

Molekulare Mechanismen  
zur Steuerung tangentialer Zellwanderungen  
im embryonalen Gehirn der Maus

genehmigte  
Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades  
Der Technischen Universität Darmstadt am Fachbereich  
Biologie D17

vorgelegt von  
Stefanie Flunkert  
geb. in Recklinghausen

1. Referent: Prof. Dr. T. Holstein
2. Referent: Prof. Dr. P. Layer
3. Referent: Prof. Dr. H. Wässle

eingereicht am: 08.09.2004  
mündliche Prüfung: 30.11.2004

„Was euch unterscheidet, macht euch schön“

Reamonn, 2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Entwicklung und Struktur des zentralen Nervensystems	2
1.2	Neuronale Segmentierung	3
1.3	Neurogenese	4
1.4	Neuronale Zellwanderung	5
1.4.1	Radiale Wanderung	6
1.4.2	Tangentiale Wanderung	8
1.4.3	Tangentiale Wanderungen im Cortex	8
1.4.4	Tangentiale Wanderungen von der rhombischen Lippe	9
1.5	Mechanismen neuronaler Wanderung	13
1.6	Eph Rezeptoren und ihre Liganden	23
1.7	YT-P <sub>hPax6</sub> -tTA transgene Mäuse	28
1.8	Zielsetzung und experimentelles Vorgehen	30
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
2.1	Material	32
2.1.1	Geräte	32
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.3	Eigene Subklonierungen	40
2.1.4	Antikörper	43
2.1.5	Versuchstiere, Zelllinien und Bakterienstämme	43
2.2	Methoden	44
2.2.1	DNA Standardmethoden	44
2.2.2	Kultur und Transformation von Zelllinien	44
2.2.3	c-Myc/HA Färbung von Zellkulturen	45
2.2.4	Verpaarung und Präparation von Embryonen	46
2.2.5	Genexpressionsanalyse	46
2.2.6	Elektroporation der Medulla, Präparation und Kultur	49
2.2.7	Transplantationsexperimente	51
2.2.8	Kollagenkokultur	51
2.2.9	Apoptosedetektion mit der TUNEL-Methode	53

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
3.1	Expressionsmuster von möglichen regulatorischen Proteinen der tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons	54
3.1.1	Expressionsmuster der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden im embryonalen Gehirn der Wildtyp-Maus	55
3.1.2	Expressionsmuster von Netrin-3 im embryonalen Gehirn der Wildtyp- Maus	60
3.2	Prinzip der YT-P <sub>hPax6</sub> -tTA transgenen Mäuselinie	62
3.2.1	Expressionsanalyse der YT-P <sub>hPax6</sub> -tTA transgenen Mäuselinie	62
3.2.2	Schematische Darstellung des pes in Kultur	66
3.2.3	Vergleich des pes <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	68
3.3	Grundlegende Mechanismen des pes	69
3.4	Kollagenkokultur Experimente	78
3.5	Bedeutung des Unc5H3 Rezeptors für den pes	81
3.6	Vergleichende Expressionsstudie von Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und Unc5H1-4	96
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>116</b>
4.1	Die YT- <sub>PhPax6</sub> -tTA transgene Mäuselinie	116
4.2	Expression von möglichen regulatorischen Proteinen	117
4.3	Der posteriore extramurale Wanderungsstrom (pes)	119
4.4	Die Bedeutung des Unc5H3 Rezeptors für den pes	122
4.5	Die Funktion des Unc5H3 als „dependence receptor“	123
4.6	Weitere wichtige Proteine des pes	124
4.7	Tangentiale Wanderung des Olivenstroms	125
4.8	Tangentiale Wanderung des anterioren extramuralen Wanderungsstroms (aes)	126
4.9	Tangentiale Wanderung von der oberen rhombischen Lippe ins Cerebellum	127
4.10	Tangentiale Wanderungen im Telencephalon	129
4.11	Tangentiale Wanderung in den Bulbus olfactorius	130

<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>132</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	
7.1	Übersetzung der lateinischen Begriffe	135
7.2	Transplantationsversuche	135
7.3	Apoptoseversuch	137
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>138</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung		Protein
AES/aes	anteriorer extramuraler Wanderungsstrom	GD	Gyrus dentatus
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	GDI	(engl.) guanine nucleotide dissociation inhibitors
bp	Basenpaare	GEF	(engl.) guanine nucleotide exchange factors
BP	Bodenplatte	GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
c	caudal	GPI	Glycosylphosphatidylinositol
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	GTPase	Guanosintriphosphatase
CA1-3	Cornu ammonis1-3, Region des Hippocampus	HEK	(engl.) human embryonal kidney cells
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	hPax6	menschliches Pax6
CB	Cerebellum	IC	intrazelluläre Domäne
CMV	Cytomegalievirus	IgG	Gamma Immunoglobulin
COS	Nieren-Fibroblasten-Zelllinie CV1	IO	inferiore Olive
CTX	Cortex	IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
DCC	(engl.) deleted in colorectal cancer	ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
DD	(engl.) death domain	IV	vierter Ventrikel
DIE	Diencephalon	kDa	Kilodalton
DIV	(engl.) Tage in Kultur	KS	Körnerzellschicht
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LA	lamellare Auswüchse
E	Embryonaltag (Nacht der Befruchtung = E0, Tag darauf = E0,5)	MAGE	Melanoma Antigenkodierendes Gen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MAP1B	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B
EF	Endfortsatz	MCS	(engl.) Multiple cloning side
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor	MES	Mesencephalon
EGFP	(engl.) Enhanced GFP	ML	Marklager
EGFPm	EGFP molekular exprimiert	mPax6	murines Pax6
EGFPmn	EGFP nukleär exprimiert	MS	Molekularschicht
EGL	äußere Körnerzellschicht	N	Nucleus
engl.	Englisch	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
et al.	et alteri	NCL	Nucleus cuneatus lateralis
ETL-1	humane Erythropoetin produzierende hepatozelluläre Karzinoma Zelllinie	NP	Nucleus pontis
FF	Führungsfortsatz	NRAGE	(engl.) neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog
Fig.	Figur	NRL	Nucleus reticularis lateralis
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure	NRTP	Nucleus reticularis tegmenti ponti
GAP	GTPase aktivierendes	NTN2L	(engl.) Netrin-2-like
		oRL	obere rhombische Lippe

OS	Olivenstrom	RHO	Rhombencephalon
P	Postnataltag (Tag der Geburt = P0)	RNA	Ribonucleinsäure
Pax	Paired box oder Paired box-enthaltendes Gen	Robo	Roundabout
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	RTK	Tyrosinkinase Rezeptoren
PDZ	konservierte Sequenz von 90 Aminosäuren in den Proteinen <u>PSD95</u> / <u>SAP90</u> , <u>DLG</u> ( <i>Drosophila discs-large protein</i> ) und <u>Z01</u>	SAM	(engl.) sterile alpha motif
PE	pseudopodiale Endigung	Sey	„Small Eye“ Maus (Pax6-Mutante)
PES/pes	posteriore extramurale Wanderung	SK	Spinalkanal
PEST	Aminosäure Motiv, das zytoplasmatische Proteine zum schnellen proteolytischen Abbau angreifen soll	Tab.	Tabelle
PFA	Paraformaldehyd	TEL	Telencephalon
P <sub>hPax6</sub>	Pax6-Promotor	TetR	Tetracyclin-kontrollierter Repressor aus <i>E. coli</i>
PS	Purkinjzellschicht	TRE	(engl.) tTA response element
r	rostral	TSP	Thrombospondin
rcm	(engl.) rostral cerebellar malformation	tTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
RG	radiale Gliazelle	Unc	(engl.) uncoordinated
RGM	(engl.) repulsive guidance molecule	uRL	untere rhombische Lippe
		VP1	Transkriptionsaktivierungsdomäne aus Herpes simplex-Virus
		YAC	(engl.) Yeast Artificial Chromosome= künstliches Hefechromosom
		ZNS	Zentralnervensystem
		ZU	Zonula occludens

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

# 1 Einleitung

Während der Ontogenese des Zentralnervensystems (ZNS) wandern Vorläuferzellen von ihrem Entstehungs- zu ihrem Bestimmungsort. Dort differenzieren sie zu reifen Neuronen aus. Es werden zwei Formen der Zellwanderung, die radiale und die tangential Wanderung, unterschieden. Tangentiale Wanderungen findet man sowohl im Cortex als auch im Hirnstamm. Hierbei wandern die Zellen parallel zur Hirnoberfläche, jedoch nicht entlang von radialen Gliazellen.

In dieser Arbeit sollen die grundlegenden Mechanismen, die funktionelle Rolle von Netrin-1 und seinen Rezeptoren (DCC, Neogenin, Unc5H1-4), des Netrin-3 sowie der Eph Rezeptoren und ihrer Liganden für die tangentialen Wanderungen im Rhombencephalon der Maus untersucht werden. Der Schwerpunkt diese Studie liegt auf der posterioren extramuralen Wanderung, da diese auf Grund ihres zeitlichen und räumlichen Verlaufs besonders gut mit den zur Verfügung stehenden Methoden untersucht werden kann. Über den posterioren extramuralen Wanderungsstrom ist bis heute nur sehr wenig bekannt, ein Einfluß von Netrin-1 auf diese Wanderung konnte aber bereits nachgewiesen werden. Daher ist es naheliegend, daß auch die Netrin-1 Rezeptoren entscheidend an der Wanderung beteiligt sind. Auf welche Weise dies jedoch geschieht, ist nicht bekannt und bedarf daher einer näheren Untersuchung. Der Schwerpunkt bei dieser Untersuchung liegt auf dem Unc5H3 Rezeptor. Durch eine vergleichende Studie des Netrin-1 und seiner Rezeptoren DCC, Neogenin und Unc5H1-4 sollen mögliche Interaktionen dieses Rezeptor-Liganden Komplexes deutlich gemacht werden.

Das Protein Netrin-3 ist bekannt als Netrin Homolog, daher wird ein möglicher Einfluß dieses Proteins auf die rhombencephalen Wanderungen untersucht. Desweiteren ist ein Einfluß der Eph Rezeptoren und ihrer Liganden für Proliferation, Differenzierung, Überleben der Zellen und Zellwanderung nachgewiesen worden. (Kilpatrick et al., 1996; Karam et al., 2000). Daher wird auch ihre Bedeutung für die rhombencephalen Wanderungen untersucht.

Zum besseren Verständnis der durchgeführten Experimente und der daraus resultierenden Ergebnisse wird im Folgenden ein Einblick in die Entwicklung und Struktur des zentralen Nervensystems der Maus gegeben. Weiterhin wird der Vorgang der Neurogenese und der Zellwanderung erläutert. Daran anschließend werden die an



der Zellwanderung beteiligten und somit für die Arbeit relevanten Proteine vorgestellt und abschließend die durchgeführten Experimente dargestellt und diskutiert.

Bei der Verwendung von anatomischen Strukturen wird in dieser Arbeit immer der lateinische Begriff verwendet. Eine Tabelle mit den deutschen Übersetzungen findet sich im Anhang (Tab. 7.1).

