurückgekreuzt.

En1-3E7 — Auf CD1-Hintergrund zurückgekreuzte Mauslinie, die das *lacZ* Gen anstelle von *En1* exprimiert (Hanks, M. *et al.*, 1995).

En1PromWnt1 — Auf C57Bl/6N zurückgekreuzte Mauslinie mit dem Allel $En1^{Wnt1}$. Nähere Beschreibung in dieser Arbeit.

129/SvJ	Inzuchtstamm mit der Fellfarbe „hellbäuchig Agouti“. Bezogen über GSF-interne Zucht.

5.22 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Ausgießförmchen	Merck
Gewebekulturschalen	Nunc
Deckgläser	Menzel Gläser, 24 mm x 50 mm; 24 mm x 60 mm
Einbettgefäße	Polysciences, Peel-A-Way
Einweg-Kanülen	Terumo, Neolus 20G, 27G
Einweg-Spritzen	Terumo, 1ml
Entwickler (radioaktive *in situ* Hybrid.)	Kodak D19
Filterpapier	Whatman 3MM (Kat.-Nr.:3030 917)
Filterspitzen 20 µl, 200 µl, 1 ml	Art
Fixierlösung (radioaktive *in situ* Hybrid.)	Kodak fixer (Kat.-Nr.: 197 1720)
Handschuhe	Kimberley-Clark, Safeskin PFE Safeskin, Nitrile
Küvetten f. Elektroporation	Biorad (Kat.-Nr.: 165-2088)
Nylon-Membran für DNA-Transfertechniken	Amersham, Hybond N Plus
Objektträger	Menzel Gläser, Superfrost Plus
Pasteurpipetten	Brand
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym
Pipettenspitzen	Gilson
Plastikpipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
Plastikware (Gewebekultur)	Nunc
Reaktionsgefäße (1,5 ml oder 2 ml)	Eppendorf
Reinigungssäulen	Amersham, MicroSpin S-300
Röntgenfilme	Kodak, Biomax ML oder X-OMAT AR; Biomax MR für radioaktive *in situ* Hybridisierung
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Falcon

6 Methoden

6.1 Tierhaltung

Alle Mäuse stammten aus den Beständen der GSF-Tierhaltung, wo sie in einem geschlossenen System unter pathogenfreien Bedingungen gemäß den Bestimmungen der Tierschutzverordnung gehalten und gezüchtet wurden. Futter und Wasser standen den Mäusen zur freien Verfügung. Die Temperatur betrug 22±2°C und die relative Luftfeuchtigkeit 55±5%. Eine automatische Zeitschaltuhr regelte die Tag- und Nachtphasen, die jeweils 12 Stunden betrugen. Die Hellphase dauerte von 6 Uhr bis 18 Uhr. Mäuse aus der Mutantenzucht wurden drei Wochen nach der Geburt von den Eltern abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Die Markierung der Mäuse erfolgte durch Ohrlochung.

6.2 Bestimmung embryonaler Stadien

Bei einer vergleichenden Analyse von Genexpressionsmustern in Embryonen ist es wichtig, korrespondierende Entwicklungsstadien miteinander zu vergleichen. Da die Entwicklungsstadien von Embryonen innerhalb eines Wurfes oft nicht identisch sind, und um Embryonen aus unterschiedlichen Würfen miteinander vergleichen zu können, wurden die verwendeten Embryonen hinsichtlich ihres Entwicklungsstadiums eingestuft. Als Grundlage zur Beurteilung der Entwicklungsstadien dienten sowohl das Alter der Embryonen in Tagen (E) als auch die von Theiler eingeführten Einstufungskriterien (TS) (Theiler, 1989; Baldock, R. A. *et al.*, 1998).

6.3 Zellkulturtechnik embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente, aus der inneren Zellmasse von Mausblastozysten stammende Zellen (Martin, G. R., 1981; Evans, M. J. *et al.*, 1981). ES-Zellen können in einem undifferenzierten Stadium *in vitro* kultiviert und manipuliert werden. Diese Eigenschaft wird vielfach dazu genutzt, fremde DNA in die ES-Zellen einzubringen. Je nach Vorgehensweise wird die Fremd-DNA entweder zufällig in das Genom eingebaut, oder die Integration erfolgt gerichtet durch einen als homologe Rekombination bezeichneten intrazellulären Vorgang. Die homologe Rekombination wurde auch zur Erzeugung der in dieser Arbeit charakterisierten Mausmutante verwendet. Es ist möglich, ES-Zellen aus der Kultur durch Injektion in Mausblastozysten oder durch Aggregation mit Mausmorulae wieder in den Embryo zurückzubringen. Weibliche, scheinschwangere Mäuse dienen nach einem Embryotransfer als Leihmütter für die manipulierten Embryonen. Die auf diese Weise entstandenen

Mäuse bestehen aus Geweben, deren Zellen zu unterschiedlichen Anteilen auf die manipulierten ES-Zellen bzw. auf die unveränderten embryonalen Stammzellen des ursprünglichen Embryos zurückgehen und werden deshalb auch als Chimären bezeichnet. Wenn auch die Gonaden der Chimäre teilweise aus Zellen bestehen, die auf die manipulierten ES-Zellen zurückgehen, besteht die Möglichkeit, dass sich unter den Nachkommen der Chimäre Mäuse befinden, deren gesamte Zellen das Erbmaterial der manipulierten ES-Zellen in sich tragen. In diesem Falle spricht man von einer Keimbahntransmission.

Als Grundlage für die Arbeit mit embryonalen Stammzellen und für den Umgang mit Mäuseembryonen wurden zwei Fachbücher verwendet (Joyner, A. L. ed., 1993; Hogan, B. *et al.*, 1994).

Die Arbeit mit ES-Zellen wurde an sterilen Werkbänken durchgeführt. ES- und Feeder-Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO_2-Gehalt und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Es wurde die ES-Zelllinie R1 aus der Sublinie (129/Sv ´ 129/SvJ)F1 verwendet (Nagy, A. *et al.*, 1993).

6.3.1 Präparation und Anzucht von Feederzellen

Um kultivierte ES-Zellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten, sind bestimmte Kulturbedingungen einzuhalten. Dazu gehört ein speziell konditioniertes Kulturmedium, das neben fötalem Kälberserum (FCS) auch den Leukämie-Inhibierungsfaktor (LIF) in bestimmter Konzentration enthalten muss (Williams, R. L. *et al.*, 1988; Smith, A. G. *et al.*, 1988). Außerdem ist es erforderlich, die ES-Zellen mit mitotisch inaktivierten Fibroblastenzellen (Feeder-Zellen) zu kokultivieren, um einen Verlust der Pluripotenz des ES-Zellen zu vermeiden. In dieser Arbeit wurden die ES-Zellen auf einer einfachen Feederzellschicht mit LIF enthaltendem Medium gehalten. Zur Gewinnung von Feederzellen wurden Fibroblasten aus E14,5 - E16,5 alten Maus-Embryonen herauspräpariert und als 1 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden Embryonen des Mausstammes CD-1 verwendet. In flüssigem Stickstoff eingefrorene Feederzellen-Ampullen wurden schnell bei 37°C aufgetaut, in 10 ml DMEM gegeben und 5 min mit 270 x g zentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und auf fünf 13,2 cm-Kulturplatten mit je 25 ml Medium verteilt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und zur Teilungsinaktivierung für 3 h mit Mitomycin C behandelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen vom Boden für 15 min in 7,5 ml einer Trypsin/EDTA Lösung im Brutschrank inkubiert. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension wurden die Zellen vereinzelt. Nach einem weiteren

Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Medium aufgenommen und die Zellzahl in der Suspension bestimmt. Die Zellen wurden je nach Bedarf auf Platten unterschiedlicher Größe in einer Konzentration von 0,8 – 1 × 10^4 Zellen/cm^2 ausplattiert. Die Feederplatten waren nach mindestens dreistündiger Inkubation verwendbar.

6.3.2 Elektroporation von ES-Zellen

Um Fremd-DNA in ES-Zellen einzubringen, müssen ihre Zellmembranen für DNA-Moleküle durchlässig gemacht werden. Dies kann durch eine Elektroporation erfolgen. Bei der Elektroporation werden biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb einer kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert, ohne dass die Membranstruktur dabei völlig zerstört wird. Während der kurzen Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport z.B. von DNA-Molekülen durch die Membran in das Zellinnere erfolgen. Die exakten Bedingungen für die Elektroporation der ES-Zellen wurden auch an anderer Stelle beschrieben (Joyner, A. L. ed. *et al.*, 1993).

6.3.2.1 Expansion von ES-Zellen

Um ES-Zellen zu manipulieren, müssen diese zuvor aufgetaut, in Kultur genommen und vermehrt werden. Dazu wurde ein Aliquot der in flüssigem Stickstoff aufbewahrten ES-Zellen im Wasserbad bei 37°C geschwenkt, bis das gesamte Einfriermedium geschmolzen war. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension (ca. 1 ml) in 9 ml Waschmedium überführt und bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml ES-Zell-Kulturmedium aufgenommen und auf einer 6 cm-Feederplatte ausgesät. Die Zellen wurden etwa 48 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Durch eine 15minütige Einwirkung von 1,5 ml einer Trypsin/EDTA Lösung bei 37°C wurden die Zellen vom Boden gelöst. Die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension vereinzelt. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 9 ml Waschmedium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde bei 270 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie in 10 ml Medium aufgenommen und auf einer 10 cm Feederplatte neu ausgesät. Die Zellen wurden für weitere 48 h kultiviert und auf vier 10-cm Gelatineplatten passagiert. Nach weiteren 36 - 48 h Inkubation wurde eine Zellzahl erreicht, die für zwei bis drei Elektroporationen ausreichend war. Um ein exponentielles Wachstum von ES-Zellen zu erreichen, wurde 3 - 5 h vor der Elektroporation das Medium gewechselt. Die Zellen wurden gewaschen, trypsiniert, vereinzelt, in kaltem PBS aufgenommen und ausgezählt.

6.3.2.2 Elektroporation und Selektion

20 µg der Vektor-DNA wurden mit 40 U *Sal I* ü.N. bei 37°C linearisiert. Danach wurde das Enzym durch Hitzebehandlung inaktiviert (65°C, 20 min). 6×10^7 ES-Zellen wurden in 850 µl kaltem PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} aufgenommen, mit der linearisierten Vektor-DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 0,24 kV und 500 µF, die Zeitkonstante betrug 6,3 msek. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend in 40 ml ES-Zell-Medium aufgenommen und auf vier mit 0,1% Gelatine behandelten 10 cm-Kulturschalen ohne Feederzellen verteilt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das ES-Zell-Medium gegen das G418-haltige Selektionsmedium (200 µg/ml G418 in ES-Zell-Medium) ausgetauscht. Da die Vektor-DNA ein Neomycin-Resistenzgen mit einem eigenen *PGK*-Promotor enthielt, konnte durch das Neomycin-Analogon Geneticin (G418) eine Positiv-Selektion auf solche ES-Zellen erfolgen, die die Vektor-DNA in ihr Genom eingebaut hatten. Nach weiteren 24 h wurde dem Selektionsmedium 2 µM Gangcyclovir zugegeben. Gangcyclovir diente zur Negativ-Selektion, wodurch die Zahl der ES-Zellen, die eine zufällige, also nicht auf ein homologes Rekombinationsereignis zurückzuführende Vektorintegration enthielten, verringert werden sollte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei einer homologen Rekombination der Teil der Vektor-DNA, der das *TK*-Gen des Herpes-Simplex-Virus kodiert, verloren geht, während er bei zufälliger Integration des Vektors in das Genom erhalten bleibt. Das *TK*-Gen kodiert die Thymidin-Kinase, ein Enzym, das Nukleosid-Analoga wie Acyclovir oder Gangcyclovir durch Phosphorylierung in zytotoxische Triphosphate umwandelt. Gangcyclovir-Triphosphat wird während der DNA-Replikation durch die DNA-Polymerase in den elongierenden DNA-Strang eingebaut, wodurch ein Kettenabbruch hervorgerufen wird, der schließlich zum Tod der Zelle führt (St Clair, M. H. *et al.*, 1987).