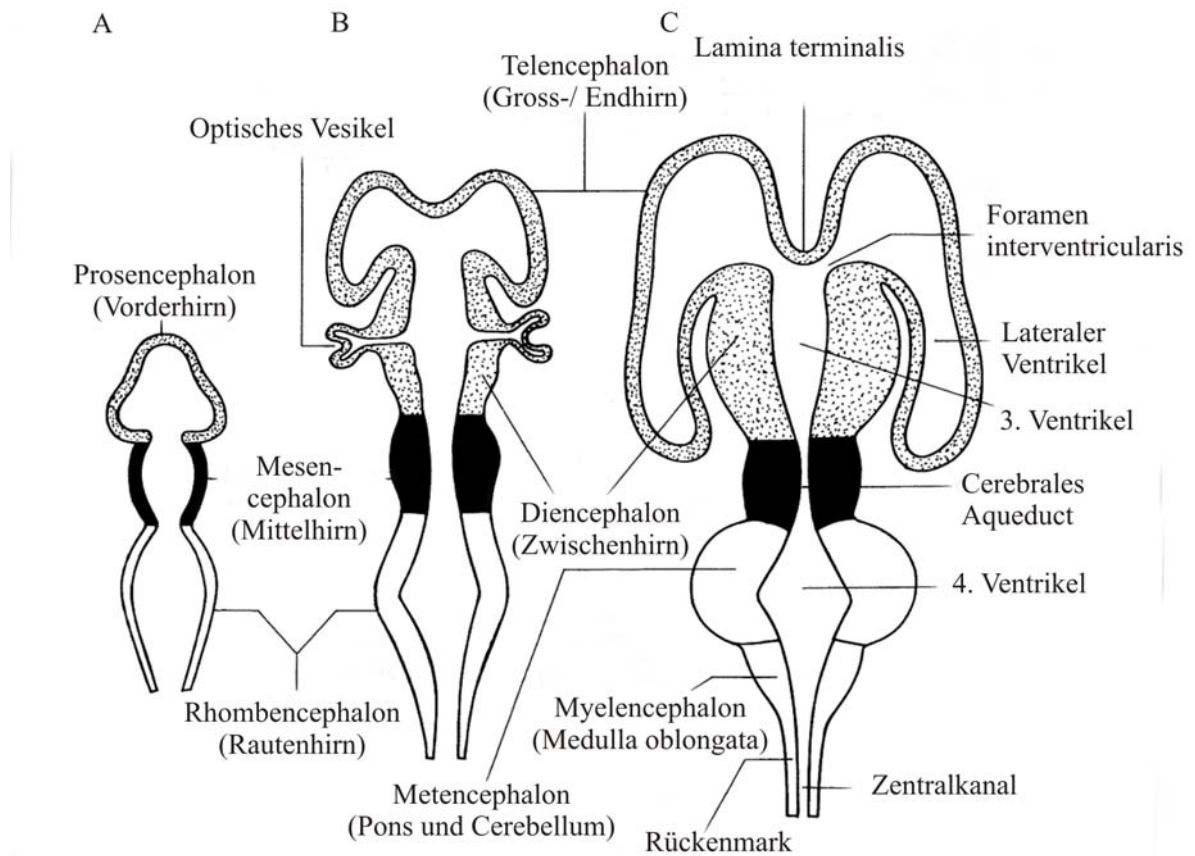
### **1.1 Entwicklung und Struktur des zentralen Nervensystems**

In der frühen Entwicklung des Embryos werden drei Keimblätter unterschieden: Endoderm, Mesoderm und Ektoderm. Aus dem letzteren entsteht das Neuroektoderm, das wiederum eine spezialisierte Region, die Neuralplatte, bildet. Aus der Neuralplatte entsteht der größte Teil des Nervensystems. Dazu vertieft sich die Neuralplatte zur Neuralrinne, senkt sich nach unten in Richtung des Mesoderms und schnürt sich schließlich als Neuralrohr ab. Am Rand der Neuralrinne separiert sich die Neuralleiste. Diese liefert vor allem das Zellmaterial des peripheren Nervensystems.

Aus dem rostralen Ende des Neuralrohrs bildet sich das Gehirn. Aus dem caudalen Teil entsteht das Rückenmark. Der Hohlraum des Neuralrohrs differenziert sich zum Ventrikelsystem.

Nachdem sich das Neuralrohr rostral und caudal geschlossen hat bilden sich im rostralen Bereich drei Hirnbläschen: Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon. Diese drei Bläschen werden auch als Primärbläschen bezeichnet.

Das Prosencephalonbläschen differenziert sich weiter in Diencephalon- und Telencephalonbläschen, das Rhombencephalonbläschen in Myelencephalon- und Metencephalonbläschen aus. Das letztere wird noch in ein Cerebellumbläschen differenziert. Diese fünf Bläschen werden auch als Sekundärbläschen bezeichnet (Abb. 1).



**Abb. 1: Frühe Differenzierung des Gehirns und Rückenmarks der Maus**

A: E8,5: Die drei primären Hirnbläschen: Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon sind vorhanden. B: E9: Der vordere Teil des Prosencephalons bildet die zwei telencephalischen Hemisphären, während der caudale Bereich des Telencephalons das Diencephalon bildet. Auf jeder Seite und zwischen diesen Geweben differenzieren sich die optischen Vesikel aus. Der rostrale Bereich des Rhombencephalons bildet das Metencephalon, der caudale Bereich das Myelencephalon. C: E11: Entlang der embryonalen Achse differenziert sich das Neuralrohr zum Rückenmark aus, weiterhin wird das Ventrikelsystem gebildet (Verändert nach Kaufman & Bard, 1999).

## 1.2 Neuronale Segmentierung

Neuomere sind neuronale Segmente die ausgeprägte und transverse Teile des Neuralrohrs darstellen. Von seinen Nachbarn ist jedes Neuomer durch externe vertikale Abschnürungen separiert. Der Bereich eines Neuomers stimmt topografisch mit Zonen einer hohen mitotischen Rate überein, daher stellen sie Zentren der Proliferation dar. Entsprechend zur Ausbildung der Hirnbläschen können in der Maus vier verschiedene Neuomere unterschieden werden, die Prosomere des Prosencephalons (p1-3), die beiden Mesomere des Mesencephalons, die Rhombomere des Rhombencephalons (r1-7) und die Myelomere des Myelencephalons (Puelles & Rubenstein, 2003). Wieviele Neuomere jeder dieser Bereiche beinhaltet, ist je nach Spezies unterschiedlich. Im Huhn z.B. wurden 8 Prosomere, 2 Mesomere und 8 Rhombomere nachgewiesen (Vaage, 1969).

Die Zeitspanne, in der die Neuomere im Gehirn nachweisbar sind, ist nur sehr kurz (E9-E12). Neuomere scheinen daher eine wichtige Rolle in der frühen Musterbildung zu spielen (Lumsden & Keynes, 1989). Am meisten ist über die segmentale Expression von vermutlich regulatorischen Genen in den Rhombomere bekannt. Die Organisation der Rhombomere ist paarweise, d.h. Rhombomere mit gerader Nummer haben ähnliche molekulare und zelluläre Eigenschaften, Rhombomere mit ungerader Nummer haben dagegen einen dazu unterschiedlichen Satz von molekularen Eigenschaften. Durch diese alternierende Ausstattung der Rhombomere können die Zellen der einzelnen Segmente gut voneinander separiert werden. In der Maus findet sich eine solche komplementäre Expression z.B. bei den Homeoboxgenen der Hox-Familie sowie des zinc-finger-kodierenden Krox20 Gens, das in r3 und r5 exprimiert wird (Lumsden & Krumlauf, 1996). Neuere Studien zeigen außerdem eine komplementäre Expression der Rezeptor Tyrosinkinasen Eph und ihrer Liganden in den Rhombomeren der Maus. Hierbei sind die Rezeptoren EphA4, EphB2 und EphB3 in den Rhombomeren r3 und r5, die Liganden EphrinB1, EphrinB2 und EphrinB3 dagegen in den Rhombomeren r2, r4 und r6 exprimiert (Lumsden, 1999). Puelles und Rubenstein konnten 1993 die Expression von insgesamt 45 verschiedenen Genen in den Neuomeren nachweisen, daher stellen die hier genannten Gene nur eine kleine Auswahl dar (Puelles & Rubenstein, 1993, Nieuwenhuys, 1998).

### **1.3 Neurogenese**

Während der Entwicklung des Gehirns teilen sich neuronale Vorläuferzellen in der Ventrikulärzone des Neuralrohrs, dazu gehören auch die spezialisierten proliferativen Epithelien, u.a. im Bereich der rhombischen Lippe. Zu Beginn der Entwicklung sind die meisten Vorläuferzellen multipotent. Es können also sowohl Neurone als auch Gliazellen generiert werden (Price et al. 1987). Im Laufe der Entwicklung wird dieses Potential der neuronalen Stammzellen aber immer mehr auf bestimmte Zelltypen eingeschränkt. Welcher Typ von neuronaler Zelle dabei gebildet wird, ist abhängig von der Zelllinie der sich teilenden Vorläuferzelle und von Zell-Zell-Interaktionen (McConnell, 1991). Die gebildeten Neurone können sich nicht mehr, die Gliazellen dagegen können sich weiter teilen, selbst wenn sie die proliferative Zone bereits verlassen haben. Entsteht durch die Zellteilung eine Gliazelle, spricht man von „Gliogenese“, entsteht dagegen eine neuronale Zelle spricht man von „Neurogenese“ (Boulder Committee, 1970). Nach der Neurogenese einer neuronalen Vorläuferzelle

muß diese von ihrem Entstehungs- zu ihrem Bestimmungsort gelangen. Wie diese Wanderung vonstatten geht, soll im Folgenden näher erläutert werden.

#### **1.4 Neuronale Zellwanderung**

Neuronale Zellwanderung wird als Verschiebung des neuronalen Zellkörpers von seiner Ausgangsposition in seine Endposition definiert (Rakic, 1990). Dabei sind wandernde Neurone immer stark polarisiert. Wie auch in anderen Zelltypen besteht die neuronale Wanderung aus drei schematischen Schritten:

1. Neu gebildete Neurone haben grundsätzlich eine bipolare Struktur (Bradke & Dotti, 2000), daher muß vor Beginn der Wanderung eine Asymmetrie in der bipolaren Struktur entstehen. Durch die polarisierte Morphologie wird klar zwischen Führungs- und Endfortsatz der Zelle unterschieden. Die Bewegung des Führungsfortsatzes in der Mikroumwelt der Zelle ist durch die Lamellipodien und Filopodien, gekoppelt an eine lokale Aktin-Polymerisation, möglich (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Die Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit sowie das Auswachsen des Führungsfortsatzes sind abhängig von anziehenden und abstoßenden Signalen, die an der Plasmamembran verarbeitet werden („neurotrophe Theorie“, Ramon y Cajal, 1892).
2. Nach dem Auswachsen des Führungsfortsatzes folgt der Zellkern, und somit das ganze Soma der Zelle, dem Führungsfortsatz (Nukleokinese, Morris, 1998). Für diesen Prozeß ist eine vorstehende Kraft notwendig, die das Lamellipodien- und Filopodiennetzwerk der Zelle verstärkt. Gleichzeitig ist eine kontraktile Kraft notwendig, die vom Zytoskelett des Neurons ausgeht und einen aktiven Myosin-basierten Motor für die Vorwärtsbewegung des Zellsomas darstellt (Lambert et al., 2001; Lauffenburger & Horwitz, 1996).
3. Der Endfortsatz der Zelle wird an den Zellkörper herangezogen. Dafür ist ebenfalls die kontraktile Myosin-basierte Kraft notwendig (Lambert et al., 2001; Lauffenburger & Horwitz, 1996).

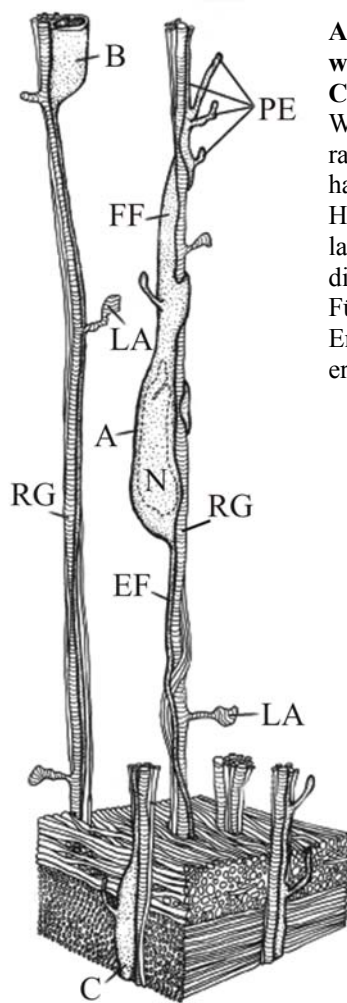
Am Ende ihrer Wanderung bilden die Neurone definierte Zellmuster (z.B. Nuclei, Colliculi, Cortexschichten). Diese Zellmusterbildung wird auch als vierter Schritt der Zellwanderung bezeichnet (Lambert et al., 2001).