Das Selektionsmedium wurde jeden Tag gewechselt. Acht Tage nach Beginn der Selektion wurden die überlebenden Zellkolonien isoliert. Dafür wurden sie unter einem Binokular-mikroskop unter der Sterilbank mit einer Pipettenspitze vom Boden abgelöst und in 96-Lochplatten mit Feederzellen überführt. In jedes Loch wurden 150 ml ES-Zell-Medium gegeben.

6.3.3 Identifizierung von ES-Zellklonen, die homolog rekombinierte DNA enthalten

Einen Tag nach ihrer Isolierung wurden die ES-Zellkolonien mit 30 µl Trypsin/EDTA pro Loch behandelt und nach ihrer Ablösung vom Boden in neue 96-Loch-Feederplatten überführt. Nach zweitägiger Kultivierung wurden die ES-Zellen wieder passagiert. Je nach Zelldichte wurden

sie entweder 1:3 oder 1:4 verdünnt. Für die Isolierung der ES-Zell-DNA wurde ein Teil der Zellen auf zwei 96-Loch-Gelatineplatten überführt. Zur späteren Expansion derjenigen ES-Zellklone, die homolog rekombinierte DNA enthielten, wurde ein anderer Teil der Zellen auf zwei 96-Loch-Feederplatten übertragen und zwei Tage nach der Passage in 200 µl 1 x Einfriermedium eingefroren. Um die Qualität der ES-Zellen nicht durch zu schnelles Einfrieren zu gefährden, wurden sie in mit Papier ausgekleideten Pappschachteln in den -80°C Gefrierschrank gegeben.

Die auf den Gelatineplatten wachsenden ES-Zellklone wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde jeder Klon mit 50 µl Lysispuffer behandelt. Die Platten wurden ü.N. in einer Feuchtekammer bei 50°C inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte bei RT durch Zugabe von 100 µl eiskaltem EtOH mit 75 mM NaCl und unter ständigem Schütteln der Platten für 30 min. Danach wurden die Platten für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde dreimal mit 70%igem EtOH gewaschen, anschließend luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Hybridisierung mit der 3´-externen-Sonde (Wildtypbande: 9 kbp, Rekombinanten-Bande: 5 kbp) wurde die genomische DNA mit dem Enzym *HindIII* geschnitten. Die DNA derjenigen Klone, die im Southernblot eine rekombinante Bande aufwiesen, wurde mit Hilfe der Replika-Platten erneut isoliert und für die Hybridisierung mit der 5'-Sonde herangezogen. Dazu wurde die genomische DNA mit dem Enzym *XbaI* geschnitten. Danach wurden die DNA Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein Southernblot durchgeführt. Nur solche Zellklone, die im Southernblot auch unter Verwendung der 5'-Sonde eine rekombinante Bande aufwiesen (Wildtypbande: 7 kbp, Rekombinanten-Bande: 13 kbp), enthielten die gewünschte homolog rekombinierte DNA und wurden für die nachfolgenden Schritte verwendet.

6.3.4 Expansion und Einfrieren der positiven ES-Zellklone

ES-Zellklone mit homologem Rekombinationsereignis wurden in einem auf 37°C eingestellten Wasserbad in denselben 96-Loch-Feederplatten, in denen sie zuvor eingefroren worden waren, aufgetaut. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 x g wurde das Einfriermedium entfernt und die positiven ES-Zellklone auf eine neue 96-Loch-Feederplatte ausgesät. In den folgenden Tagen wurden die Klone entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit je über eine 48-Loch-Feederplatte, eine 24-Loch-Feederplatte, eine 3,5 cm-, eine 6 cm- und eine 10 cm-Feederplatte auf vier 10 cm-Feederplatten expandiert. Die so expandierten ES-Zellklone wurden durch eine Trypsin/EDTA-Behandlung zu Aggregaten von 10 - 20 Zellen dissoziiert und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in ES-Zell-Medium aufgenommen und mit dem gleichen Volumen an 2 x

Einfriermedium vermengt. Anschließend wurde je 1 ml dieser Suspension in ein beschriftetes Kryoröhrchen gegeben. Danach wurden die Röhrchen in ein auf 4°C vorgekühltes, mit Isopropanol gefülltes Gefäß gestellt und bei -80°C eingefroren. Das Isopropanol sollte gewährleisten, dass die Temperatur graduell um ca. 1°C/min absank. Anschließend wurden die Röhrchen im Flüssig-Stickstofftank aufbewahrt. Je nach Zelldichte konnten von einer 10 cm-Platte drei oder vier Kryoröhrchen eingefroren werden.

6.4 Herstellung von Injektions-Chimären

6.4.1 Gewinnung von Mäuseblastulae

Für die Gewinnung von Mäuseblastulae (Embryonalstadium E3,5) wurden weibliche C57BL/6N Mäuse durch hormonelle Behandlung zur Superovulation angeregt. Die Superovulation dient der Erhöhung der Anzahl an ovulierten Eizellen und erfolgt durch die Behandlung der Weibchen mit Analoga der gonadotropen Hormone follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH). Dadurch erhält man pro Tier mehr Eizellen, wodurch die Anzahl der verwendeten Spendertiere minimiert werden kann. Am ersten Tag der Behandlung wurde den Spender-Weibchen um 15 Uhr eine Dosis von 7,5 I.E. Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, Intervet) durch intraperitoneale Injektion verabreicht. 48 Stunden später wurden die Mäuse mit 7,5 I.E. humanem Chorion-Gonadotropin (hCG/Ovogest, Intervet) behandelt und einzeln mit einem Männchen des gleichen Stammes verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen von den Männchen getrennt. Die Spender-Weibchen, die nicht gedeckt worden waren, wurden aussortiert. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass gedeckte Weibchen für die Dauer einiger Stunden einen die Vagina verschließenden, festsitzenden weißlichen Pfropf aus geronnenem Sekret produzieren. Am Morgen des sechsten Tages nach Beginn der Behandlung wurden die Spender-Weibchen zur Entnahme der Uteri getötet. Die Blastozysten wurden mit M2 Medium aus den Uteri herausgespült und konnten anschließend für die Injektion mit embryonalen Stammzellen verwendet werden.

6.4.2 Injektion der ES-Zellen in Mausblastozysten

Die manipulierten ES-Zellen wurden wie beschrieben aufgetaut, in Kultur genommen und expandiert (siehe Abschnitt 6.3.2.1). Kurz vor der Injektion wurden die Zellen einer zu etwa 70% konfluenten 6 cm oder 10 cm Kulturschale für wenige Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden in Wasch-Medium gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in einer geringen Menge M2 Medium aufgenommen. Die Blastozysten und die ES-Zellen wurden in mit

Paraffinöl überschichteten Tropfen aus M2 Medium (Hogan, B. *et al.*, 1994) zusammengeführt und auf einer Wärmeplatte bei 37°C inkubiert. Die Injektion von 2-3 ES Zellen in die Blastozysten erfolgte an einem Leica Injektionsmikroskop (Leica DNRB) mit einer Injektionskapillare sowie einer Haltekapillare, die beide zuvor an der Mikroschmiede gezogenen worden waren.

6.4.3 Embryotransfer

Als Ammen-Mütter dienten pseudoträchtige Weibchen des Stammes CD-1. Zur Einleitung einer Scheinschwangerschaft wurden die Weibchen drei Tage vor dem Embryotransfer mit vasektomierten CD-1-Männchen verpaart (Hogan, B. *et al.*, 1994). Nur solche Weibchen, die am Tage nach ihrer Verpaarung einen vaginalen Sekretpfropf ausgebildet hatten, wurden für den Transfer verwendet.

6.5 Aufzucht der transgenen Mäuse

Die Aufzucht der transgenen Mäuse erfolgte wie unter 6.1 beschrieben. Für die Rückkreuzung der Chimären wurden C57BL/6N Mäuse verwendet.

6.6 Herstellung kompetenter Bakterien

Der gesamte Arbeitsvorgang fand unter sterilen Bedingungen statt. Zunächst wurden *E.coli* Bakterien des Stammes DH5α oder DM1 auf LB-Agar ohne Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Bakterienkolonie dieser Platte wurde dann zu 5 ml LB-Medium gegeben und für 5 - 8 h auf einem Schüttler (etwa 220 rpm) bei 37°C inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden zu 200 ml LB-Medium gegeben. Diese Kultur wurde auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Absorption der Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen. Bei einer Absorption von etwa 0,3 wurde die Bakteriensuspension in 50 ml Plastikröhrchen überführt und zentrifugiert (2500 x g, 10 min, 4°C). Die Zellpellets wurden vorsichtig in insgesamt 20 ml TSB-Lösung aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien konnten nun unmittelbar transformiert werden. Nicht direkt benötigte kompetente Bakterien wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (je 500 µl), in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80°C gelagert.

6.7 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden die *Escherichia coli* Bakterienstämme DH5α und DM1 (Life Technologies) verwendet. Zu 100 µl langsam auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden

bis zu 1 µg Plasmid-DNA oder bis zu 10 µl eines Ligationsansatzes gegeben. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig durchmischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (20 sek in einem Wasserbad) wurden 400 µl LB-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden für 40 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden von diesem Ansatz 50-250 µl auf Ampicillin-haltige LB-Platten aufgetragen, die dann invertiert bei 37°C ü.N. inkubiert wurden.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz kompetenter Bakterien wurden Test-Transformationen mit 0; 0,1 und 1 ng DNA des Vektors pBlueScript durchgeführt. Die Transformationseffizienz lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$E = \frac{n}{d} * \frac{V_{Ges}}{V_P}$$

E	Transformationseffizienz [μg^{-1}]
n	Zahl der Kolonien
d	Menge der transformierten DNA [µg]
V_{Ges}	Gesamtmenge des Transformationsansatzes [µl]
V_P	Menge, die ausplattiert wurde [µl]

6.8 Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

6.8.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration wurde durch Messung der optischen Dichte im Genequant-Photometer (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 50 µg DNA/ml, 33 µg einzelsträngiger DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml. Die Reinheit der DNA wurde durch die Messung des Verhältnisses OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Dieser Wert sollte 1,8 nicht unterschreiten.

6.8.2 Präparation von DNA

Die DNA-Präparationen im Mini- oder Maxi-Maßstab erfolgten laut Vorschrift mit den dafür vorgesehenen Qiagen Bausatzsystemen.

6.8.3 Präzipitation von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (NaOAc), pH 5,2 und 2 Vol. Ethanol (EtOH) versetzt, kräftig durchmischt und bei –20°C für etwa 30 min inkubiert. Anschließend wurde die DNA pelletiert (10 min, 20800 x g, 4°C) und das Präzipitat mit 70% EtOH

gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft oder in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und dann in dem gewünschten Volumen eines geeigneten Puffers (z.B. TE) aufgenommen.

6.8.4 Reinigung von DNA durch Phenolextraktion

Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und kräftig durchmischt. Nach vollständiger Trennung der Phasen (dieser Prozess kann durch Zentrifugation beschleunigt werden) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNS wurde präzipitiert und in einem geeigneten Puffer aufgenommen (siehe 6.8.3)

6.8.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Reaktionsbedingungen, Enzymmengen und Puffer entsprachen den Vorgaben der Herstellerfirmen der Enzyme. Die Ansätze wurden 1 bis 2 h oder ü.N. bei 37°C inkubiert. Pro µg DNA und pro Schnittstelle wurden 2 – 3 U des Restriktionsenzyms verwendet. Sollte genomische DNA durch einen Restriktionsverdau geschnitten werden, erfolgte dies nach einem gesonderten Protokoll (siehe 6.18.2).