Von ihrem Entstehungsort bis zu ihrer Wirkungsstätte müssen Neurone oft weite Strecken zurücklegen. Diese Strecke kann weniger als 100µm aber auch mehrere Zentimeter, je nach Wanderungsort oder Spezies, betragen. Die neuronale Wanderung kann entlang von radialen Gliazellen (gliophile Wanderung) oder entlang von

neuronalen Fortsätzen (neurophile Wanderung) geschehen. Weiterhin können Wanderungsströme anhand ihrer Richtung und Orientierung unterschieden werden. Bei der radialen Wanderung ziehen Neurone von der ventrikulären Zone zur pialen Oberfläche und senkrecht zum Ventrikel. Diese Art der Wanderung findet hauptsächlich in der frühen Entwicklung statt. Bei der tangentialen Wanderung bewegen sich die Neurone hauptsächlich parallel zur Hirnoberfläche. Diese Art der Wanderung erlaubt den Neuronen lange Strecken zu überwinden, z.B. von einem Hirngebiet in ein anderes.

#### **1.4.1 Radiale Wanderung**

Radiale Wanderung findet in all den Hirngebieten statt, in denen eine laminäre Struktur ausgebildet wird, z.B. cerebraler Cortex (3-6 Schichten), Hippocampus (3 Schichten), cerebellarer Cortex (3 Schichten). Damit bildet die radiale Wanderung den vorherrschenden Wanderungstyp im Gehirn. Der Beginn einer radialen Wanderung ist stets durch die Entstehung eines postmitotischen Neurons gekennzeichnet (Rakic, 1990). Das Neuron weist eine bipolare Struktur auf, bei der der Führungsfortsatz sich an eine radiale Gliazelle anlegt und den abgeflachten Zellkörper sowie den Endfortsatz hinter sich herzieht (Abb. 2). Die Wanderung ist saltatorisch, es folgen also Phasen des Stillstandes auf Phasen der Wanderung.



**Abb. 2: Dreidimensionale Rekonstruktion dreier radial wandernder Neurone (A-C) des sich entwickelnden cerebralen Cortex**

Wandernde Neurone der intermediären Zone sind eng mit einer radialen Gliazelle (RG, gestreift) verbunden. Die radialen Gliazellen haben kurze lamelläre Auswüchse (LA), die senkrecht zur Hauptachse verlaufen. Der Nucleus (N) des wandernden Neurons ist langgestreckt. Der Führungsfortsatz (FF) des wandernden Neurons ist dicker und reicher an Organellen als der Endfortsatz (EF). Jeder Führungsfortsatz endet in einer ganzen Reihe von pseudopodalen Endigungen (PE), die die Umgebung des wandernden Neurons erkunden (Verändert nach Sidman & Rakic; 1973).

Die radialen Gliazellen behalten während der Entwicklung Kontakt mit der Ventrikel- und der Piaoberfläche des Neuralrohrs und bieten den Neuronen damit ein Gerüst für ihre Wanderung (Ramon y Cajal, 1892). Bei diesen Gliazellen handelt es sich um Vorläuferzellen, die sich nach Beendigung der neuronalen Entwicklung sowohl in Neurone als auch in Astrozyten umbilden können (Heins et al., 2002; Miyata et al., 2001).

Ist ein radial wanderndes Neuron an seinem Ziel angekommen, löst es sich von der Gliazelle. Da die später wandernden Neurone sich distal (näher an der Piaoberfläche) von ihren Vorgängern niederlassen, spricht man bei dieser Art der Schichtenbildung auch von einer „inside-out“ Struktur. Mit fortschreitender Entwicklung wird die neuronale Schicht dicker und die Gliazellen müssen ihre Fortsätze länger gestalten. Bei einer Länge von bis zu 6mm (humane Hirnentwicklung) ist die Gliazelle mehr als 10 Mal länger als der Führungsfortsatz des wandernden Neurons. Nachdem die Neurone entlang der radialen Gliazelle gewandert sind, lösen sie ihren Endfortsatz von der

Ventrikeloberfläche, ziehen ihn zurück und erreichen auf diesem Weg ihr Ziel (Sidman & Rakic, 1973; Miyata et al., 2001).

#### **1.4.2 Tangentiale Wanderung**

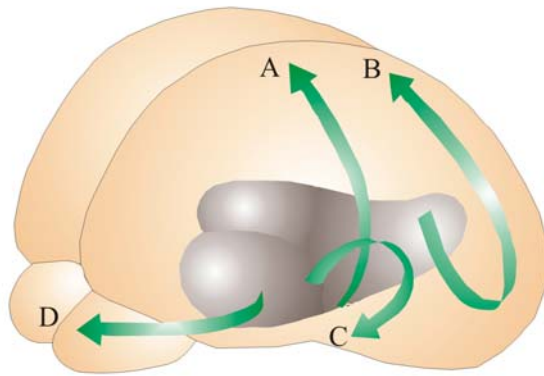
Die tangentielle Wanderung ist gekennzeichnet durch neuronale Wanderung entlang der Hirnoberfläche.

Die wandernden Neurone haben ähnlich wie bei der radialen Wanderung eine bipolare Struktur und bewegen sich ebenfalls saltatorisch. Für verschiedene tangentielle Wanderungen wurden dabei stets ähnliche Wanderungsgeschwindigkeiten gemessen (Gilthorpe et al., 2002). Gilthorpe geht davon aus, dass es sich bei der tangentialen Wanderung um eine Variante des axonalen Auswachsens handelt (Gilthorpe et al., 2002). Tangentielle Wanderungsströme können während der Entwicklung des Organismus im Cortex und auch im Rhombencephalon beobachtet werden.

#### **1.4.3 Tangentielle Wanderungen im Cortex**

Für den Cortex konnten bereits verschiedene tangentielle Wanderungswege beschrieben werden. Dabei handelt es sich bei allen wandernden Neuronen um Interneurone, zusätzlich sind möglicherweise auch Oligodendrozyten beteiligt (Corbin et al., 2001).

Die Neurone vom medialen und vom caudalen Ganglienhügel ziehen über unterschiedliche tangentielle Wege zum dorsalen Telencephalon (Abb. 3A, B). Neurone der cortical-striatalen Grenze ziehen zum ventrolateralen Telencephalon. Diese Wanderung wird auch als lateraler corticaler Wanderungsstrom bezeichnet (Abb. 3C). Die eingewanderten Neurone dieser drei Wanderungsströme stellen die größte Quelle der GABAergen Interneurone des Cortex. Die Neurone der dritten Wanderung scheinen aber auch eine Quelle für cholinerge Interneurone zu sein (Corbin et al., 2001, Maricich et al., 2001).



**Abb. 3: Tangentiale Wanderungen im Telencephalon**

A und B: Neurone des medialen (A) und caudalen (B) Ganglienhügels ziehen über unterschiedliche Wege zum dorsalen Telencephalon. C: Neurone der cortical-striatalen Grenze ziehen zum ventrolateralen Telencephalon. D: Neurone des lateralen Ganglienhügels ziehen zum Bulbus olfactorius (rostraler Wanderungsstrom). (Verändert nach Corbin et al., 2001).

Die Wanderungen dieser telencephalen Neurone sind nur in der embryonalen Entwicklung eines Organismus zu beobachten. Im Gegensatz dazu steht der rostrale Wanderungsstrom, bei dem die Neuroblasten ein Leben lang in den Bulbus olfactorius einziehen (Abb. 3D). Bei diesem rostralen Wanderungsstrom ziehen Interneurone vom lateralen Ganglienhügel zum Bulbus olfactorius und bilden dort die späteren Körnerzellen und Interneurone. Einen weiteren Unterschied zwischen diesen Wanderungen beschreibt die Theorie von Lois (1996). Danach bewegen sich die Zellen des rostralen Wanderungsstroms entlang einer Kette durch ein Rohr von Gliazellen und nicht entlang ihrer Fortsätze. Dieses gliale Rohr bietet den Neuronen eine gute Umwelt für die Wanderung, einen Hinweis auf die Richtung der Wanderung und es isoliert die Zellen vom Parenchym.

#### 1.4.4 Tangentiale Wanderungen von der rhombischen Lippe

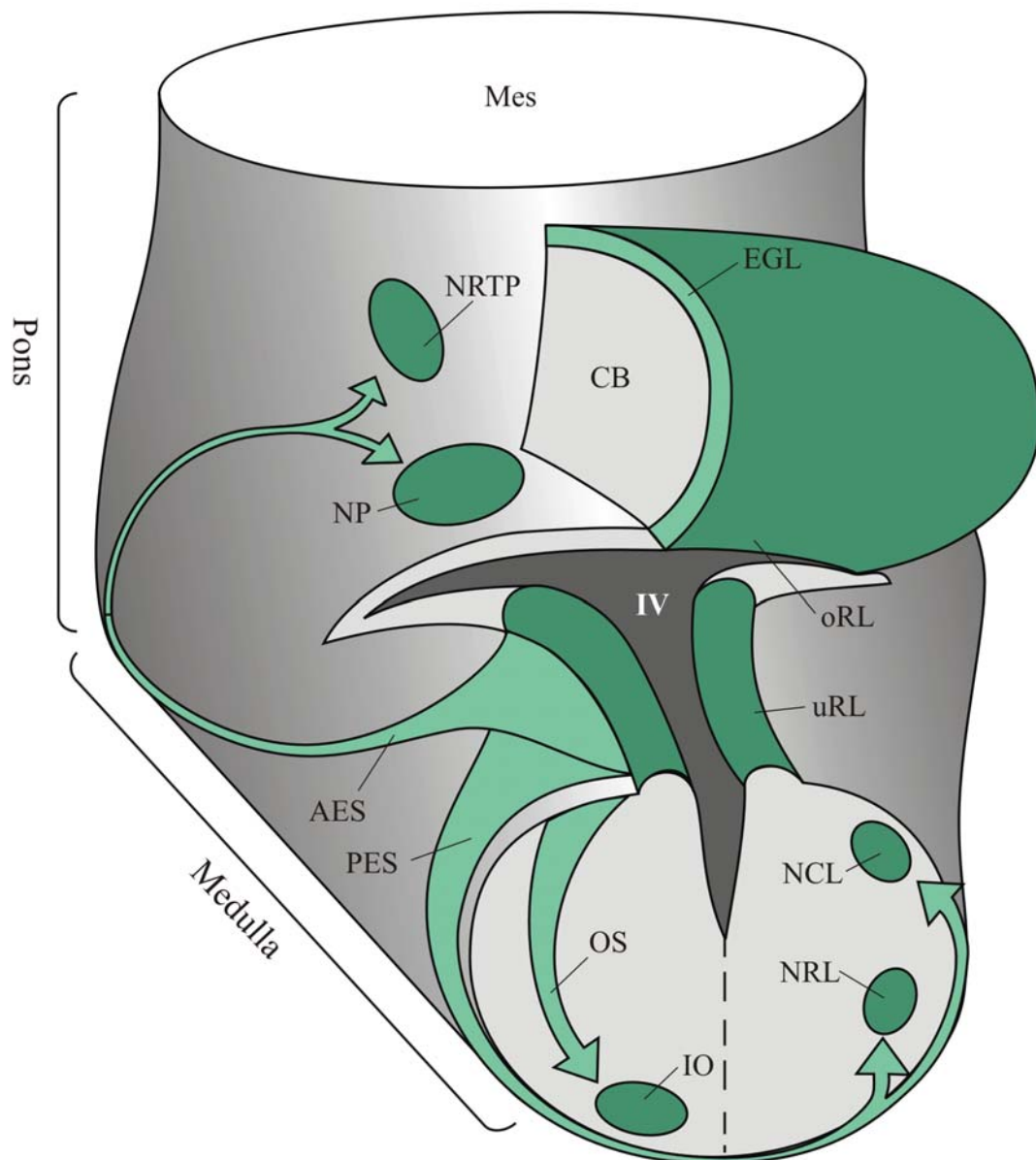
Das Rhombencephalon umschließt den vierten Ventrikel und enthält im dorsalen Bereich zwischen Flügel- und Dachplatte mehrere proliferative Neuroepithelien. Dazu gehören u.a. die untere und die obere rhombische Lippe. Die untere rhombische Lippe ist ein großer proliferativer Komplex, der die Neurone der präcerebellaren Nuclei bildet. Aus diesem proliferativen Komplex (ventrales Rhombencephalon) entstehen durch tangentialer Wanderung der Neurone fünf verschiedene Kerngebiete:

1. Oliva inferior
- 2.+3. Nucleus reticularis lateralis und Nucleus cuneatus externalis
- 4.+5. Nucleus reticularis tegmenti pontis und Nucleus pontis

Die obere rhombische Lippe ist Teil des hufeisenförmigen proliferativen Komplexes des Cerebellums. Im Gegensatz zur unteren rhombischen Lippe hat die obere rhombische Lippe (dorsales Rhombencephalon) drei proliferative Zonen aus denen die Körnerzellen



des späteren Cerebellums entstehen. Somit entsteht das Cerebellum durch konvergente Wanderung seiner Neurone aus verschiedenen proliferativen Zonen. Die präcerebellaren Nuclei dagegen werden durch divergente Wanderung seiner Neurone von nur einer proliferativen Zone gebildet (Altman & Bayer, 1987a). Eine weitere Besonderheit in der Wanderung der späteren Körnerzellen liegt in der Änderung ihrer Wanderungsrichtung und Wanderungsart. Nachdem die späteren Körnerzellen tangential entlang der pialen Oberfläche gewandert sind, ändern sie ihre Richtung und ziehen radial bis an ihren Wirkungsort (Abb. 4).



**Abb. 4: Tangentiale Wanderungen von der rhombischen Lippe**

Im Rhombencephalon verläuft rings um das Dach des vierten Ventrikels (IV) eine wulstartig verdickte Proliferationszone, die rhombische Lippe. Sowohl die untere rhombische Lippe (uRL) am dorsalen Rand der Medulla, als auch die obere rhombische Lippe (oRL) am ventralen Rand des Cerebellums (CB) sind Ursprungsorte tangentialer, neurophiler Wanderungen. Alle Neurone aus der rhombischen Lippe,

ausgeschlossen sind die Neurone des Olivenstroms (OS), exprimieren vor und während ihrer Wanderung Pax6. Von der oberen rhombischen Lippe ziehen die späteren Körnerzellen ins Cerebellum und bilden dort die äußere Körnerzellschicht (EGL). Von der unteren rhombischen Lippe gehen nacheinander drei Wanderungsströme aus. Als erstes wandern um E10,5 die Neurone des Olivenstroms zur ipsilateralen Oliva inferior (IO). Zwischen E12,5 und E13,5 wandern Neurone des posterioren extramuralen Wanderungsstroms (PES) rings um das Neuralrohr, kreuzen die Bodenplatte und lassen sich in den kontralateralen Nuclei reticularis lateralis (NRL) und cuneatus lateralis (NCL) nieder. Als letztes verlassen die Neurone des anterioren extramuralen Wanderungsstroms (AES) um E14,5 die untere rhombische Lippe, wandern um die Brückenbeuge herum, kreuzen dabei mehrere Rhombomergrenzen und lassen sich ipsilateral im Nucleus pontis (NP) und Nucleus reticularis tegmenti pontis (NRTP) nieder. Mes: Mesencephalon (Teilweise übernommen von K. Benzing, Doktorarbeit, 2002; Verändert nach: Altman & Bayer, 1987d).

### *Der Olivenstrom*

Die Neurone der Oliva inferior werden von der unteren rhombischen Lippe ab dem embryonalen Tag E9 gebildet. Von dort starten sie am Tag E10,5 ihre intramurale Wanderung (Olivenstrom/-streifen) durch das Parenchym zu ihrem ipsilateralen Zielgebiet. Diese Wanderung wurde unter verschiedenen Namen bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. So bezeichnete Harkmark (1954) diese Wanderung als „deep migration“, Ellenberger (1969) dagegen als „submarginal migration“ und Bourrat & Sotelo (1990) als „parenchymal migration“ (Abb. 4; Altman & Bayer, 1987b). Die Afferenzen erhalten die Neurone der Oliva inferior aus dem Rückenmark, dem cerebralen Cortex (motorische Areale), dem Nucleus caudatus und den tiefen Nuclei cerebellaris. Die Efferenzen dagegen gehen hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, als Kletterfasern ins Cerebellum (Harkmark, 1954; Ellenberger et al., 1969; Bourrat & Sotelo, 1990; Altman & Bayer, 1987b). Im Cerebellum bilden die Kletterfasern zahlreiche exzitatorische (Transmitter: Aspartat) Parallelkontakte mit den Dendritenbäumen der Purkinjezellen. Dabei verschaltet jeweils eine Kletterfaser auf bis zu 15 Purkinjezellen. Eine Purkinjezelle erhält aber nur von einer Kletterfaser Eingang (Trepel, 1999).

### *Der posteriore extramurale (cuneoreticuläre) Wanderungsstrom (pes)*

Die Neurone des Nucleus reticularis lateralis und Nucleus cuneatus lateralis werden von der unteren rhombischen Lippe am embryonalen Tag E10,5-12,5 gebildet. Von dort starten sie am embryonalen Tag E13 ihre extramurale Wanderung. Dabei wandern die Neurone zwischen der weißen Substanz und der Pia mater um das Neuralrohr herum und überqueren die Bodenplatte. Diese Wanderung wurde von Ellenberger (1969) als „marginal migration stream“ (mms) und von Harkmark (1954) als „superficial migration“ bezeichnet. Da die Neurone von beiden rhombischen Lippen gleichzeitig ihre Wanderung beginnen, kreuzen sie sich auf dem Weg zu ihren Zielgebieten. Nach

der Überquerung der Mittellinie lassen sich zuerst die Neurone des Nucleus reticularis lateralis und anschließend die Neurone des Nucleus cuneatus lateralis kontralateral nieder. Somit hat diese Wanderung zwei Komponenten, den lateralen reticulären und den lateralen cuneären Wanderungsstrom (Abb. 4; Altman & Bayer, 1987c).

Der Nucleus reticularis lateralis liegt dorsolateral zur Oliva inferior und kann in einen dorsalen und einen ventralen Bereich unterteilt werden. Die meisten Afferenzen erhält der Kern über das Rückenmark aus Bereichen der Vorder- und Hinterextremitäten. Die Efferenzen terminieren ipsilateral und topologisch als Moosfasern im anterioren Vermis und dem Lobus paramedian des Cerebellums (Altman & Bayer, 1987c). Die exzitatorischen Moosfasern (Transmitter: Glutamat) terminieren im Stratum granulosum des Cerebellums, wo sie mit Golgizellen und einer größeren Zahl kleiner Körnerzellen komplexe Synapsen und Synapsenkonglomerate (Glomerula cerebellaria) ausbilden (Trepel, 1999).

Der Nucleus cuneatus lateralis liegt lateral zum cuneären Nucleus und kann in einen dorsalen und einen ventralen Bereich unterteilt werden. Seine Afferenzen erhält der Nucleus über das Rückenmark aus Bereichen der Vorderextremitäten und des Nackens. Die Efferenzen terminieren ipsilateral und topologisch als Moosfasern im posterioren und anterioren Teil des Lobus anterior sowie dem Lobus paramedian des Cerebellums. Die Neurone des Nucleus reticularis lateralis und cuneatus lateralis unterscheiden sich von Neuronen aller anderen präcerebellaren Nuclei, in dem ihre cerebellaren Projektionen ausschließlich ipsilateral terminieren (Altman & Bayer, 1987c).

#### *Der anteriore extramurale Wanderungsstrom (aes; Brückenstrom)*

Die Neurone des Nucleus reticularis tegmenti pontis (NRTP) und des Nucleus pontis werden am embryonalen Tag E12,5-14,5 bzw. E14-15 in der unteren rhombischen Lippe gebildet und verlassen diese ab E12,5 bzw. E15,5. Anschließend wandern sie ipsilateral um die Brückenbeuge herum und lassen sich im NRTP und Nucleus pontis nieder. Bei dieser Wanderung kreuzen die Zellen mehrere Rhombomergrenzen. Diese Wanderung wurde von Harkmark (1959) als „superficial migration“ bezeichnet. Da die Neurone des späteren NRTP bereits zwei Tage vor den Neuronen des Nucleus pontis entstehen und sie außerdem ihre Wanderung einen Tag vor den Neuronen des Nucleus pontis beenden, kann diese anteriore extramurale Wanderung in zwei Komponenten unterteilt werden (Abb. 4; Altman & Bayer 1978, 1987d).

Der Nucleus pontis befindet sich an den absteigenden Fasern der Pyramidenbahn. Seine Afferenzen erhält der Nucleus aus corticalen Regionen, z.B. primärer und sekundärer somatosensorischer Cortex, motorischer und prämotorischer Cortex sowie visuellen Bereichen. Die Efferenzen des Nucleus pontis terminieren als Moosfasern im Cerebellum. Mit dieser Feedback-Verschaltung ist der Nucleus pontis eine synaptische Relaisstation zwischen dem cerebralen Cortex und dem Cerebellum (Altman & Bayer, 1978).

Der NRTP befindet sich nahe der Mittellinie, dorsal des Nucleus pontis und ist von diesem durch die Pyramidenfasern separiert. Seine Afferenzen erhält der Nucleus ebenfalls von verschiedenen corticalen Regionen, z.B. motorischen, prämotorischen und somatosensorischen Arealen. Die stärkste Quelle der Afferenzen stellen die tiefen cerebellaren Nuclei und der Nucleus vestibularis dar. Die meisten Efferenzen des NRTP erreichen das Cerebellum und terminieren dort als Moosfasern.