6.8.6 Gelelektrophoretische Analyse von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können in einem Agarosegel elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und durch Interkalation von Ethidiumbromid (EtBr) und nachfolgender UV-Bestrahlung sichtbargemacht werden. Dieses Verfahren kann z.B. zur Analyse von Restriktionsverdauen, Ligationen, PCR-Reaktionen, aber auch zur Isolierung von Fragmenten bestimmter Größe aus einer Mischung verschiedener Fragmente verwendet werden. Auch genomische DNA wird im Rahmen einer Southernblotanalyse elektrophoretisch aufgetrennt.

Zunächst wurde ein 0,8-1,5%iges Agarosegel gegossen. Dazu wurden pro 100 ml TAE-Puffer 0,8-1,5 g Agarose eingewogen und in einer Mikrowelle kurz aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 55°C wurden 50 - 100 ng/ml EtBr zugegeben und das Gel mit der gewünschten Taschenzahl und –größe gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine mit 1 x TAE – Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Aliquots der DNA-Lösungen wurden mit 5 x Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandards wurden die kommerziell erhältlichen 1kb+ (Life Technologies) oder Smartladder (Eurogentech) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei bis zu 200 Volt für eine den Fragmentgrößen angemessene Zeit. Nach der Elektrophorese wurde die DNA durch UV-Illumination sichtbar gemacht. Die

Nachweisgrenze einer scharfen Bande liegt mit dieser Methode bei ca. 5 bis 10 ng DNA. Die Gele wurden zur Dokumentation mit einer Videokamera fotografiert.

6.8.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel kann auch zur Aufreinigung oder Isolierung eines DNA-Fragmentes verwendet werden. Dazu wurde nach der Elektrophorese (s. Abschnitt 6.8.6) die gewünschte Bande unter langwelliger UV-Bestrahlung (366 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Elution und Reinigung der DNA erfolgte unter Verwendung des Gel Extraktions-Baukastensystems von Qiagen. Dieses Aufreinigungsverfahren beruht auf der Adsorption der DNA an eine Silicagel-Membran bei hoher Salzkonzentration und der Elution der DNA bei niedriger Salzkonzentration.

Zunächst wurde der herausgeschnittene Agaroseblock in dem fünffachen Volumen QG-Lösung bei 55°C unter mehrmaligem Mischen bis zur vollständigen Schmelze inkubiert. Die Lösung wurde auf eine vom Hersteller mitgelieferte Miniatursäule pipettiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 20800 x g zentrifugiert. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte erfolgten ebenfalls für 1 min bei 20800 x g. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Lösung erneut zentrifugiert. Wieder wurde die Flüssigkeit verworfen. Um alle Rückstände der Waschlösung zu entfernen wurde die Säule erneut zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. 50 µl Elutionspuffer EB wurden direkt auf den Säulenboden pipettiert. Nach 1 min wurde die Säule zentrifugiert. Das DNA-haltige Eluat wurde zur weiteren Verwendung aufgehoben.

6.9 Herstellung rekombinanter DNS

6.9.1 Klenow-Reaktion

Um einzelsträngige 5'-Überhänge, wie sie z.B. nach einem DNA-Restriktionsverdau entstehen können, zu beseitigen, können die 3'-Enden durch die Klenow-Reaktion in ihrer Länge angepasst werden. Katalysiert wird diese Umsetzung durch die große Untereinheit der DNA-Polymerase ("Klenow-Polymerase") aus *E.coli*.

Pipettierschema:		
	DNA-Fragment in H_2O	20 µl
	5 x Reaktionspuffer	6 µl
	dNTP-Mix (25 mM)	1 µl
	Klenow-Polymerase (10U/µl)	1 µl
	H_2O	ad 30 µl

Insgesamt wurde der Ansatz für eine Stunde bei 30°C inkubiert; nach der Hälfte der Zeit wurde ein weiterer Mikroliter Klenow-Polymerase zugefügt. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz für 10 min bei 75°C inkubiert.

6.9.2 Dephosphorylierung der Termini von DNS-Fragmenten

Um Religationen eines Vektors in einem Ligationsansatz zu verhindern, wurden die terminalen Phosphatgruppen des geschnittenen Vektors mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (SAP, *shrimp alkaline phosphatase,* USB) entfernt.

Pipettierschema:	DNA	10 µl	(bis zu 10 µg)
	10 x SAP-Puffer	2 µl	
	SAP (1 U/µl)	1 µl	
	H_2O	ad 20 µl	

Insgesamt wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert; nach der Hälfte der Zeit wurde ein weiterer Mikroliter SAP zugefügt. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz für 30 min bei 65°C inkubiert.

6.9.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligationen durch die T4-DNA-Ligase erfolgten mit DNA-Fragmenten, die entweder komplementäre Einzelstrang-Überhänge ("*sticky ends*") oder glatte Enden ("*blunt ends*") aufwiesen. Bei der Ligation von Fragmenten mit komplementären Einzelstrangüberhängen wurden gleiche Gewichtsmengen von beiden Fragmenten verwendet, während für Ligationen von Fragmenten mit glatten Enden etwa die fünffache Gewichtsmenge des kleineren Fragmentes gewählt wurde.

Pipettierschema:	Vektor-DNA	2 µl	(bis zu 500 ng)
	Insert-DNA	2 µl	(bis zu 500 ng)
	10 x Ligase-Puffer	2 µl	
	T4-Ligase (5 U/µl)	1 µl	
	H_2O	ad 20µl	

Der Ansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert; am nächsten Morgen wurde erneut 1 µl T4-Ligase zugesetzt und für mehrere Stunden bei 16°C oder bei RT inkubiert. Die Versuchs-

bedingungen wurden, falls nötig, variiert. So wurden teilweise mehr Ligase-Einheiten eingesetzt, oder es wurde für längere Zeit inkubiert (bis zu 3 Tagen).

6.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren in der Molekularbiologie und dient zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Die PCR-Methode beruht auf der Eigenschaft der *Taq*-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) oder anderer temperaturstabiler DNA-Polymerasen, in einem thermozyklischen Prozess wiederholt kurze DNA-Fragmente (*Primer*) komplementär zur Vorlagen-DNA zu verlängern. Werden zwei Primer so gewählt, dass der eine den Vorwärtsstrang, der andere den Rückwärtsstrang eines bestimmten Bereiches der Vorlagen-DNA kopiert, findet, sofern die neu synthetisierten DNA-Stränge jeweils beide Primer-Bindestellen beinhalten, eine exponentielle Amplifikation der Vorlagen-DNA statt. Dieses Verfahren kann auf vielfältige Weise modifiziert werden und findet z.B. in der Klonierung von DNA oder cDNA oder in der Diagnostik Anwendung. Die PCR-Bedingungen sind sehr stark abhängig von der Art der Vorlagen-DNA, der Schmelztemperatur der Primer sowie der Größe und des G/C-Gehaltes des zu ampilifizierenden DNA-Fragmentes. Hier sei exemplarisch die *LacZ*-PCR beschrieben, die neben der *Wnt1*-PCR und dem Southernblotverfahren zur Genotypisierung der $En1^{+/Wnt1}$-Mäuse verwendet wurde:

Pipettierschema für eine Probe (bei mehreren Proben wurden Mischungen hergestellt):

2,5 µl	10 x PCR-Reaktionspuffer (inkl. NH_4SO_4)
1,5 µl	25 mM $MgCl_2$
0,5 µl	10 µM dNTP-Mischung
1 µl	10 µM UlacZ (Vorwärts-Primer)
1 µl	10 µM LlacZ (Rückwärts-Primer)
17,25 µl	H_2O
1 µl	Vorlagen-DNA (etwa 50 ng genomischer DNA)
0,25 µl	*Taq*-Polymerase (5 U/µl; MBI)

Folgende Temperaturzyklen wurden durchgeführt:

	4 min	94°C	(initiales Schmelzen der Vorlagen-DNA)
35 x	30 sek	94°C	(zyklisches Schmelzen der Vorlagen-DNA)
	30 sek	58°C	(Anlagerung der Primer an komplementäre Abschnitte der Vorlagen-DNA)
	40 sek	72°C	(Vorlagenabhängige Verlängerung der Primer)
	8	6°C	(Kühlung des PCR-Produktes)

Die Auswertung der PCR erfolgte durch DNA-Gelelektrophorese (s. 6.8.6).

6.11 RNA *in situ* Hybridisierung

Durch die Methode der RNA *in situ* Hybridisierung kann die transkriptionelle Aktivität eines Gens im Gewebe sichtbar gemacht werden. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Anlagerung einer synthetisch hergestellten und speziell markierten *antisense*-RNA-Sonde an das im Gewebe erzeugte endogene s*ense*-RNA-Transkript. In einer der eigentlichen Hybridisierung nachfolgenden enzymatischen oder autoradiografischen Farbreaktion werden diejenigen Regionen im Gewebe angefärbt, in denen das untersuchte Gen zu dem gewählten Zeitpunkt transkribiert wird. *In situ* Hybridisierungen können an ganzen Embryonen, an Geweben, Schnitten oder auch einzelnen Zellen durchgeführt werden.

6.11.1 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Die RNA-Sonden für die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung wurden durch *in vitro* Transkription in Anwesenheit von DIG-11-UTP (Digoxigenin-11-uridin-5´-triphosphat) erzeugt. Als Vorlage für die Transkription dienten linearisierte Plasmide, die die zu transkribierende DNA und die Promotoren für SP6, T3 oder T7 RNA-Polymerasen enthielten. Die Markierungsreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg	linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	10 x Transkriptionspuffer (Roche)
2 µl	10 x DIG RNA Markierungsreagenz
ad 18 µl	H_2O
2 µl	RNA Polymerase (SP6, T7 oder T3; 20 U/µl)

Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 2 h. Durch Zugabe von 2 µl DNase I konnte die Vorlagen-DNA entfernt werden (15 min 37°C). Anschließend wurde die RNA über RNA-Reinigungssäulen (Qiagen, RNeasy Mini) aufgereinigt und mit 50 µl H_2O eluiert. Zur Kontrolle der Reaktion wurden 5 µl des Eluats entnommen, für 3 min bei 80°C inkubiert und nach Zugabe von Probenpuffer auf einem normalen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei erfolgreicher Transkription sollte unter UV-Beleuchtung eine deutliche Bande sichtbar werden.

6.11.2 Herstellung von S^{35}-markierten RNS-Sonden

Die Herstellung einer radioaktiven RNA-Sonde erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie für nicht-radioaktive RNA-Sonden, jedoch wir anstelle von DIG-11-UTP [α-thio^{35}S]-UTP (NEN, Kat.-Nr.: NEG-039H) in die Sonde eingebaut.

Pipettierschema:

3 µl	10 x Transkriptionspuffer
3 µl	NTP-Mischung (je 10 mM rATP/rCTP/rGTP)
1 µl	0,5 M DTT
1 µl	RNasin (RNase Inhibitor, 40 U/µl, Promega)
1,5 µg	linearisiertes Vorlagenplasmid
10 µl	[α-thio-^{35}S]-UTP (12,5 mCi/mM; 1250 Ci/mmol; NEN)
ad 28 µl	DEPC-H_2O
2 µl	RNA Polymerase (SP6, T7 oder T3; 20 U/µl)

Die Proben wurden gut durchmischt, kurz zentrifugiert und bei 37°C für 2 h inkubiert. Anschließend konnte die Vorlagen-DNA durch Zugabe von 2 µl DNase I (15 min 37°C) entfernt werden. Die Proben wurden mit dem RNeasy-Baukastensystem (Qiagen) aufgereinigt. Die Aktivität der Sonde wurde mit einem Szintillationsmeßgerät (1 µl Sonde in 2 ml Szintillator / β-counter) bestimmt, wobei pro Objektträger 90 µl Probe mit einer Aktivität von $3{,}5x10^4$ bis $7x10^4$ cpm/µl benötigt wurden. Die Detektion erfolgte autoradiographisch.

6.11.3 RNA *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen

Die in dieser Arbeit verwendete Methode für die RNA *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryonen oder Organen basiert auf einem Standard-Protokoll (Wilkinson, D. G., 1992). Die Embryonen des gewünschten Alters wurden aus dem Uterus präpariert. Bei älteren Embryonen (ab E12.5) wurde der vordere Bereich des Neuralrohres mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten und unter Verwendung eines Binokulars isoliert. Die Dottersäcke wurden für die nachfolgende Genotypisierung aufbewahrt. Alle Inkubationsschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, auf einem Taumelschüttler, um eine optimale Durchmischung zu gewährleisten. Die Embryonen oder Neuralrohre wurden in einer 4%igen Paraformaldehydlösung in PBS ü.N. bei 4°C fixiert. Die Präparate wurden zweimal für 5-15 min mit PBS gewaschen und in einer ansteigenden Methanolreihe dehydriert (25%, 50% und 75% Methanol in PBT und zuletzt zweimal 100% Methanol). Die so behandelten Embryonen konnten mehrere Monate bei -20°C gelagert werden. Vor der Hybridisierung wurden die Präparate durch Zugabe von 6% H_2O_2 bei RT gebleicht. Sobald die Embryos vollständig gebleicht waren, wurden sie durch eine absteigende Methanolreihe (75%, 50% und 25% Methanol in PBT) gefolgt von zweimaligem Waschen in PBT rehydriert. Ältere Embryonen ab E9.5 oder größere Gewebestücke wurden durch Behandlung mit 1 µg/ml Proteinase K in PK-Puffer (pH 7) für 1 – 5 min bei RT

permeabilisiert. Die Dauer der Proteinase K-Behandlung richtete sich nach der Gewebegröße, und damit nach dem Alter der Embryonen:

Alter	Dauer der Behandlung
E9.5	1 min
E10.5	3 min
E11.5 (Neuralrohr E12.5-E13.5)	4 min
E12.5 (Neuralrohr E14.5-E16.5)	5 min

Anschließend wurden die Präparate dreimal je 5 min bei RT mit PBT gewaschen. Danach wurden die Embryonen oder Gewebe dreimal für 5 min bei RT in RIPA-Puffer inkubiert und wiederum dreimal mit PBT gewaschen. Die Präparate wurden 20 min mit PFA/GA/PBT-Lösung bei RT nachfixiert und im Anschluss daran dreimal 5 min mit PBT gewaschen. Die Embryos bzw. Neuralrohre wurden entsprechend der verwendeten Sonden und Genotypen in unterschiedliche 2 ml Kryoröhrchen gegeben und in 1,5 ml Hybridisierungspuffer bei 67°C ü.N. (mindestens aber 3 h) in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Nach dieser Vorhybridisierung konnten die Proben bei –20°C gelagert oder direkt weiterverwendet werden. Die RNA-Sonden (s. Abschnitt 6.11.1) wurden vor der Benutzung für 3 min bei 80°C denaturiert. Eine ausreichende Menge der Sonde (etwa 0,25 µg/ml) wurde zusammen mit 100 µg/ml tRNA zu den Proben gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 67°C ü.N. in einem Hybridisierungsofen. Am nächsten Morgen wurde die Embryonen zweimal für 30 min bei 65°C mit Hybridisierungspuffer gewaschen. Es folgten etwa 10 Waschschritte mit SSC/FA/Tween bei 65°C über einen Zeitraum von 4 – 5 h. Anschließend wurden die Proben auf RT abgekühlt und dreimal 20 min bei RT mit TBST (ISH) gewaschen. Danach wurden die Embryos bzw. Neuralrohre für 1 h bei RT in 10% Blocklösung inkubiert. Währenddessen wurde der an AP gekoppelte α-Digoxigenin-Antikörper (Roche) in 1% Blocklösung bei 4°C präadsorbiert. Die Proben wurden dann ü.N. mit dieser Antikörperlösung bei 4°C auf dem Schwenker inkubiert. Am folgenden Tag (u.U. auch nach 2-3 Tagen) wurden die Proben bei RT in TBST (ISH) inkubiert. Der Puffer wurde dabei wiederholt gewechselt. Die Embryos wurden dreimal 20 min mit APB bei RT gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte in frisch angesetzter Färbelösung bei 4°C oder bei RT im Dunkeln. Sobald die gewünscht Farbintensität erreicht wurde, konnte die Reaktion gestoppt werden. Dazu wurden die Proben dreimal 20 min in APB gewaschen und anschließend in 4% PFA-Lösung bei 4°C fixiert und gelagert.

6.11.4 RNA *in situ* Hybridisierung mit Gewebeschnitten (Paraffin)

Die Paraffinschnitte wurden zunächst zweimal 10 min mit Xylol behandelt, um das Paraffin zu entfernen. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (je 2 x 5 min 100% EtOH und 70% EtOH/DEPC-H_2O , sowie 1 x 3 min DEPC-H_2O). Die Proben wurden für 3 min mit DEPC-PBS gewaschen und dann für 20 min auf Eis mit 4% Paraformaldehydlösung in PBS fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min mit DEPC-PBS gewaschen und für 7 min mit 20 µg/ml Proteinase K in PK-Puffer inkubiert. Die Präparate wurden mit PBS gewaschen, für 20 min in 4% Paraformaldehydlösung in PBS nachfixiert und wiederum PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte unter starkem Rühren für 10 min in 250 ml 0,1 M Triethanolamin-HCl-Lösung (pH 8) gegeben. 630 µl Essigsäureanhydrid wurden langsam hinzugeträufelt. Im Anschluss daran wurden die Präparate zweimal 5 min mit 2 x SSC gewaschen und in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert (je 1 min 60% EtOH/DEPC-H_2O; 70% EtOH/DEPC-H_2O; 96% EtOH/DEPC-H_2O; 100% EtOH). Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet. Zur Prähybridisierung wurden die Präparate für 1 h bei 55-68°C im Hybridisierungspuffer inkubiert. Währenddessen wurden die Objektträger mit Deckgläsern abgedeckt. Die markierte Sonde wurde in frischen Hybridisierungspuffer gegeben und für 2 min bei 90°C denaturiert. Danach wurden die Deckgläser sowie der alte Hybridisierungspuffer von den Präparaten entfernt und der frische, die markierte Sonde enthaltende Hybridisierungspuffer auf die Objektträger gegeben. Die Präparate wurden mit Deckgläsern abgedeckt und ü.N. bei 55-68°C inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur lag etwa 25°C unter der berechneten Schmelztemperatur der Sonde. Durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur konnten Hintergrundsignale minimiert werden.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser entfernt und möglichst viel des Hybridisierungspuffers abgenommen. Die Schnitte wurden viermal 5 min bei RT mit 4 x SSC gewaschen. Danach wurden die Präparate für 20 min bei 37°C mit 20 µg/ml RNase A in NTE-Puffer behandelt. Es folgten folgende Waschschritte: 2 x 5 min bei RT mit 2 X SSC/1 mM DTT; 1 x 10 min bei RT mit 1 x SSC/1 mM DTT; 1 x 10 min bei RT mit 0,5 x SSC/1mM DTT; 2 x 30 min bei 64°C mit 0,1 x SSC/1 mM DTT; 2 x 10 min bei RT mit 0,1 x SSC; 1 x 1 min bei RT mit 30% EtOH in 300 mM NH_4OAc; 1 x 1 min bei RT mit 50% EtOH in 300 mM NH_4OAc; 1 x 1 min bei RT in 70% EtOH in 300 mM NH_4OAc, 1 x 1 min bei RT in 96% EtOH sowie 2 x 1 min bei RT in 100 % EtOH.

Danach wurden die Schnitte an der Luft getrocknet und für ein bis drei Tage mit einem Röntgenfilm (Kodak, BioMax MR) exponiert. Zur detaillierteren autoradiografischen Analyse wurden die Präparate mit einer strahlungsempfindlichen Emulsion (Kodak, NTB2) inkubiert. Es

wurde sorgfältig darauf geachtet, nur unter Sicherheitsbeleuchtung (Kodak, Safelight No 2) zu arbeiten. Die Emulsion wurde in einem lichtundurchlässigen Gefäß auf 42°C (etwa 45 min) in einem Wasserbad erwärmt. Die Emulsion wurde in einem Volumenverhältnis 1:1 mit auf 42°C vorgewärmtem H_2O (Ampuwa) verdünnt und in einem Plastiklöffel verrührt. Die Objektträger mit den Schnitten wurden einzeln je für 4 sek in die Emulsion getaucht und zum Trocknen ü.N. vertikal gelagert. Danach wurden die Schnitte in lichtundurchlässige Boxen mit einer ausreichenden Menge Silikagel-Kapseln gegeben, versiegelt und bei 4°C für 1 Tag oder bis zu 6 Wochen exponiert. Die Expositionsdauer konnte anhand der Röntgenfilme abgeschätzt werden.
Vor der Entwicklung wurden die Schnitte auf RT angeglichen. Die Schnitte wurden für 3 – 4 min bei RT in Entwicklungslösung gegeben (Kodak, D19), danach kurz mit Wasser gewaschen und für 5 – 7 min in Fixierlösung gegeben (Kodak, fixer). Die Objektträger wurden 25 min mit Leitungswasser gewaschen. Emulsionsreste wurden von der Rückseite der Objektträger entfernt, bevor die Schnitte an der Luft getrocknet wurden. Schließlich konnten die Schnitte, falls erwünscht, mit Kresylviolett gegengefärbt werden.

6.12 Histochemische und immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten

6.12.1 Perfusion von juvenilen oder adulten Mäusen

Um einen sehr guten Gewebeerhalt zu erreichen, konnten Mäuse die mindestens ein Alter von P0 (Neugeborene) hatten, intrakardial mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung perfundiert werden. Dazu wurden die Tiere zunächst getötet. Dann wurde der Brustkorb mit einer Schere eröffnet und eine Injektionskanüle in die linke Herzkammer eingeführt. Die rechte Herzkammer wurde mit einem Schnitt geöffnet, so dass die durch die Kanüle austretende Flüssigkeit ausgehend von dem linken Ventrikel durch den ganzen Organismus gespült werden konnte, bevor sie aus dem rechten Ventrikel wieder austrat. Zunächst wurde das Tier für 1-2 min mit PBS perfundiert, bevor die Perfusionslösung gegen 4% Paraformaldehyd in PBS ausgetauscht wurde. Nach etwa 5 min wurde die Perfusion gestoppt und das Gehirn herauspräpariert. Anschließend wurde das Gewebe ü.N. bei 4°C in 4% Paraformaldehydlösung in PBS nachfixiert.

6.12.2 Paraffin-Einbettung

Die Gehirne oder Embryonen wurden nach der Fixierung mit 4% Paraformaldehydlösung ü.N. mit 0,1 M PBS gewaschen. Am nächsten Tag wurden die Präparate ü.N. in 70% EtOH inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe je für 1 h in 96% EtOH, 100% EtOH und in Xylol geschwenkt. Die Gehirne oder Embryonen wurden dann in einer Paraffin/Xylolmischung

(Volumenverhältnis 1:1) bei 65°C ü.N. gelagert. Nach mindestens 6 h Inkubation bei 65°C in reinem Paraffin wurden die Präparate mit Hilfe der Einbettstation eingebettet.

6.12.3 Anfertigung von Gewebeschnitten mit dem Mikrotom

Paraffin-eingebettete Gehirne oder Embryonen wurden zunächst in der gewünschten Orientierung mit Paraffin auf Ausgießförmchen aufgeblockt und in das Mikrotom gespannt. Anschließend wurden 4-8 µm dicke Schnitte angefertigt und in ein auf 37°C vorgeheiztes Wasserbad gegeben. Die Schnitte wurden dann auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte für mindestens 30 min bei 37°C getrocknet. Anschließend konnten die Schnitte bei 4°C gelagert oder direkt verwendet werden.