## 1.5 Mechanismen neuronaler Wanderung

### *Struktur und Funktion von Pax6*

Das Pax6 Protein gehört zur Familie der Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren mit einer Paired Domäne und einer Homöodomäne. Diese Domänen sind durch eine Linker-Region voneinander getrennt. Außerdem besteht eine C-terminale Prolin-, Serin- und Threonin-reiche Region. Zwischen den Spezies Mensch, Nager, Huhn, Fisch, Fliege und Wurm zeigt Pax6 eine starke Homologie. Dies beweist eine starke Konservierung des Proteins über den entwicklungsgeschichtlichen Zeitraum (Chi & Epstein, 2002: Review; van Heyningen & Williamson, 2002). Während der Entwicklung des ZNS wird Pax6 im Telencephalon, Diencephalon, Auge, Cerebellum, Rhombencephalon und im Neuralrohr exprimiert. Eine erste Expression des Proteins konnte im Neuralrohr nachgewiesen werden, noch einen Tag bevor Neurone gebildet werden (Mastick & Andrews, 2001). Eine Mißexpression von Pax6 hat Auswirkungen auf die Spezifikation dieser Zellen. So führen heterozygote Mutationen im Pax6 Gen beim Menschen zu starken Augenanomalien, der Aniridia oder Peters` Anomalie. Diese Krankheiten sind charakterisiert durch ein partielles oder totales Fehlen der Iris, Glaukoma, Katarakt oder eine Hypoplasie des Nervus opticus. Aniridia ist eine semidominant erbliche Mißbildung, die eine Häufigkeit von ca. 1:100.000 in der Bevölkerung hat. Mittlerweile sind Pax6 Mutationen im Wurm, Fliege, Ratte, Mensch und Maus bekannt. Die

bekannteste ist die *small eye (Sey)* Mutante in der Maus, in der ähnliche Augenanomalien beschrieben werden konnten wie bei der humanen Aniridia (Gehring, 1996; Gehring & Ikeo, 1999). In der Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutante der Maus kommt es sogar zu einem totalen Fehlen der Augen und nur wenige Stunden nach der Geburt zur Lethalität. Zusätzlich wurden in der *Sey* Mutante in der Hirnentwicklung große Unterschiede zum Wildtyp beschrieben, z.B. wird das Protein im Telencephalon in corticalen radialen Gliazellen exprimiert, in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutante ist das neurogenetische Potential dieser Zellen reduziert. Dies führt zu einer 50%igen Reduktion in der Anzahl der Neuronen des Cortex. Das Potential von nicht radialen Gliazellen ist zur gleichen Zeit aber nicht reduziert. Dies läßt sich durch die Abstammung der radialen/nicht radialen Gliazellen von verschiedenen neuronalen Linien erklären (Götz et al., 1998; Heins et al. 2002; Warren et al., 1999; Vitalis et al., 2000). Weiterhin konnte für die Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutation eine Veränderung im Wanderungsverhalten der neuronalen Vorläuferzellen des Telencephalons nachgewiesen werden (Brunjes et al., 1998; Caric et al., 1997; Jimenez et al., 2002). Bereits in der Pax6<sup>Sey/-</sup> Mutante zeigt sich eine signifikante Abnahme im Volumen des Bulbus olfactorius. Diese Volumenabnahme bezieht sich ausschließlich auf die Körnerzellen und weitere Interneurone (Anchan et al., 1997; Dellovade et al., 1998). Weitere neuronale Veränderungen zeigen sich in der Histogenese von einigen diencephalen Nuclei (Mastick & Andrews, 2001; Stoykova et al., 1996; Warren & Price, 1997), nigrostriatalen Projektionen dopaminerger Neurone (Vitalis et al., 2000), thalamocorticalen Projektionen (Kawano et al., 1999) sowie in der Ausbildung der Prosencephalon-Mesencephalon Grenze (Mastick et al., 1997; Matsunaga et al., 2000; Stoykova et al., 1997). Zusätzlich führt die Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutation zu einer zeitlichen Verzögerung der tangentialen Wanderungen vom medialen und lateralen Ganglienhügel (Jiménez et al., 2002).

#### *Pax6 in der rhombischen Lippe*

Im Cerebellum hat ein Fehlen des Pax6 Gens Auswirkungen auf die makroskopische Struktur. So konnte gezeigt werden, daß in Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutanten jegliche Bildung von Fissuren ausbleibt. Die Zellproliferation des Cerebellums ist in den Mutanten aber nicht verändert. Die Körnerzellen erreichen zwar den postmitotischen Zustand, sind aber im externen Stratum granulosum unorganisiert lokalisiert. Außerdem konnte ein Einfluß von Pax6 auf die Ausbildung von Parallelfasern der Körnerzellen nachgewiesen werden (Engelkamp et al., 1999; Yamasaki et al., 2001). Im Gegensatz dazu ist die Position

oder Anzahl der Purkinjezellen, Golgizellen und der Neurone der tiefen cerebellaren Nuclei nicht verändert. Die Gliazellen des Cerebellums zeigen in der Mutante eine normale Position und Verästelung. Außerdem ist die tangentielle Wanderung entlang der Parallelfasern in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutante gestört. In der rhombischen Lippe und in Zellen die von hier aus ihre Wanderung starten ist Pax6 stark exprimiert. In Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutanten ist die Zellwanderung ausgehend von der rhombischen Lippe und die Bildung der präcerebellaren und cerebellaren Nuclei gestört. Die Zellproliferation und die anfängliche Differenzierung dieser Zellen scheinen aber nicht betroffen zu sein.

Die Zellen des aes und pes exprimieren während ihrer Wanderung Pax6. In der Pax6<sup>sey/sey</sup> Mutante sind diese Wanderungsströme stark verändert. Im aes ist die Anzahl der wandernden Zellen stark reduziert. Daraus folgend ist eines der Zielgebiete, der Nucleus pontis, stark verkleinert. Der NRTP dagegen scheint eine normale Struktur zu bilden. Im pes sind die wandernden Zellen sowie ihre resultierenden Nuclei stark unorganisiert. Die proliferative und apoptotische Aktivität der rhombischen Lippe in Pax6<sup>sey/sey</sup> Mutanten ist aber nicht verändert. Die Veränderungen im Wanderungsverhalten der Zellen sind anscheinend von späteren Prozessen in der Zelle abhängig (Engelkamp et al., 1999). Außerdem kommt es in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutante zu einer um ca. 24 Stunden verspäteten Expression des Unc5H1 Rezeptors und zu einem Fehlen der Expression der Unc5H2 und 3 Rezeptoren im Nucleus cuneatus lateralis. Im Nucleus reticularis lateralis dagegen ist die Expression dieser Rezeptoren nicht verändert. Ebenso ist das Expressionsmuster von Netrin-1 und DCC in Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutanten nicht verändert (Benzing et al., unveröffentlichte Daten). Die Zellen des intramuralen Wanderungsstroms exprimieren kein Pax6. Daher ist diese Wanderung bei einer Mutation des Gens nicht betroffen.

#### *Netrine (sanskrit: „der Führende“)*

Netrin-1 gehört zur kleinen aber hoch konservierten Familie der sekretorischen Netrine und konnte erstmals 1994 in Vertebraten nachgewiesen werden (Serafini et al., 1994). Insgesamt sind in der Maus vier verschiedene Netrinproteine bekannt (Netrin-1-4). Alle haben grundsätzlich den gleichen molekularen Aufbau: eine amino-terminale Signalsequenz, eine Laminin-artige globuläre Domäne des Typs VI, drei Wiederholungen des Laminin-artigen epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und ein Carboxyl-terminales „Netrinmodul“.

Mitglieder dieser Glykoproteinfamilie konnten in einer ganzen Reihe von Organismen isoliert werden. Beispielsweise wird in der Entwicklung von *C. elegans* das Nematoden Netrin Unc-6 in 12 unterschiedlichen Neuroglia und Neuronenzellen exprimiert. Weiterhin konnte ein Einfluß von Unc-6 und seinen Rezeptoren auf die Zellwanderung in *C. elegans* nachgewiesen werden (Ishii et al., 1992; Wadsworth et al., 1996). Während der Entwicklung von *Drosophila* sind Netrin-A und Netrin-B in hoher Konzentration in den Mittellinienstrukturen, z.B. Gliazellen, exprimiert (Kennedy et al., 1994). Die Mittellinien-Gliazellen scheinen das funktionelle Gegenstück zur Bodenplatte der Vertebraten zu sein. Eine Mutation in diesen Zellen führt zur Mißbildung der Kommissuren und der longitudinalen Verbindungen (Klamt et al., 1991; Thomas et al., 1988). Netrin-1 liegt stets als diffusibles Protein vor. Es kann aber auch an die Membran gebunden sein, dann ist es entscheidend an direkten Zell-Zell-Interaktionen beteiligt (Manitt et al., 2001).

In den embryonalen Entwicklungsstadien der Maus ist Netrin-1 im Bulbus olfactorius, im Boden des lateralen Ventrikels, im Ganglienhügel, im Boden des Mesencephalons, in der Area ventralis tegmentalis, in der Substantia nigra, im Cerebellum, in der Bodenplatte des Rhombencephalons und im Auge, also in den proliferativen Zonen des embryonalen Organismus exprimiert (Livesey & Hunt, 1997). Eine homozygote Mutation des Netrin-1 Gens führt bei Embryonen innerhalb weniger Tage nach der Geburt zum Tod. Die Untersuchungen von Serafini und Kollegen über die anatomischen Strukturen des Gehirns der Netrin1-Nullmutante belegen die große Bedeutung von Netrin-1 für die axonale Leitung. So konnte gezeigt werden, daß sich die Medulla spinalis zwar normal entwickelt, es aber zu einer Verkleinerung der ventralen Kommissur durch Verminderung der kommissuralen Axone kommt. Weiterhin kommt es zu einer Veränderung in der Lokalisation von trochlearen Motoneuronen in der Bodenplatte. Diese Veränderung deutet auf eine wichtige Rolle von Netrin-1 für die Position dieser Neurone hin. Ein weiterer Defekt in diesem Bereich liegt in den dickeren und verstärkten, aber unorganisierten longitudinalen axonalen Fasern. Neben diesen Defekten führt die Netrin-1 Mutation zu einem totalen Fehlen des Corpus callosums und der Commissura hippocampi sowie zu einer veränderten Commissura anterior. All diese Defekte zeigen die Bedeutung von Netrin-1 für die axonale Leitung auf. Daneben führt die Mutation aber auch zu einem totalen Fehlen der Nuclei pontis. Dies zeigt, daß das Protein auch eine Funktion für die neuronale Wanderung zu haben scheint (Serafini et al., 1996). Manitt und Kollegen konnten 2001 zeigen, daß Netrin-1 von vielen

Oligodendrozyten, aber nicht von Astrozyten exprimiert wird (Manitt et al., 2001). Mittlerweile konnten sechs Netrin-1 Rezeptoren identifiziert werden: DCC, Neogenin und Unc5H1, 2, 3 und 4.

Netrin-3 scheint kein Ortholog zum Hühnchen Netrin-2 zu sein, sondern ein Ortholog zum humanen NTN2L („Netrin-2-like“). Diese Vermutung basiert auf der hohen Übereinstimmung der Sequenzen und ihrer chromosomalen Lokalisation. Während der frühen embryonalen Entwicklung kann keine Expression dieses Proteins im Gehirn nachgewiesen werden. Im peripheren Nervensystem ist Netrin-3 während der Entwicklung in den sensorischen Ganglien, mesenchymalen Zellen und Muskeln exprimiert. Netrin-3 bindet an alle Netrin Rezeptoren der DCC- und Unc5-Familie. Die Bindung an den DCC Rezeptor ist aber schwächer als die Bindung von Netrin-1 an diesen Rezeptor. Auf Grund all dieser Eigenschaften ist es möglich, dass Netrin-3, ähnlich wie Netrin-1, eine Funktion als axonale Leitstruktur hat. Diese Funktion scheint aber auf das periphere Nervensystem beschränkt zu sein. Außerdem wirkt Netrin-3 möglicherweise unabhängig vom DCC-Rezeptor (Püschel, 1999; Seaman & Cooper, 2001; Wang et al., 1999).

Über die murinen Netrine 2 und 4 ist bis heute nur sehr wenig bekannt (Kennedy et al., 1994; Yin et al., 2000). Da sie für diese Arbeit nicht entscheidend sind, soll auf ihre Struktur und Funktion nicht näher eingegangen werden.

### *Netrin-Rezeptoren*

DCC (deleted in colorectal cancer) ist ein Transmembranprotein der Immunoglobulin Familie, das extrazellulär aus sechs Fibronectin Typ III Domänen und vier Immunoglobulin Domänen besteht. Der zytoplasmatische Bereich besteht aus drei Regionen, P1, P2 und P3, die eine hohe Homologie zwischen verschiedenen Spezies aufweisen (Keleman & Dickson, 2001). Namensgebend für diesen Rezeptor waren die Arbeiten von Fearon und Kollegen, die einen Einfluß des Rezeptors für die Pathogenese von humanen colorectalen Tumoren nachweisen konnten (Fearon et al., 1990). Im embryonalen Gehirn der Maus konnte DCC, ähnlich dem Netrin-1, in verschiedenen Regionen nachgewiesen werden. Dazu gehören die ventral zur Bodenplatte wandernden kommissuralen Axone und die Motoraxone des ventralen Neuralrohrs. Weiterhin findet sich eine DCC Expression im Bulbus olfactorius, Hippocampus, Cerebellum, Pons, der Medulla oblongata und im peripheren Nervensystem (Gad et al., 1997). Der Beginn der DCC Expression korreliert mit dem Beginn der Neurogenese. Entsprechend ist der



Rezeptor in den Bereichen des embryonalen Gehirns exprimiert, in denen sich eine hohe Neurogeneserate findet. Daher scheint DCC funktionell in der Überleitung der Zellproliferation zur Differenzierung von speziellen Zelltypen involviert zu sein (Gad et al., 1997). In *C. elegans* ist dieser Rezeptor unter UNC-40 und in *Drosophila* unter *Frazzled* bekannt. Eine homozygote Mutation des DCC Rezeptors in der Maus führt zu ähnlichen Defiziten wie in der Netrin-1 Mutante. So kommt es auch hier zu einem totalen Fehlen des Corpus Callosums und der Commissura hippocampi sowie zu Veränderungen im Axonwachstum Richtung Bodenplatte im Rhombencephalon (Fazeli et al., 1997).