6.12.4 Anfertigung von Gewebeschnitten mit dem Kryostaten

Auf Trockeneisblöcken oder in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Gehirne oder Embryonen wurden mit dem Kryostaten geschnitten. Die Präparate wurden dazu in der gewünschten Orientierung mit Einbettmedium aufgeblockt. Für die "*Free Floating*"-Methode wurden 30-50 µm dicke Schnitte angefertigt, die direkt in die auf –20°C vorgekühlte Kryoprotekionslösung gegeben wurden. Die Schnitte konnten in der Lösung bei –20°C gelagert oder direkt auf Superfrost-Objektträger aufgezogen werden. Dünne Schnitte (bis zu 40 µm) wurden direkt von der Klinge auf Superfrost-Objektträger übertragen. Die Objektträger wurden anschließend auf einer Heizplatte für 30 min bei 37°C inkubiert und konnten anschließend bei –20°C gelagert oder direkt weiterverwendet werden.

6.12.5 Färbungen auf Paraffin-Schnitten mit polyklonalen Antikörpern

Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden mit einem Ultramikrotom 8 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gelegt. Die Schnitte wurden für 45 min bei RT in Xylol inkubiert um das Paraffin zu entfernen. Anschließend wurden die Präparate durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert (je 2 x 10 min 100%, 96% und 70% EtOH, 2 x 10 min H_2O) und für 3 min in 0,001 M Natriumcitrat pH 6,0 gewaschen. Um die Antigen-Epitope für die spätere Antikörperbehandlung zugänglich zu machen, wurden die Schnitte in der Natriumcitratlösung in einem Mikrowellengerät erhitzt (5 min 800 Watt, Abkühlung 10 min RT, 3 min 600 Watt, Abkühlung 20 min RT). Danach wurden die Präparate zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min bei RT in 0,1% Wasserstoffperoxyd in PBS inkubiert. Die Objektträger wurden zweimal mit PBS gewaschen, in eine Feuchtekammer gegeben und mit je 1 ml Blocklösung überschichtet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Blocklösung durch die

Lösung AK1 ersetzt. Die Schnitte wurden ü.N. bei 4°C in AK1-Lösung inkubiert, anschließend dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit der Lösung AK2 inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum dreimal 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT mit ABC-Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) wurde die Farbreaktion durchgeführt. Dazu wurde eine 0,005%ige DAB-Lösung (w/v) in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) hergestellt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde pro ml Färbelösung 0,75 µl Wasserstoffperoxyd zugegeben. Nach erfolgter Farbreaktion, die je nach Antikörper wenige Sekunden oder mehrere Minuten in Anspruch nehmen kann, wurden die Präparate zweimal mit 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) und mit PBS gewaschen und durch eine ansteigende Alkoholreihe entwässert (je 2 x 10 min 70%, 96% und 100% EtOH). Die Präparate wurden 2 x 5 min in Xylol inkubiert und mit DPX-Medium eingedeckelt.

6.12.6 Färbungen auf Paraffin-Schnitten mit monoklonalen Antikörpern

Für Immunfärbungen mit monoklonalen Antikörpern an Paraffin-Schnitten wurde das dafür vorgesehene M.O.M. Baukastensystem (Vectastain) verwendet. Zunächst wurden die Präparate wie in Abschnitt 6.12.5 beschrieben mit Xylol behandelt, durch eine Alkoholreihe rehydriert, zweimal in einer Mikrowelle erhitzt und mit H_2O_2 behandelt. Nach zweimaligem Waschen für 2 min mit PBS wurden die Schnitte mit Blocklösung überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschritten (2 min, PBS) wurden die Schnitte bei RT mit der Proteinlösung inkubiert. Die Lösung wurde nach 5 min entfernt und durch frische Proteinlösung mit dem primären Antikörper ersetzt. Nach 30 min wurden die Präparate zweimal für je 2 min mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit der den sekundären Antikörper enthaltenden Proteinlösung inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal 2 min mit PBS gewaschen und für 5 min mit dem ABC-Reagenz (Vectastain) behandelt. Nun wurden die Präparate für 5 min mit PBS gewaschen und in 0,05 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,4) inkubiert (5 min). Die Farbreaktion und das Einbetten der Schnitte wurden durchgeführt wie beschrieben (Abschnitt 6.12.5).

6.12.7 Kresylviolettfärbung

Gewebeschnitte, die mit Kresylviolett gefärbt werden sollten, wurden zunächst für 5 min in 70% EtOH inkubiert und 3 min mit H_2O gewaschen. Dann wurden die Präparate für 3 – 15 min in Färbelösung inkubiert. Nach erneutem Waschen mit H_2O wurden die Schnitte durch eine ansteigende Ethanolreihe entwässert (1 min 70% EtOH; 1 min 96% EtOH mit etwas Essigsäure;

2 x 1 min 96% EtOH; 2 x 2 min 100 % EtOH). Zuletzt wurden die Präparate 2 x 5 min in Xylol inkubiert und dann mit DPX eingedeckt.

6.12.8 Myelinfärbung an Gefrierschnitten nach Gallyas

Dieses modifizierte Protokoll basiert auf der von F. Gallyas entwickelten Methode zur selektiven Anfärbung von Myelin (Gallyas, F., 1979). Zunächst wurden wie in Abschnitt 6.12.4 beschrieben 30 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Die Präparate wurden durch eine ansteigende Ethanolreihe behandelt (15 min 70% EtOH, 5 min 80% EtOH, 5 min 90% EtOH, 5 min 100% EtOH). Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann für 30 min in Pyridin/ Essigsäureanhydridlösung bei RT inkubiert. Die auf diese Weise behandelten Präparate wurden zweimal für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen für 1 h bei RT in Inkubationslösung inkubiert. Dann wurden die Schnitte dreimal für 10 min in 0,5% Essigsäure gegeben. Die Entwicklung erfolgte durch Inkubation der Präparate in Entwicklungslösung unter ständiger Bewegung für 3-5 min bei RT. Die Färbereaktion wurde durch dreimaliges Waschen der Schnitte für je 10 min in 1% Essigsäure beendet, sobald die Gehirnschnitte eine grau-braune Farbe annahmen. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und dreimal je für 5 min in Xylol inkubiert. Danach konnten die Präparate in Kanadabalsam eingedeckt werden. Die Objekte wurden für zwei Tage im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

6.13 Stereologische Untersuchungen an Gewebeschnitten

Für die stereologischen Untersuchungen wurde das Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss) sowie das für dieses Mikroskop entwickelte Stereologieprogramm verwendet.

6.13.1 Volumenbestimmung nach Cavalieri

Zunächst wurden von in Paraffin eingebetteten Maus-Gehirnen 8 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt. Jeder Schnitt wurde auf Objektträger aufgezogen. Die lateralen Grenzen der IC wurden mikroskopisch bestimmt. Für das unvoreingenommene zufällige Auswahlverfahren wurde mit einem Würfel eine Zahl zwischen 1 und 6 ausgewählt. Daraufhin wurde, beginnend mit dem Schnitt, der die durch den Würfel ermittelte Schnittnummer trug, jeder zehnte Schnitt zur Auswertung herangezogen. Mit Hilfe des Stereologieprogramms wurden die Flächen der IC in den zufällig ausgewählten Schnitten wie folgt bestimmt. Ein regelmäßiges Punktraster, von dem jeder Punkt mit einer definierten Fläche assoziiert war, wurde zufällig über die zu

vermessende Fläche gelegt. Jeder Punkt, der sich innerhalb der IC befand, wurde gezählt. Das Volumen der IC wurde dann nach folgender Formel bestimmt:

$$V = T * A * \sum_{i=0}^{n} P_i$$

mit:

V	Volumen
T	Abstand der vermessenen Schnitte voneinander (hier 10 x 8 µm)
A	die mit jedem Punkt assoziierte Fläche
i	Schnittnummer
n	Zahl der gemessenen Schnitte
P_i	Zahl der Punkte, die innerhalb der zu vermessenen Fläche lagen

6.13.2 Zellvolumenbestimmung nach dem "*Point Sampled Intercept*"-Verfahren

Für die Größenbestimmung der Neurone wurde das „P*oint-Sampled Intercept*“ – Verfahren angewandt. Dafür wurden zunächst mit 50 µm dicke koronale Gefrierschnitte von Mausgehirnen angefertigt. Jeder Schnitt wurde auf Objektträger aufgezogen. Der zu vermessende Bereich wurde mikroskopisch bestimmt. Für eine unvoreingenommene zufällige Auswahl wurde der erste zu messende Schnitt durch Würfeln ausgewählt. Jeder fünfte darauffolgende Schnitt wurde für die Analyse herangezogen. Bei 40facher Vergrößerung wurde die Fläche des IC mit Hilfe des Stereologieprogramms in ein Raster unterteilt, dessen Rastergröße der Bildgröße einer Aufnahme entsprach. Per Zufallsgenerator wurde jedes n-te Bild aufgenommen. Über die so ausgewählten Einzelbilder wurde zufällig ein regelmäßiges Punkteraster gelegt. Jede Zelle, die von einem Punkt getroffen wurde, wurde vermessen. Dazu wurde der Umfang der zu messenden Zellen mit dem Zeichenwerkzeug des Stereologieprogramms umfahren. Das Programm misst daraufhin die Länge mehrerer zufällig ausgewählter isotroper Linien, die durch den Punkt des Punkterasters führen und deren Start- und Endpunkte auf dem gezeichneten Umfang der Zelle liegen. Das Volumen einer Zelle wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{p}{3n} * \sum_{i=0}^{n} {L_i}^3$$

mit:

V Volumen der Zelle

L_i i-te gemessene Abschnittslänge der einzelnen Zelle

n Anzahl der gemessenen Abschnittslängen der Zelle

Das mittlere Zellvolumen wurde aus allen gemessenen Einzelzellen durch Mittelwertbildung bestimmt.

6.14 BrdU Inkorporation

Proliferierende Zellen replizieren in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus ihre chromosomale DNA unter Verwendung der Nukleotide Desoxy-Adenosin, -Thymidin, -Guanosin und -Cytidin. 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) kann von der DNA-Polymerase anstelle des Desoxy-Thymidins in die DNA eingebaut werden. Zellen, die BrdU in ihre DNA inkorporiert haben, können durch Gebrauch eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU und eines Fluorochrom-gekoppelten zweiten Antikörpers nachgewiesen werden. Zur Detektion proliferierender Zellen wurde das *In Situ Cell Proliferation Kit FLUOS* (Roche) verwendet. Für die *in vivo* BrdU-Markierung von Mäuseembryonen wurden schwangere Mäuse mit 50 mg pro kg Körpergewicht BrdU-Markierungsreagenz intraperitoneal injiziert. Die Markierung erfolgte entweder einmalig oder kumulativ.

6.14.1 Kumulative BrdU-Inkorporation

Die kumulative BrdU-Inkorporation ist ein Verfahren, das verwendet wird, um sehr langsam proliferierende Zellen zu markieren, oder um einen Markierungs-Index zu erstellen. Um Zellteilungen im adulten Mäusehirn nachzuweisen, wurden ein Jahr alte Mäuse über 10 Tage jeden Tag einmal mit 50 mg pro kg Körpergewicht BrdU-Markierungsreagenz behandelt. Die Tiere wurden nach weiteren 28 Tagen getötet, und die Gehirne wurden isoliert. Es wurden nach der "*Free Floating*" – Methode 30 µm dicke Schnitte unter Verwendung eines Cryostaten angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger gelegt, luftgetrocknet und anschließend 20 min bei –20°C in Ethanol fixiert.

Um die Zellproliferation im Embryo zu studieren, wurde schwangeren Muttertieren über einen Zeitraum von 6 h dreimal BrdU-Markierungsreagenz intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurden die Muttertiere getötet. Junge Embryonen (bis E12.5) wurden vollständig in Paraffin eingebettet; von älteren Tieren wurde nur der Kopf oder das Gehirn verwendet. Mit einem Ultramikrotom wurden 4 – 8 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt.

Die Gewebeschnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (70%, 80%, 90%, 100% EtOH) und durch zweifache Xylolbehandlung entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70% EtOH) gefolgt von dreimaligem Waschen in PBS rehydriert. Durch kurzes Erhitzen der Schnitte in einem Mikrowellengerät wurde die Doppelstrang-DNA geschmolzen, wodurch die antikörpervermittelte Detektion des BrdU ermöglicht wurde *(Antigen-Retrieval).* Nach Abkühlen der Schnitte wurden die Objektträger in eine Feuchtekammer gelegt, mit Anti-BrdU-Arbeitslösung überschichtet und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal mit PBS gewaschen, wieder in die Feuchtekammer gegeben und mit ausreichender Menge Anti-Maus-Ig-Fluorescein Arbeitslösung überschichtet. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine DNA-Gegenfärbung mit Propidiumiodid. Schließlich wurden die Präparate mit Eindeckmedium eingedeckt und konnten im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Für die Bestimmung der Zellzyklusparameter der proliferierenden Zellen in den Mittelhirnregionen von 16 Tage alten $En1^{+/+}$ und $En1^{+/Wnt1}$ Mausembryonen wurden ebenfalls kumulative BrdU-Markierungsexperimente durchgeführt. Muttertiere erhielten am 16. Schwangerschaftstag in Abständen von vier Stunden wiederholt intraperitoneale Injektionen des BrdU-Markierungsreagenz (50mg/kg Körpergewicht). Die letzte Injektion erfolgte jeweils 30 min vor der Entnahme der Embryonen. Die Gesamtdauer der Markierung betrug 4, 8, 12, 16, 20 oder 30 Stunden. Die Embryonen wurden nach der BrdU-Behandlung durch Dekapitation getötet. Nach der Isolation der Gehirne wurden die Mittelhirnregionen mit Uhrmacherpinzetten isoliert. Die Gewebe wurden von Hirnhäuten befreit, einzeln in 500 µl einer 0,8%igen Glucose / PBS–Lösung gegeben und durch 30-40faches Auf- und Abpippetieren mit einer 1 ml Pipette zu einer Einzelzellsuspension weiterverarbeitet. Die Suspension wurde für 5 min bei 4°C mit 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl eiskaltem PBS resuspendiert und unter starkem Schütteln (Vortex) langsam in 5 ml auf –20°C kaltes 70% EtOH geträufelt. Die Zellsuspension konnte nun bis zu der durchflusszytometrischen Messung bei 4°C gelagert werden.

6.15 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die in der Protokollsammlung „Flow Cytometry“ aus der Serie „Methods in Cell Biology“ beschriebenen Methodenprotokolle verwendet (Darzynkiewicz, Z. Ed., 1994).

6.15.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellkernen

Für die Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellkernen aus den IC adulter *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse wurden die Tiere zunächst getötet. Nachdem das Gehirn herauspräpariert worden war, wurden die IC mit Hilfe eines Skalpells oder einer Rasierklinge isoliert und mechanisch zerkleinert.

Die Lösungen I und II wurden unmittelbar vor der Verwendung mit 10 µg/ml Propidiumiodid versetzt. Das Gewebe wurde für 1 h bei RT unter ständigem Schütteln in 500 µl Lösung I inkubiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein feinporiges Netz (Maschengröße 75 µm) filtriert. Vor der Messung wurde die Zellsuspension mit 500 µl Lösung II behandelt und kurz aber kräftig durchmischt. Die Messung der Propidiumiodid-Fluoreszenzintensität sowie der Vorwärts- und Seitenstreuung erfolgte mit dem FACSstar^{+} Zellsortierer von Becton Dickinson (Argon-Laser, Anregung mit 488 nm Wellenlänge). Nach der Messung wurden mit Hilfe der Vorwärts- und Seitenstreuung Meß-Begrenzungen (*Gates*) gesetzt, um Zellbruchstücke aus der Messung zu entfernen. Anschließend wurden Begrenzungen in einem Diagramm, in dem die Propidiumiodid-Fluoreszenzintensität gegen die Zahl der Zellen aufgetragen wurde, entsprechend der Zellzyklusphasen (G1/0, S und G2/M) gesetzt und die Zahl der Zellen innerhalb der jeweiligen Begrenzungen bestimmt. (Nüsse, M. *et al.*, 1994).

6.15.2 Bestimmung des BrdU-Markierungsindexes von Mittelhirnzellen 16 Tage alter Embryonen

Die Bestimmung der Zellzyklusparameter erfolgte durch kumulative BrdU-Markierung (s. Abschnitt 6.14.1) gefolgt von einer durchflusszytometrischen Analyse der vereinzelten und mit anti-BrdU Primärantikörpern und Fluorescein-gekoppelten sekundären Antikörpern behandelten Mittelhirnzellen. Nach dem Setzen von Begrenzungen, um unspezifische Zellbruchstücke von der Messung auszuschließen, wurde die Zahl der BrdU-positiven Zellen sowie der BrdU-negativen Zellen bestimmt. Es wurden auch die Zellzyklusparameter (siehe Abschnitt 6.15.1) gemessen.

6.16 Elektronenmikroskopie

Für die Ultrastrukturanalyse der vergrößerten Neurone wurden zunächst adulte *En1*$^{+/+}$ und *En1*$^{+/Wnt1}$ Mäuse perfundiert (s. Abschnitt 6.12.1). Nach der Entnahme der Gehirne wurden kleine Gewebeblöcke aus den IC isoliert, die nachfolgend in Epoxy-Kunstharz eingebettet wurden. Es wurden Semi-Dünnschnitte (Schnittdicke 1 µm) angefertigt, bis die gewünschte Schnittebene erreicht wurde (dorso-kaudale Bereiche der IC). Anschließend wurden mit einem

Ultramikrotom Ultradünnschnitte hergestellt (Schnittdicke 75 nm). Als Kontrastmittel wurden Uranylacetat/Bleicitrat verwendet. Für die Aufnahmen wurde das Transmissionselektronen-mikroskop EM10CR (Zeiss) verwendet.

6.17 ß-Galaktosidase Färbung

Die *E.coli* β-Galaktosidase ist eine Glykosidase, die β-Galaktoside hydrolytisch in β-Galaktose und einen entsprechenden Rest spaltet. Bei der Spaltung von X-Gal, eines synthetischen Substrates für das Enzym, entsteht ein blauer Farbstoff. Zellen oder Gewebe, in denen β-Galaktosidase exprimiert wird, können auf diese Weise angefärbt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden β-Galaktosidase Färbungen an Embryonen und embryonalen Neuralrohrpräparationen durchgeführt. Dazu wurden die Präparate in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA) für 15 min bei RT fixiert und anschließend dreimal je 15 min mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden in die Färbelösung gegeben und bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung erkennbar war. Zur Lagerung wurden die Embryonen bzw. Gewebe mit PBS gewaschen und in 4% PFA bei 4°C gelagert.

6.18 Southernblot Analyse

Die Southernblotanalyse (Southern, E. M., 1975) ist ein Verfahren, das zur Genotypisierung bzw. Mutationsanalyse herangezogen werden kann. Genomische DNA wird dazu mit spezifischen Restriktionsendonukleasen enzymatisch fragmentiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und immobilisiert. Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gefolgt von mehreren Wasch-Schritten ist es schließlich möglich, ein oder mehrere DNA-Fragmente bestimmter Sequenz und Größe autoradiografisch zu detektieren, und auf diese Weise den Genotyp des Tieres zu bestimmen.

6.18.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Für die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde das Megaprime Baukastensystem (Amersham) verwendet. 25-50 ng des in H_2O gelösten, unmarkierten DNA-Fragments wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit H_2O auf ein Endvolumen von 28 µl gebracht. Nach Zugabe von 5 µl Primer-Lösung wurde der Ansatz für 5 min bei 95°C inkubiert, dann 1 min auf Eis abgekühlt und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Dem Ansatz wurden 10 µl 5 x Markierungspuffer, 5 µl P^{32}-dCTP (entspricht einer Radioaktivität von 50 µCi) sowie 2 µl Klenow-Polymerase zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde kräftig

durchmischt und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide erfolgte für 30 min bei 37°C. Die radioaktiv markierte Sonde wurde unter Verwendung einer Reinigungssäule (Microspin S-300, Amersham) von den nicht eingebauten Nukleotiden befreit. Dazu wurde das Reaktionsgemisch auf die Säule gegeben und für 2 min bei 740 x g zentrifugiert. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurden 2 µl des Eluats in ein Zerfallsmessgerät gegeben. Die Sonde wurde nur verwendet, wenn mehr als 60000 Zerfälle pro Minute registriert wurden.

6.18.2 Restriktionsverdau, gelelektrophoretische Auftrennung und Transfer genomischer DNA

Pro Restriktionsansatz wurden bis zu 50 µg aus ES-Zellen, embryonalen Dottersäcken oder aus Mäuseschwänzen gewonnener genomischer DNA verwendet. Jeder Ansatz enthielt neben der DNA noch folgende Bestandteile:

3 µl	10 x Puffer
1,5 µl	Restriktionsenzym (40 U/µl)
1,2 µl	Spermidin (0,1 M)
0,3 µl	RNase A (10 mg/ml)
ad 30 µl	Wasser

Der DNA-Verdau erfolgte ü.N. bei 37°C in feuchter Umgebung. Anschließend wurde die DNA in einem 0,8%igem TAE-Agarose-Gel elektrophoretisch entsprechend der Fragmentgröße aufgetrennt. Das Gel wurde für 10 min in einer Depurinierungslösung geschwenkt, um DNA-Fragmente, die für den nachfolgenden Kapillartransfer zu groß sind (>7 kbp), zu zerkleinern. Im Anschluss wurde das Gel zweimal für 20 min in Denaturierungslösung und einmal für 30 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Für den DNA-Transfer wurde 10 x SSC in eine Plastikwanne gegeben. Eine Acrylglasplatte wurde so auf die Wanne gelegt, dass an zwei gegenüberliegenden Enden ein Spalt bestehen blieb. Ein Whatman 3MM-Filterpapierbogen wurde entsprechend der Wannengröße zurechtgeschnitten, kurz in 10 x SSC getränkt und dann auf die Acrylglasplatte gelegt, wobei die Papierenden in die 10 x SSC – Lösung eintauchten. Sechs Filterpapiere und eine Nylonmembran wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde kurz mit H_2O angefeuchtet, die Filterpapiere wurden in 10 x SSC getränkt. Die Bestandteile der Transferkammer wurden in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf den großen Filterpapierbogen aufgebracht (von unten nach oben): drei Filterpapiere, das Gel (invers), die Nylonmembran, drei Filterpapiere. Dieser Aufbau wurde von einer Plastikfolie

umgrenzt, um einen Flüssigkeitstransfer nur durch das Gel zu erlauben. Darüber wurden mehrere Lagen (mindestens 5 cm) trockenes, saugfähiges Papier gelegt. Der ganze Aufbau wurde mit einem ca. 500 g schweren Gewicht beschwert. Während einer Transferzeit von 12 - 24 h wurde die 10 x SSC-Lösung über Kapillarkräfte durch das Gel in die trockenen Papiertücher gesogen, wobei die DNA mittransportiert wurde und an der Membran haften blieb (Kapillartransfer). Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit 2 x SSC gespült, luftgetrocknet und anschließend um die DNA kovalent an die Membran zu binden mit 120 mJ UV-Licht (254 nm) bestrahlt. So hergestellte Membranen konnten bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

6.18.3 Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre gegeben und mit 10 ml Hybridisierungspuffer für mindestens 4 h in einem Hybridisierungsofen bei 65°C prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und dann direkt dem Hybridisierungspuffer zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C ü.N. im Hybridisierungsofen. Anschließend wurde die ungebundene oder unspezifisch gebundene Sonde entfernt. Dazu wurde die Membran nach folgendem Schema unter ständigem Schwenken gewaschen:

Waschlösung I	RT	20 min
Waschlösung II	40°C	20 min
Waschlösung III	65°C	20 min

6.18.4 Autoradiographie

Die hybridisierte Membran wurde leicht luftgetrocknet, in Folie eingeschweißt und in eine Autoradiografiekassette mit Intensivierungsfolie geklebt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm eingelegt. Der Film wurde bei -80°C exponiert. Die Expositionszeit richtete sich nach der Intensität der Signale und betrug typischerweise 24 - 48 h. Anschließend wurde der Film unter Verwendung einer Entwicklungsmaschine (Agfa, Curix 60) entwickelt.