Das Transmembranprotein Neogenin gehört, ebenso wie DCC, zur Immunoglobulin-Familie. Es ist extrazellulär aus sechs Fibronectin Typ III Domänen und vier Immunoglobulin-Domänen sowie aus einer intrazellulären Domäne aufgebaut. Neogenin konnte erstmals 1994 im Hühnchen identifiziert werden (Vielmetter et al., 1994). Auf Grund seiner starken Homologie zum DCC Rezeptor wird diesem Rezeptor eine ähnliche Funktion zugeschrieben (Vielmetter et al., 1997). So scheint Neogenin ebenfalls funktionell in der Überleitung der Zellproliferation zur Differenzierung zu speziellen Zelltypen involviert zu sein (Gad et al., 1997). Während der frühen Entwicklung ist nur eine geringe Neogeninexpression im Gehirn vorhanden. In späteren embryonalen Stadien (E15,5) findet sich eine starke Expression in der ventrikulären Zone des Mesencephalons und Rhombencephalons sowie in der ventralen Region der Medulla spinalis. Im Telencephalon zeigt sich eine Expression in der corticalen Platte, der intermediären Zone des Neocortex und im Bulbus olfactorius. In der ventrikulären Zone des Neocortex ist dagegen keine und im Thalamus, Hypothalamus, Pons und Cerebellum nur eine sehr schwache Expression vorhanden. Während der Entwicklung des peripheren Nervensystems ist Neogenin hauptsächlich in Regionen exprimiert, die entscheidend für die Kondensation des Bindegewebes sind (Keeling et al., 1997). Keino-Masu und Kollegen konnten 1996 zeigen, dass die Neogeninexpression während der Entwicklung komplementär zur DCC Expression ist. Da bereits ein Einfluß von Neogenin auf die wandernden Zellen des rostralen Wanderungsstroms gezeigt werden konnte, scheinen DCC und Neogenin ähnliche Funktionen zu haben und diese komplementär auszuführen (Keino-Masu et al., 1996; Murase & Horwitz, 2002).

Unc5H1-4 (Unc: uncoordinated) sind Typ I Transmembranrezeptoren, die ortholog zum Rezeptor UNC-5 von *C. elegans* sind. Extrazellulär bestehen die Unc5 Rezeptoren aus zwei Immunoglobulin Domänen und zwei Thrombospondin Typ I (TSP) Domänen. Der

zytoplasmatische Bereich beinhaltet drei konservierte Regionen: eine ZU5 [Zonula occludens-1 (Schultz et al., 1998)] Domäne, ein DB Motif (Hong et al., 1999) und eine Carboxy-terminale Death Domäne [DD (Hofmann & Tschopp, 1995, Keleman & Dickson, 2001)].

Der Unc5H1 Rezeptor ist ab E13 im Pallium, Thalamus und Hypothalamus, Mesencephalon und dem Hirnstamm exprimiert. Ab E16 ist eine Expression auch im Cortex und entorhinalen Cortex zu finden. Eine genauere Betrachtung der Expressionsmuster zeigt eine Expression in der ventralen Medulla spinalis, an den lateralen Ecken der ventrikulären Zone, in Motoneuronen und der Basalplatte. Postnatal ist der Rezeptor im Cortex und Septum nur schwach, dafür aber im Hippocampus, im entorhinalen Cortex und Cerebellum stark exprimiert (Leonardo et al., 1997).

Der Unc5H2 Rezeptor ist im caudalen Diencephalon, Mesencephalon und in dorsalen Bereichen des Auges bereits ab E13, in der Dachplatte des Rückenmarks ab E14 exprimiert. Im Cortex findet sich eine schwache Expression erst ab E16. Postnatal ist der Rezeptor im Cortex und im Septum nur schwach exprimiert. Hohe Expressionsraten sind dagegen im Cerebellum, besonders im inneren Stratum granulosum, dem inneren Bereich des äußeren Stratum granulosum und im Stratum moleculare vorhanden (Leonardo et al., 1997). Somit sind der Unc5H1 und 2 Rezeptor in Bereichen exprimiert, in denen differenzierende Neurone axogenetisch aktiv sind (Leonardo et al., 1997). Während des *pes* von Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutanten ist die Expression des Unc5H1 Rezeptors um ca. 24 Stunden verspätet und in der rhombischen Lippe kommt es zu keiner Expression des Rezeptors. Der Unc5H2 Rezeptor dagegen ist während des *pes* von Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutanten im Nucleus reticularis lateralis, nicht aber im Nucleus cuneatus lateralis exprimiert (Benzing et al., unveröffentlichte Daten).

Der Unc5H3 Rezeptor ist während der Entwicklung der Maus im Dach des Mesencephalons, im Diencephalon, der cerebellaren Platte und in der rhombischen Lippe exprimiert (Przyborski et al., 1998). Eine Mutation des Unc5H3 Gens in der Maus wird als „rostral cerebellar malformation“ (rcm) bezeichnet (Lane et al., 1992). Bei dieser Mißbildung befinden sich nur noch wenige Körnerzellen im Cerebellum. Die meisten Körnerzellen und alle Purkinjezellen befinden sich außerhalb des Cerebellums, im Colliculus inferior und im Tegmentum. Weiterhin kommt es zu einer Verminderung in der Anzahl der cerebellaren Folia und zu Defekten im Mesencephalon. Diese Veränderungen in der Unc5H3 Mutante deuten auf eine Störung in der neuronalen Wanderung und der Bildung cerebellarer Grenzen hin (Ackerman et al., 1997;

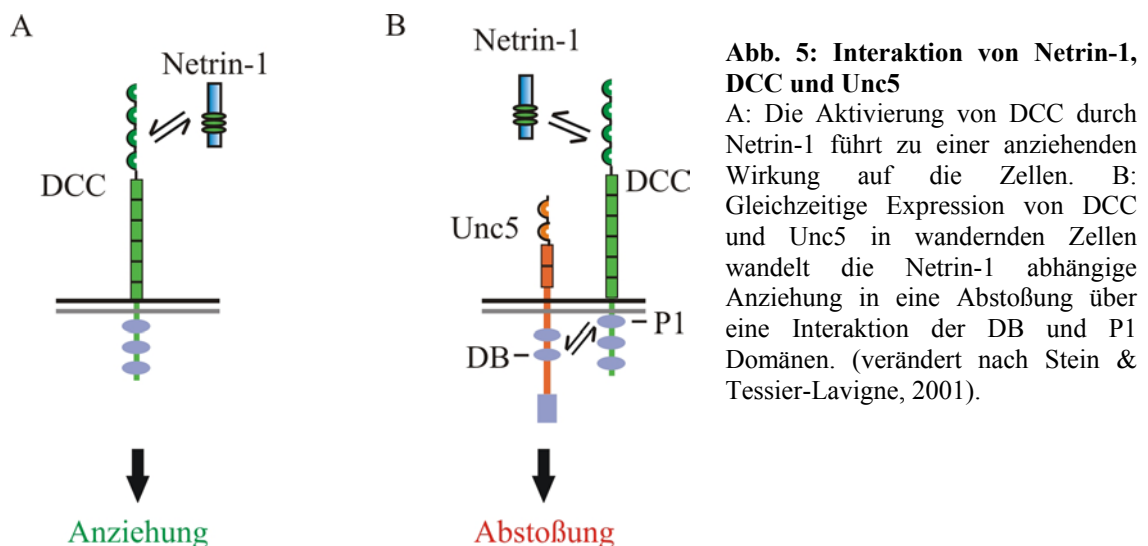
Goldowitz et al., 2000; Lane et al., 1992; Przyborski et al., 1998). In der Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutante ist der Unc5H3 Rezeptor nicht im Nucleus reticularis lateralis exprimiert. Im Nucleus cuneatus lateralis dagegen zeigt sich eine normale Expression des Rezeptors (Benzing et al., unveröffentlichte Daten).

Unc5H4 konnte erstmals 2002 in der Maus identifiziert werden (Engelkamp, 2002). Mit einer Sequenzhomologie von 48,7% hat der Rezeptor eine nahe Verwandtschaft mit dem Unc5H2 Rezeptor. Eine erste Expression des Unc5H4 Rezeptors ist ab E11 in einem dünnen Streifen entlang der Körperoberfläche sowie entlang der Schulterregion und an den Extremitätenknospen zu beobachten. Außerdem ist der Rezeptor während der Embryonalentwicklung im Innenohr exprimiert (Engelkamp, 2002). Eine aktuelle Studie beschreibt ausschließlich das neuronale Expressionsmuster von Unc5H4 für das Stadium P5 der Ratte. Danach ist Unc5H4 im Cortex hauptsächlich in der Schicht 4 von sensorischen Cortices, in der Amygdala, in der CA3 Region und Gyrus dentatus des Hippocampus und nur schwach im Hypothalamus, Thalamus, Bulbus olfactorius und im Stratum purkinjense des Cerebellums exprimiert (Zhong et al., 2004).

#### *Interaktion von Netrin-1 und seinen Rezeptoren*

Grundsätzlich wirkt eine Netrin-1 Quelle anziehend auf Zellen, die die Rezeptoren DCC und Neogenin exprimieren (Keino-Masu et al., 1996; Leonardo et al., 1997; Vitalis et al., 2000; Wadsworth et al., 1996) und abstoßend auf Zellen, die die Rezeptoren Unc5H1-3 exprimieren (Hedgecock et al., 1990; Hong et al., 1999; Keleman & Dickson, 2001; Stein et al., 2001). Stein und Kollegen konnten zeigen, dass Netrin-1 an DCC bindet und über die C-terminale P3 Domäne des Rezeptors die anziehende Wirkung ausübt (Abb. 5A; Keleman & Dickson, 2001; Stein et al., 2001). Bei einer gleichzeitigen Expression von DCC und einem Unc5 Rezeptor wird die anziehende Wirkung des DCC Rezeptors aufgehoben und es kommt zu einer abstoßenden Reaktion auf eine Netrin-1 Quelle (Abb. 5B). Somit wirken die Unc5 Rezeptoren in Verbindung mit DCC Rezeptoren abstoßend (Hong et al., 1999; Przyborski et al., 1998). Entscheidend für diese abstoßende Wirkung der Unc5 und DCC Rezeptoren ist die Interaktion ihrer zytoplasmatischen P1 und DB Domänen (Hong et al., 1999; Merz et al., 2001). DCC kann aber auch unabhängig vom Unc5 abstoßend wirken (Merz et al., 2001). Für den Wechsel von anziehender und abstoßender Wirkung des DCC Rezeptors scheint dabei die cAMP Konzentration innerhalb der Zelle maßgebend zu sein (Ming et al., 2002). Neben der abstoßenden Wirkung der Unc5 Rezeptoren in Zusammenhang

mit Netrin-1, haben die Unc5 Rezeptoren auch eine Netrin-1 unabhängige Funktion. So wird bei einer Unc5 Rezeptorexpression ohne gleichzeitiger Expression von Netrin-1 Apoptose induziert. Somit stellt Netrin-1 einen Überlebensfaktor für diese Zellen dar (Llambi et al., 2001; Williams et al., 2003). Der Unc5H1 Rezeptor hat von allen Unc5 Rezeptoren die stärkste apoptotische Wirkung. Für diesen Rezeptor konnte eine Interaktion mit dem NRAGE [neurotrophin receptor-interacting MAGE (Melanoma Antigen-kodierendes Gen) homolog] Protein über die ZU Domäne des Rezeptors gezeigt werden, die entscheidend für die apoptotische Wirkung ist (Williams et al., 2003). Thiebault und Kollegen vermuten, dass die Unc5 Rezeptoren außerhalb einer Netrin-1 Quelle als Tumorsuppressoren dienen (Thiebault et al., 2003). In *C. elegans* dagegen ist der Unc5 Rezeptor, unabhängig vom Unc40, entscheidend an der Ausbildung der dorsalen Wanderung der „distal Tip“ Zellen beteiligt (Hedgecock et al., 1990).



Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß DCC über seine C-terminale P3 Domäne anziehend auf eine Netrin-1 Quelle wirkt. Bei einer gleichzeitigen Expression eines Unc5 Rezeptors wirkt die Netrin-1 Quelle abstoßend. Eine alleinige Expression der Unc5 Rezeptoren führt stets zum apoptotischen Tod der Zelle.

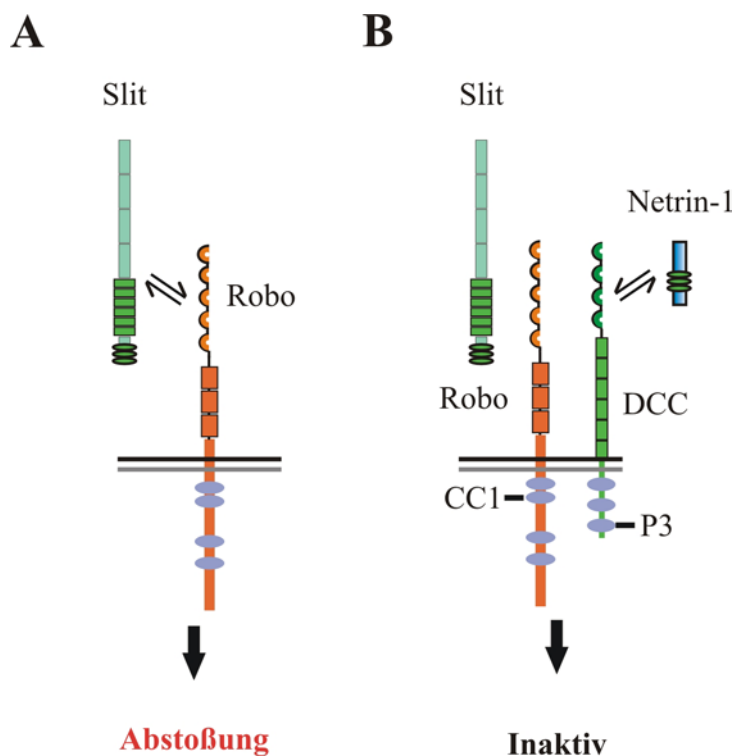
Über die Wechselwirkungen von Netrin-3 und den Rezeptoren DCC, Unc5H1-3 ist bis heute nur sehr wenig bekannt. Eine Interaktion von Netrin-3 mit DCC und Unc5 Rezeptoren konnte aber bereits gezeigt werden. Dabei bindet Netrin-3 mit geringerer Affinität an den DCC Rezeptor als an Neogenin und Unc5H1-3. Außerdem hat Netrin-3 eine geringere Spezifität als Netrin-1 (Püschel, 1999; Wang et al., 1999).

### *Slit Proteine und ihre Rezeptoren*

Bis heute sind 3 Slit-Proteine (Slit1-Slit3) bekannt, die alle große Glykoproteine der extrazellulären Matrix darstellen. Sie bestehen aus vier Leucin-reichen, 7-9 EGF Wiederholungen und einer Domäne, die als ALPS (Arginin-Laminin-Perlecan-Slit Spacer Domäne), LNS (Laminin-Neurexin-sex hormon binding globulin Domäne) oder LG (Laminin G-like Modul) Modul bekannt ist (Nguyen-Ba-Chervet & Chedolat, 2002). Für die Slit Proteine sind 3 Rezeptoren bekannt: Roundabout (Robo) 1-3. Dabei wird Robo3 auch als Rig1 bezeichnet (Sabatier et al., 2004). Die Robo Rezeptoren gehören zu einer kleinen Gruppe der Immunoglobulin Superfamilie und sind durch 5 Ig-ähnliche Domänen, 3 Fibronectin TypIII Wiederholungen, 1 Transmembrandomäne und einen langen zytoplasmatischen Schwanz mit einem Robo-spezifischen Motif charakterisiert. Der Rig-1 Rezeptor unterscheidet sich von den anderen beiden Robo-Rezeptoren durch das Fehlen einiger zytoplasmatischer Domänen (Nguyen-Ba-Chervet & Chedolat, 2002). Die Slit Proteine und ihre Rezeptoren sind entscheidend für neuronale Zellwanderung und üben eine abstoßende Wirkung auf die Mittellinienkreuzung und die Axonfaszikulation aus (Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000). Erste Untersuchungen dieses Rezeptor-Liganden-Komplexes in *Drosophila melanogaster* zeigen eine Expression der Slit Proteine in Mittellinienzellen und eine Robo Expression in den longitudinalen Axonen (Kidd et al., 1998). Im Gehirn von Vertebraten findet sich eine Slit Expression in der Bodenplatte, wie bei Netrin-1. Die Robo-Rezeptoren dagegen werden in den kommissuralen Axonen exprimiert (Sabatier et al., 2004). Nach aktuellen Studien wirkt der Robo-1 Rezeptor abstoßend auf das Slit Signal der Bodenplatte, so daß die Axone diesen Bereich nicht kreuzen können (Abb. 6A). Im Zusammenhang mit dem Rig-1 Rezeptor hat dieses System eine entscheidende Rolle bei der Mittellinienkreuzung (Marillat et al., 2004).

Erste Untersuchungen über eine Interaktion des Netrin- und des Slit-Signalwegs in *Xenopus* konnten belegen, daß eine Aktivierung von Robo durch Slit zu einer Hemmung der anziehenden Wirkung von Netrin über eine Interaktion zwischen dem Robo und dem DCC Rezeptor führt (Abb. 6B). Es kommt jedoch nicht zu einem abstoßenden Signal für das Axon (Stein & Tessier-Lavigne, 2001).

In Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutanten tritt keine Veränderung des Expressionsmusters von Slit2 und Rig1 während des pes im Rhombencephalons auf. Neben Rig-1 wird kein anderer Robo Rezeptor in den Zellen dieser Wanderung exprimiert (Benzing et al., unveröffentlichte Daten).



**Abb. 6: Interaktion von Slit, Robo, DCC und Netrin-1**

A: Die Aktivierung von Robo durch Slit führt zu einer abstoßenden Wirkung auf die Axone.

B: Wird bei einer Aktivierung des Robo Rezeptors durch Slit gleichzeitig der DCC Rezeptor durch Netrin aktiviert, kommt es zu einer Interaktion dieser beiden Rezeptoren über die CC1 und P3 Untereinheiten und sowohl zu einer Hemmung der abstoßenden Wirkung des Robo Rezeptors als auch zu einer Hemmung der anziehenden Wirkung des DCC Rezeptors. Das System ist inaktiv und hat keine Wirkung auf die auswachsenden Axone (verändert nach Stein & Tessier-Lavigne, 2001).

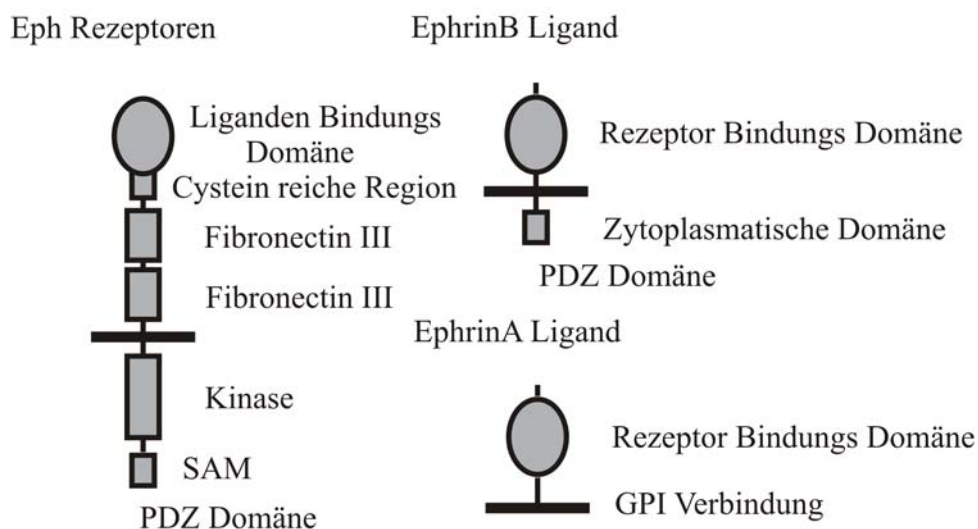
## 1.6 Eph Rezeptoren und ihre Liganden

Die Unterfamilie der Eph Rezeptoren besteht aus mindestens 14 Mitgliedern. 1997 wurde vom „Eph Nomenclature Committee“ eine einheitliche Nomenklatur eingeführt. Eine Überexpression des ersten gefundenen Eph Rezeptors wurde in der humanen Erythropoetin produzierenden hepatozellulären Karzinoma Zelllinie (ETL-1) nachgewiesen. Dadurch hat diese Klasse ihren Namen erhalten (Erythropoetin-producing hepatocellular receptor). Die Eph Rezeptoren stellen die größte Untergruppe der Tyrosinkinase Rezeptoren (RTK). Diese Rezeptorklasse beinhaltet membrandurchspannende Rezeptoren mit einer intrinsischen Tyrosinkinase Aktivität, die eine ganze Reihe von zellulären Antworten in der Entwicklung des Organismus auslöst. Dazu gehören Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen (Gao et al., 2000). Somit scheinen die Eph Rezeptoren und ihre Liganden entscheidend für die neuronale Entwicklung zu sein.

Die Eph Rezeptoren sind typisiert durch ihre extrazelluläre Domäne, die eine Immunoglobulin ähnliche Domäne, eine Cystein-reiche Region und zwei Fibronectin Typ III Wiederholungen enthält (Abb. 7). Die Eph Rezeptoren können auf Grund ihrer Aminosäuresequenz-Homologie in zwei Untergruppen unterteilt werden, EphA und EphB (Friedman & O’Leary, 1996; Oriolo & Klein, 1997). Die 8 bekannten Liganden der Eph Rezeptoren (Ephrine) sind alle membrangebunden, entweder durch eine GPI

(Glycosylphosphatidylinositol) Verbindung oder durch eine einzelne Transmembrandomäne (Abb. 7). Durch diesen Unterschied werden die Liganden in zwei Gruppen unterteilt: Die GPI gebundenen Liganden werden als Ephrin-A Liganden, die transmembran gebundenen als Ephrin-B Liganden bezeichnet (Friedman & O'Leary, 1996; Oriolo & Klein, 1997).

Diese Unterteilung der Eph Rezeptoren und ihrer Liganden spiegelt auch ihre Bindungseigenschaften wieder: EphrinA Liganden binden an EphA Rezeptoren und EphrinB Liganden binden an EphB Rezeptoren. Diese Unterscheidung der Bindungseigenschaften ist aber nicht absolut, da es Ausnahmen gibt (Oriolo & Klein, 1997).



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Domänenorganisation der Eph Rezeptoren und Ephrine**

GPI: Glycosylphosphatidylinositol Verbindung; PDZ: konservierte Sequenz von 90 Aminosäuren in den Proteinen PSD95/SAP90, DLG (Drosophila discs-large protein) und Z01; SAM: steriles α Motif (verändert nach Himanen & Nikolov, 2003).