7 Anhang

Danksagungen

Ich möchte all denen ganz herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dazu gehört an erster Stelle mein Betreuer Prof. Dr. Wolfgang Wurst, der es mir ermöglicht hat, in seiner Forschungsgruppe die faszinierende Welt der Entwicklungs-Neurogenetik kennen zu lernen und einen Mosaikstein zu der Aufklärung der Mittel-/Hinterhirnentwicklung beizusteuern. Dankbar bin ich auch für die Freiräume bei der Gestaltung und Durchführung der Forschungsarbeit, die meine Kreativität, mein selbständiges Denken und Handeln gefördert haben. Mein Dank gilt auch den Professoren Dr. E. Grill, Dr. A. Gierl und Ph.D. G. A. Manley für ihre freundliche Bereitschaft, meine Doktorarbeit zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen. Außerdem bin ich Dr. Daniela Vogt Weisenhorn für ihre großartige Unterstützung im Bereich der morphologischen und histologischen Analyse und darüber hinaus, und nicht zuletzt auch für ihre Freundschaft, sehr dankbar. Dr. Veronique Blanquet sowie Frau Annerose Kurz-Drexler möchte ich für die von ihnen geleisteten Vorarbeiten zur Etablierung der *En1*$^{+/Wnt1}$ Mutanten danken, ohne die das Projekt vielleicht nie entstanden wäre. Dr. Wolfgang Beisker war mir bei der Analyse der Zellzyklusparameter durch seine exzellente Expertise eine große Hilfe, und ich möchte mich für seine Bereitschaft bedanken, mir trotz der immer umfangreicher gewordenen Messungen tatkräftig zur Seite zu stehen. Dr. Ulrich Heinzmann und Frau Luise Jennen möchte ich herzlich für die Hilfe bei der elektronenmikroskopischen Analyse der vergrößerten Neurone danken. Jordi, Harry, Claude, den übrigen Wissenschaftlern aus unserer Gruppe und auch unseren hervorragenden TAs möchte ich herzlich danken für die vielen hilfreichen Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen, sowie für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, die ich nie für selbstverständlich angesehen habe. Nicht zuletzt möchte ich auch unseren Tierpflegern Resi, Rosi, Monika und Mario für die gute Zusammenarbeit und ihre über das normale Maß weit hinausgehende Hilfsbereitschaft danken.

Abkürzungen

A	Purinbase Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	*bovine serum albumin* bzw. Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Bq	Becquerel
°C	Grad Celsius
cDNA	*copyDNA*
Ci	Curie; 1 Ci = 3,7 x 10^{10} Bq
cpm	Zählungen pro Minute (*counts per minute*)
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA/ DNS	*desoxyribonucleic acid* bzw. Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1, 4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(b-Aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraacetat
ES	embryonale Stammzellen
EtBr	Ethydiumbromid
EtOH	Ethanol
µ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
mRNA/ mRNS	*messenger ribonucleic acid* bzw. Boten-Ribonukleinsäure
MT	Mutante
n	Stichprobenumfang
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	*polymerase chain reaction* bzw. Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Picomol
RACE	*rapid amplification of cDNA ends*
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)
s.	siehe
SDS	*sodium dodecyl sulfate* bzw. Natriumdodecylsulfat
sog.	Sogenannt
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydroxymethyl-aminoethan
tRNA/ tRNS	*tranfer ribonucleic acid* bzw. Tranfer-Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
U	*unit(s)* / Einheit(en)

evtl.	eventuell	**u.U.**	unter Umständen
F	Farad	**UV**	Ultraviolett
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s2)	**V**	Volt
g	Gramm	**Vol.**	Volumen bzw. Volumenanteil
G	Purinbase Guanin	**WT**	Wildtyp
h	Stunde	**w/v**	Gewichtsanteile pro Volumen
i.d.R.	in der Regel	**X-Gal**	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
I.E.	Internationale Einheiten	**z.B.**	zum Beispiel
ISH	*in situ* Hybridisierung	**ZNS**	zentrales Nervensystem
kbp	Kilobasenpaare	**z.T.**	zum Teil
LB	Luria Broth		
min	Minute(n)		
M	Molar		
MHO	Mittelhirn-/Hinterhirn - Organisationszentrum		
MHR	Mittelhirn-/Hinterhirnregion		

8 Literatur

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., und Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**, 3797-3804.

Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., und Brulet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2-/- mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* **121**, 3279-3290.

Adams, K. A., Maida, J. M., Golden, J. A., und Riddle, R. D. (2000). The transcription factor Lmx1b maintains Wnt1 expression within the isthmic organizer. *Development* **127**, 1857-1867.

Adler, P. N. und Lee, H. (2001). Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 635-640.

Ang, S. L., Conlon, R. A., Jin, O., und Rossant, J. (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse Otx2 in ectoderm explants. *Development* **120**, 2979-2989.

Ang, S. L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L., und Rossant, J. (1996). A targeted mouse Otx2 mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* **122**, 243-252.

Backman, S. A., Stambolic, V., Suzuki, A., Haight, J., Elia, A., Pretorius, J., Tsao, M. S., Shannon, P., Bolon, B., Ivy, G. O., und Mak, T. W. (2001). Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.* **29**, 396-403.

Baeg, G. H. und Perrimon, N. (2000). Functional binding of secreted molecules to heparan sulfate proteoglycans in Drosophila. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 575-580.

Baldock, R. A., Bard, J. B. L., Davidson, D. R., und Lawson, K. (1998). The Edinburgh Mouse Atlas: Staging Criteria. *The Medical Research Council and University of Edinburgh*

Bally-Cuif, L., Cholley, B., und Wassef, M. (1995). Involvement of Wnt-1 in the formation of the mes/metencephalic boundary. *Mech. Dev.* **53**, 23-34.

Bally-Cuif, L. und Wassef, M. (1994). Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development* **120**, 3379-3394.

Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. und Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**:638-642

Bejsovec, A. und Martinez, A. A. (1991). Roles of wingless in patterning the larval epidermis of Drosophila. *Development* **113**, 471-485.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., und Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-230.

Bienz, M. und Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311-320.

Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., Beckingham, K., und Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97**, 865-875.

Bouillet, P., Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Dolle, P., und Chambon, P. (1995). Sequence and expression pattern of the Stra7 (Gbx-2) homeobox- containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev. Dyn.* **204**, 372-382.

Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O., und 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**, 1253-1264.

Broccoli, V., Boncinelli, E., und Wurst, W. (1999). The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer. *Nature* **401**, 164-168.

Brott, B. K. und Sokol, S. Y. (2002). Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol. Cell Biol.* **22**, 6100-6110.

Calvo, J. L., Carbonell, A. L., und Boya, J. (1991). Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* **566**, 333-336.

Carden, M. J., Trojanowski, J. Q., Schlaepfer, W. W., und Lee, V. M. (1987). Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J. Neurosci.* **7**, 3489-3504.

Celio, M. R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**, 375-475.

Clarke, S. R., Shetty, A. K., Bradley, J. L., und Turner, D. A. (1994). Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* **5**, 1885-1888.

Coelho, C. M. und Leevers, S. J. (2000). Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms? *J. Cell Sci.* **113 (Pt 17)**, 2927-2934.

Coleman, J. R., McDonald, A. J., Pinek, B., und Zrull, M. C. (1992). The inferior colliculus: calbindin and parvalbumin immunoreactivity in neural grafts. *Exp. Neurol.* **115**, 142-145.

Conlon, I. und Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell* **96**, 235-244.

Conlon, I. J., Dunn, G. A., Mudge, A. W., und Raff, M. C. (2001). Extracellular control of cell size. *Nat. Cell Biol.* **3**, 918-921.

Cork, R. J., Baber, S. Z., und Mize, R. R. (1998). Calbindin-D28k- and parvalbumin-immunoreactive neurons form complementary sublaminae in the rat superior colliculus. *J. Comp Neurol.* **394**, 205-217.

Cotter, D., Honavar, M., Lovestone, S., Raymond, L., Kerwin, R., Anderton, B., und Everall, I. (1999). Disturbance of Notch-1 and Wnt signalling proteins in neuroglial balloon cells and abnormal large neurons in focal cortical dysplasia in human cortex. *Acta Neuropathol. (Berl)* **98**, 465-472.

Crossley, P. H., Martinez, S., und Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**, 66-68.

Dahlstrand, J., Lardelli, M., und Lendahl, U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **84**, 109-129.

Danielian, P. S. und McMahon, A. P. (1996). Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* **383**, 332-334.

Darzynkiewicz, Z. Ed.; Darzynkiewicz, Z. (Hrsg.) (1994). Methods in Cell Biology. Academic Press, San Diego, USA Ed. 2

Dickinson, M. E., Krumlauf, R., und McMahon, A. P. (1994). Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* **120**, 1453-1471.

Ding, V. W., Chen, R. H., und McCormick, F. (2000). Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 32475-32481.

Djiane, A., Riou, J., Umbhauer, M., Boucaut, J., und Shi, D. (2000). Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in Xenopus laevis. *Development* **127**, 3091-3100.

Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L., und Moon, R. T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2625-2634.

Dufner, A. und Thomas, G. (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell Res.* **253**, 100-109.

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., und Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* **25**, 1439-1451.

Evans, M. J. und Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.

Favor, J., Sandulache, R., Neuhauser-Klaus, A., Pretsch, W., Chatterjee, B., Senft, E., Wurst, W., Blanquet, V., Grimes, P., Sporle, R., und 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**, 13870-13875.

Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., und Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* **16**, 1472-1487.

Floss, T., Arnold, H. H., und Braun, T. (1996). Myf-5(m1)/Myf-6(m1) compound heterozygous mouse mutants down-regulate Myf-5 expression and exert rib defects: evidence for long-range cis effects on Myf-5 transcription. *Dev. Biol.* **174**, 140-147.

Frame, S. und Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**, 1-16.

Gallyas, F. (1979). Silver staining of myelin by means of physical development. *Neurol. Res.* **1**, 203-209.

Garda, A. L., Echevarria, D., und Martinez, S. (2001). Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmic organizer. *Mech. Dev.* **101**, 111-118.

Ghosh, M. (2002). Immunohistochemistry in CNS. *A. Vincent Thamburaj - WWW*

Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A. B., und Joyner, A. L. (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* **269**, 679-682.

Hanselmann, R. G. und Oberringer, M. (2001). Polyploidization: a Janus-faced mechanism. *Med. Hypotheses* **56**, 58-64.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., und Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway [see comments]. *Science* **281**, 1509-1512.

He, X, Saint-Jeannet, J.P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I., und Varmus, H. (1997). A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652-1654.

Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C., und Wilson, S. W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* **405**, 76-81.

Henery, C. C. und Kaufman, M. H. (1992). Relationship between cell size and nuclear volume in nucleated red blood cells of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos. *J. Exp. Zool.* **261**, 472-478.

Hogan, B., Beddington, R. S., Constantini, F., und Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B., und Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**, 431-436.

Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G. und Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**:2-11.

Huelsken, J. und Birchmeier, W. (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 547-553.

Johnston, G. C., Pringle, J. R., und Hartwell, L. H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Exp. Cell Res.* **105**, 79-98.

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

Joyner, A. L. und Martin, G. R. (1987). En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the Drosophila engrailed gene: expression during embryogenesis. *Genes Dev.* **1**, 29-38.

Joyner, A. L. ed.; Joyner, A. L. (Hrsg.) (1993). Gene targeting. Oxford University Press, Oxford

Joyner, A. L. ed. und Wurst, W. (1993). Production of targeted embryonic stem cell clones. In Gene Targeting. A practical approach., Joyner, A. L. (Hrsg.). Oxford University Press, Oxford

Knaus, P., Betz, H., und Rehm, H. (1986). Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J. Neurochem.* **47**, 1302-1304.

Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R., und Moon, R. T. (2000). The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279-283.

Kwon, C. H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L. L., Tharp, R., Smeyne, R. J., Eberhart, C. G., Burger, P. C., und Baker, S. J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.* **29**, 404-411.

Lee, M. K., Tuttle, J. B., Rebhun, L. I., Cleveland, D. W., und Frankfurter, A. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* **17**, 118-132.

Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* **25,** 402-405

Li, L., Mao, J., Sun, L., Liu, W., und Wu, D. (2002). Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J. Biol. Chem.* **277**, 5977-5981.

Liu, A. und Joyner, A. L. (2001b). Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 869-896.

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

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

Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., und Niehrs, C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-325.

Marin, F. und Puelles, L. (1994). Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus. *Dev. Biol.* **163**, 19-37.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**, 7634-7638.

Martinez, S. (2001). The isthmic organizer and brain regionalization. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 367-371.

Martinez, S. und Alvarado-Mallart, R. M. (1990). Expression of the homeobox Chick-en gene in chick/quail chimeras with inverted mes-metencephalic grafts. *Dev. Biol.* **139**, 432-436.

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

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

Martinez, S., Wassef, M., und 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**, 971-981.

Matsunaga, E., Katahira, T., und Nakamura, H. (2002). Role of Lmx1b and Wnt1 in mesencephalon and metencephalon development. *Development* **129**, 5269-5277.

Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A., und Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**, 701-713.

McEwen, D. G. und Peifer, M. (2000). Wnt signaling: Moving in a new direction. *Curr. Biol.* **10**, R562-R564.

McGrew, L. L., Takemaru, K., Bates, R., und Moon, R. T. (1999). Direct regulation of the Xenopus engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in Xenopus. *Mech. Dev.* **87**, 21-32.

McMahon, A. P. und Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073-1085.

McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., und McMahon, J. A. (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**, 581-595.

Medina, A., Reintsch, W., und Steinbeisser, H. (2000). Xenopus frizzled 7 can act in canonical and non-canonical wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis [In Process Citation]. *Mech. Dev.* **92**, 227-237.

Megason, S. G. und McMahon, A. P. (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* **129**, 2087-2098.

Memberg, S. P. und Hall, A. K. (1995). Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *J. Neurobiol.* **27**, 26-43.

Meyers, E. N., Lewandoski, M., und Martin, G. R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* **18**, 136-141.

Millen, K. J., Wurst, W., Herrup, K., und Joyner, A. L. (1994). Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development* **120**, 695-706.

Miller, J. R. (2002). The wnts. *Genome Biol.* **3**, reviews3001.1-3001.15-

Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E., und Joyner, A. L. (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* **401**, 161-164.

Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., und Thomas, G. (1999). Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* **285**, 2126-2129.

Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M., und Perrimon, N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**, 1644-1646.

Mungale, S. D. und Lalitha, V. S. (1988). Neurofilament protein as a reliable neuronal marker. *Indian J. Med. Res.* **87**, 73-79.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., und Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 8424-8428.

Nakamura, H., Takagi, S., Toshiaki, T., Matsui, K. A., und Fujisawa, H. (1988). The prosencephalon has the capacity to differentiate into the optic tectum: Analysis by chick-specific monoclonal antibodies in quail-chick chimeric brains. *Dev. Growth Differ.* **30**, 717-725.

Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A., und Edgar, B. A. (1998b). Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. *Cell* **93**, 1183-1193.

Neufeld, T. P. und Edgar, B. A. (1998a). Connections between growth and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 784-790.

Nusse, R. (1992). The Wnt gene family in tumorigenesis and in normal development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 9-12.

Nusse, R. (1999). WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet.* **15**, 1-3.

Nusse, R. (2002). The Wnt gene Homepage. *WWW*

Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., und Varmus, H. (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family [letter]. *Cell* **64**, 231-

Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y. K., und Varmus, H. (1984). Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* **307**, 131-136.

Nusse, R. und Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**, 99-109.

Nusse, R. und Varmus, H. E. (1992). Wnt genes. *Cell* **69**, 1073-1087.

Nüsse, M., Beisker, W., Kramer, J., Miller, B. M., Schreiber, G. A. *et al.* (1994). Measurement of micronuclei by flow cytometry. In Methods in Cell Biology, Darzynkiewicz, Z. (Hrsg.). Academic Press, San Diego, USA Ed. 2, 149-158.

Olson, E. N., Arnold, H. H., Rigby, P. W., und Wold, B. J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* **85**, 1-4.

Papkoff, J. (1994). Identification and biochemical characterization of secreted Wnt-1 protein from P19 embryonal carcinoma cells induced to differentiate along the neuroectodermal lineage. *Oncogene* **9**, 313-317.

Parr, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G., und McMahon, A. P. (1993). Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* **119**, 247-261.

Pham, C. T., MacIvor, D. M., Hug, B. A., Heusel, J. W., und Ley, T. J. (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 13090-13095.

Piedra, M. E., Delgado, M. D., Ros, M. A., und Leon, J. (2002). c-Myc overexpression increases cell size and impairs cartilage differentiation during chick limb development. *Cell Growth Differ.* **13**, 185-193.

Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J., und Skarnes, W. C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535-538.

Pixley, S. K. und de Vellis, J. (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* **317**, 201-209.

Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* **14**, 1837-1851.

Polakis, P., Hart, M., und Rubinfeld, B. (1999). Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **470**, 23-32.

Queva, C., Hurlin, P. J., Foley, K. P., und Eisenman, R. N. (1998). Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Oncogene* **16**, 967-977.

Rattner, A., Hsieh, J. C., Smallwood, P. M., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., und Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 2859-2863.

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

Rhinn, M., Dierich, A., Le Meur, M., und Ang, S. (1999). Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development* **126**, 4295-4304.

Rogers, J. H. (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.* **105**, 1343-1353.

Roose, J. und Clevers, H. (1999). TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1424**, M23-M37.

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

Sakanaka, C., Sun, T. Q., und Williams, L. T. (2000). New steps in the Wnt/beta-catenin signal transduction pathway. *Recent Prog. Horm. Res.* **55**, 225-236.

Salic, A., Lee, E., Mayer, L., und Kirschner, M. W. (2000). Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts. *Mol. Cell* **5**, 523-532.

Santamaria, P. (1983). Analysis of haploid mosaics in Drosophila. *Dev. Biol.* **96**, 285-295.

Sauer, B. (1993). Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol.* **225**, 890-900.

Schuhmacher, M., Staege, M. S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U. H., Bornkamm, G. W., Eick, D., und Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr. Biol.* **9**, 1255-1258.

Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M., und Gruss, P. (1997). Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14518-14523.

Schwenk, F., Baron, U., und Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5080-5081.

Shamim, H., Mahmood, R., Logan, C., Doherty, P., Lumsden, A., und Mason, I. (1999). Sequential roles for Fgf4, En1 and Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain. *Development* **126**, 945-959.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., und Ben Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 5522-5527.

Simeone, A. (2000). Positioning the isthmic organizer where Otx2 and Gbx2 meet. *Trends Genet.* **16**, 237-240.

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

Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B., und Moon, R. T. (1997). Modulation of embryonic intracellular Ca2+ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* **182**, 114-120.

Smalley, M. J. und Dale, T. C. (1999). Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 215-230.

Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., und Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690.

Smith, C. M. und Luskin, M. B. (1998). Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Dev. Dyn.* **213**, 220-227.

Smolich, B. D., McMahon, J. A., McMahon, A. P., und Papkoff, J. (1993). Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1267-1275.

Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T., und Melton, D. A. (1991). Injected Wnt RNA induces a complete body axis in Xenopus embryos. *Cell* **67**, 741-752.

Solbach, S. und Celio, M. R. (1991). Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat. Embryol. (Berl)* **184**, 103-124.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

St Clair, M. H., Lambe, C. U., und Furman, P. A. (1987). Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 844-849.

Stocker, H. und Hafen, E. (2000). Genetic control of cell size. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 529-535.

Sugiyama, S., Funahashi, J., Kitajewski, J., und Nakamura, H. (1998). Crossregulation between En-2 and Wnt-1 in chick tectal development. *Dev. Growth Differ.* **40**, 157-166.

Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M., und Martin, G. R. (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev.* **13**, 1834-1846.

Szarski, H. (1976). Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* **44**, 93-111.

Tada, M. und Smith, J. C. (2000). Xwnt11 is a target of Xenopus Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* **127**, 2227-2238.

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P., und He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-535.

Tanaka, A., Miyamoto, K., Minamino, N., Takeda, M., Sato, B., Matsuo, H., und Matsumoto, K. (1992). Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 8928-8932.

Tetsu, O. und McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-426.

Theiler (1989). The House Mouse: Atlas of Mouse Development. Springer-Verlag, New York

Thomas, K. R. und Capecchi, M. R. (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* **346**, 847-850.

Torres, M., Gomez-Pardo, E., und Gruss, P. (1996). Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* **122**, 3381-3391.

Torres, M. A., Yang-Snyder, J. A., Purcell, S. M., DeMarais, A. A., McGrew, L. L., und Moon, R. T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development. *J. Cell Biol.* **133**, 1123-1137.

Urbanek, P., Fetka, I., Meisler, M. H., und Busslinger, M. (1997). Cooperation of Pax2 and Pax5 in midbrain and cerebellum development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 5703-5708.

Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F., und Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79**, 901-912.

van't Veer, L. J., van Kessel, A. G., van Heerikhuizen, H., van Ooyen, A., und Nusse, R. (1984). Molecular cloning and chromosomal assignment of the human homolog of int-1, a mouse gene implicated in mammary tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.* **4**, 2532-2534.

Wallingford, J. B., Rowning, B. A., Vogeli, K. M., Rothbacher, U., Fraser, S. E., und Harland, R. M. (2000). Dishevelled controls cell polarity during Xenopus gastrulation. *Nature* **405**, 81-85.

Wallingford, J. B., Vogeli, K. M., und Harland, R. M. (2001). Regulation of convergent extension in Xenopus by Wnt5a and Frizzled-8 is independent of the canonical Wnt pathway. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 225-227.

Wang, T. C., Cardiff, R. D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A., und Schmidt, E. V. (1994). Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* **369**, 669-671.

Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., Martinez, S., und Martin, G. R. (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* **124**, 2923-2934.

Watanabe, Y. und Nakamura, H. (2000). Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development* **127**, 1131-1140.

Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., und DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**, 527-530.

Weigmann, K., Cohen, S. M., und Lehner, C. F. (1997). Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of Drosophila Cdc2 kinase. *Development* **124**, 3555-3563.

Wilkinson, D. G. (1992). Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. In In Situ Hybridization: A Practical Approach, Wilkinson, D. G. (Hrsg.). IRL Press, Oxford

Wilkinson, D. G., Bailes, J. A., und McMahon, A. P. (1987). Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell* **50**, 79-88.

Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., und Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687.

Wurst, W., Auerbach, A. B., und 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**, 2065-2075.

Wurst, W. und Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 99-108.

Zarbalis, K. und Wurst, W. (2000). Expression domains of murine ephrin-A5 in the pituitary and hypothalamus. *Mech. Dev.* **93**, 165-168.

Zettel, M. L., Frisina, R. D., Haider, S. E., und O'Neill, W. E. (1997). Age-related changes in calbindin D-28k and calretinin immunoreactivity in the inferior colliculus of CBA/CaJ and C57Bl/6 mice. *J. Comp Neurol.* **386**, 92-110.