Ephrin Liganden können nur Eph Rezeptoren binden, wenn sie selbst an eine Membran gebunden sind (Davis et al., 1994). Zusätzlich ist dieses Rezeptor-Liganden System ein bidirektionales System. Der vorwärts gerichtete Signalweg läuft dabei über die intrinsische Tyrosinkinase Aktivität des Rezeptors, der rückwärts gerichtete Signalweg dagegen über die zyttoplasmatische Domäne des transmembranen EphrinB Liganden (Holland et al., 1998; Mellitzer et al., 2000). Auf Grund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass Eph Rezeptoren und Ephrine entscheidend für die direkte Zell-Zell-Kommunikation sind und nicht für die Kommunikation auf weite Entfernungen (Oriolo & Klein, 1997; Lumsden, 1999). Die Eph Rezeptoren und ihre Liganden sind in weiten

Teilen des embryonalen Gehirns exprimiert. Daran anschließend konnten unter anderem bereits Einflüsse auf die rhombencephale Segmentierung (Bergemann et al., 1995; Ganju et al., 1994; Irving et al., 1996), die Entstehung retinotektaler Projektionen (Birgbauer et al., 2001; Feldheim et al., 2000; Frisen et al., 1998), die Wegfindung von Motoneuronen (Kilpatrick et al., 1996), die Stammzellen der subventrikulären Zone (Conover et al., 2002; Stuckmann et al., 2001; Zhou et al., 2001) und die axonale Leitung an der Mittellinie (Frisen et al., 1998; Imondi et al., 2000; Imondi & Kaprielian, 2001; Yokoyama et al., 2001) gezeigt werden. All diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Eph Rezeptoren und ihrer Liganden als abstoßende Signale in axonaler Leitung sowie neuronaler Zellwanderung in der Entwicklung des Gehirns hin. Für diese Arbeit wurden je zwei Eph Rezeptoren und Liganden näher untersucht. Daher wird im Folgenden genauer auf bereits Bekanntes über diese Rezeptoren und Liganden eingegangen.

#### *Der EphA3 Rezeptor*

Dieser Rezeptor wurde erstmal 1991 aus dem Huhn kloniert und damals cek4 genannt (Sajjadi et al., 1991). Zwischen den Rezeptoren des Huhns, Maus (Mek4), Ratte (Tyro4) und Mensch (HEK) besteht eine starke Homologie in den Aminosäuresequenzen von 83% (Kilpatrick et al., 1996). Der vollständige Rezeptor besteht aus 983 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 118kDa (Sajjadi et al., 1991).

Der Rezeptor hat mehrere Isoformen und ist hauptsächlich im adulten Gehirn exprimiert. Eine Expression in der embryonalen Maus ist extraneuronal in der Niere, Lunge, Herz, skeletaler Muskulatur, Thymus und der Leber nachgewiesen (Kilpatrick et al., 1996; Sajjadi et al., 1991). Im Gehirn dagegen ist eine starke Expression ab E10,5 bis einschließlich E15,5 in der subventrikulären Zone belegt. Diese Expressionszeiten entsprechen den Zeiten der neuronalen Zellwanderung und der axonalen Wegfindung (Kilpatrick et al., 1996). Weiterhin konnte eine entscheidende Funktion von EphA3 für die sagittale Musterbildung und die Wanderung der Körnerzellen im Cerebellum des Huhns nachgewiesen werden (Karam et al., 2000). Da der EphA3 Rezeptor im Zeitfenster der neuronalen Zellwanderung im Cortex exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, daß der Rezeptor auch Einfluß auf andere Wanderungen von neuronalen Vorläuferzellen nehmen kann.



### *Der EphA7 Rezeptor*

Von diesem Rezeptor sind 3 Homologe in der Maus (Mdk1, Ebk), Ratte (Ehk3) und Mensch (Hek11) bekannt. Mittlerweile wurden fünf verschiedene Isoformen gefunden (Ciossek et al., 1995). Im embryonalen Gehirn ist eine starke Expression des Rezeptors im anterioren Tectum, Medulla, Rhombencephalon und subcommissuralen Organ vorhanden. Dagegen zeigt sich im cerebralen Cortex, Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Corpus mamillaria, Hypothalamus, Septum und Striatum eine moderate Expression. Im adulten Tier ist der Rezeptor nur noch im Hippocampus nachweisbar. Im nicht neuronalen Gewebe ist der Rezeptor während der Entwicklung in der Niere, Lunge, Herz, Extremitätenknospen, Augenlider, Ohren und der Zunge vorhanden (Ciossek et al., 1995; Ellis et al., 1995).

Der EphA7 Rezeptor stellt u.a. einen Rezeptor des EphrinA5 dar. Dieser Rezeptor und sein Ligand sind in den Ecken der Neuralfalten koexprimiert. Im Cerebellum ist der Rezeptor während der Entwicklung entscheidend für die Lobusbildung (Rogers et al., 1999).

Diese Ergebnisse deuten auf einen maßgeblichen Einfluß des EphA7 Rezeptors für die neuronale Differenzierung und das Erreichen der Neurone ihrer Zielgebiete hin. Außerdem ist der Rezeptor wichtig für die Musterbildung von Gewebe und Organogenese (Zhou, 1998). Daher wird untersucht, ob dieser Rezeptor auch bedeutend für die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons ist.

### *Der EphrinA5 Ligand*

Der Eph Ligand EphrinA5 war früher unter AL-1 bekannt und hat eine molekulare Masse von 23-28 kDa. Eine Expression des Liganden findet sich im Gehirn, Herz, Niere und Lunge der adulten Maus. Für die Funktion des Liganden ist seine Membranbindung von großer Bedeutung. So bindet der Ligand an den EphA5 Rezeptor, wenn er selbst membrangebunden ist, und stimuliert die Aktivierung der EphA5 Tyrosinkinase (Winslow et al., 1995). Der Rezeptor wirkt abstoßend auf die Axone der retinalen Ganglienzellen und inhibierend auf das Axonwachstum (Drescher, 1997; Frisen et al., 1998). So kommt es in der EphrinA5<sup>-/-</sup> Mutante zu einem Überschiessen des Axonwachstums zum Colliculus superior. Daher scheint EphrinA5 mit seiner Lokalisation im Colliculus superior das Axonwachstum zu stoppen (Frisen et al., 1998). Weiterhin führt die Mutation des EphrinA5 Gens zu einer Störung im Verschließen des Neuralrohrs (Frisen et al., 1998).

Da die Wanderung einer neuronalen Vorläuferzelle stets mit dem Auswachsen eines Axons beginnt, stellt sich die Frage, ob die Veränderungen der EphrinA5<sup>-/-</sup> Mutante auch Einfluß auf die neuronale Wanderung nehmen können. Außerdem ist EphrinA5 ein Ligand des EphA7 Rezeptors (s.o.) und somit vermutlich an gleichen oder ähnlichen Prozessen beteiligt wie dieser Rezeptor.

### *Der EphrinB1 Ligand*

Der EphrinB1 Ligand war früher in der Ratte als Elk-L, im Menschen als Lerk2 und im Huhn als Cek5-L bekannt. Von den EphrinA Liganden unterscheidet sich EphrinB1 durch die zytoplasmatische Domäne, die dem EphrinA Liganden fehlt. Diese zytoplasmatische Domäne ist evolutionär mit einer Aminosäuresequenz Übereinstimmung von 95% zwischen Maus und Frosch hoch konserviert. Daher scheint diese Domäne wichtig für die Funktion des Liganden zu sein (Jones et al., 1997). Der Ligand bindet an EphB1, B2 und B3, wenn er selbst membrangebunden ist (Davis et al., 1994). Er bindet aber nicht an die EphA Rezeptoren.

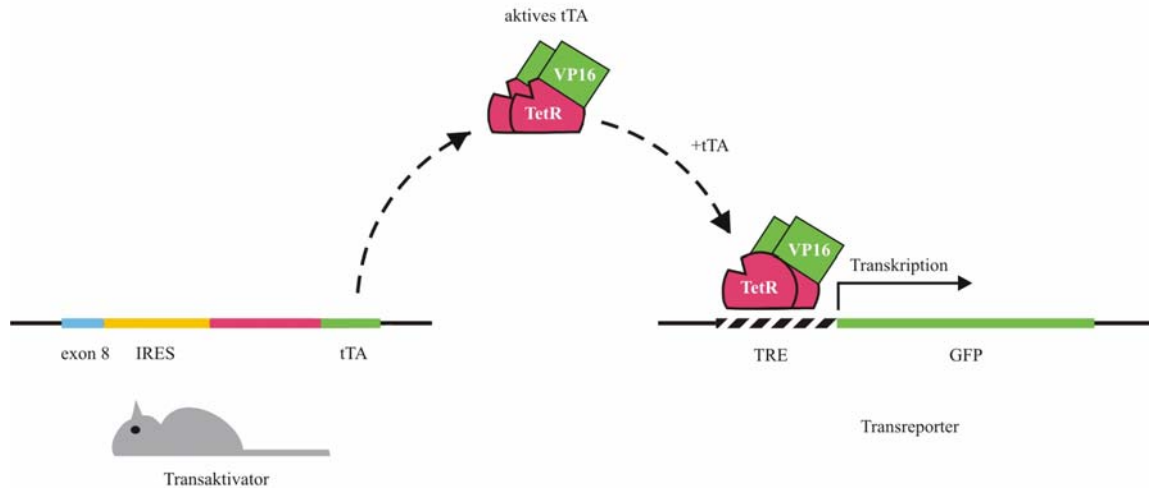
EphrinB1 ist im Gehirn, Herz, Leber, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und der Bauchspeicheldrüse exprimiert (Davis et al., 1994). Dabei ist die Expression während der Entwicklung höher als im adulten Tier. Im Gehirn der Maus findet sich eine Expression ab E8,5 im Cortex, Bulbus olfactorius, Septum, Basalganglien, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Cerebellum und dem Pons (Liebl et al., 2003). An E10,5 ist EphrinB1 im Mesencephalon in einem posterior-anterioren Gradienten exprimiert, was auf eine Funktion für die Segmentierung des Gehirns schließen läßt (Zhou et al., 2001). Im Cerebellum hat EphrinB1 anscheinend eine ähnliche Rolle für die sagittale Musterung und die Wanderung der Körnerzellen wie der EphA3 Rezeptor (Karam et al., 2000). In der Medulla spinalis spielt EphrinB1 eine wichtige Rolle in der Leitung der longitudinal projizierenden Axone (Imondi et al., 2000). Im Cortex beginnt die EphrinB1 Expression in neuroepithelialen Zellen parallel mit dem Beginn der Neurogenese. Daher wird eine Funktion des Liganden für die Neurogenese vermutet. Außerdem ist EphrinB1 entscheidend an der Wanderung der Neurone von der ventrikulären Zone zum Neocortex beteiligt (Flanagan & Vanderhaeghen, 1998; Holder & Klein, 1999; Karam et al., 2000; O'Leary & Wilkinson, 1999). Weiterhin findet sich eine Expression in den Rhombomeren 2, 4 und 6, in denen auch die Liganden EphrinB2 und B3 exprimiert sind (Xu et al., 1995, Lumsden, 1999). Flenniken und Kollegen

konnten in der Maus eine Expression von EphrinB1 in der Boden- und Dachplatte des Rhombencephalons nachweisen (Flenniken et al., 1996).

Auf Grund der Beteiligung von EphrinB1 sowohl in der Leitung von Axonen als auch in der Neurogenese und Wanderung corticaler Vorläuferzellen, liegt die Vermutung nahe, daß dieser Ligand auch für die Wanderung weiterer Vorläuferzellen während der Entwicklung entscheidend sein kann.

### **1.7 YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgene Mäuse**

In dieser, von K. Benzing hergestellten, transgenen Mäuselinie wurde eine menschliche Pax6(hPax6) Region als Promoter verwendet. Hierbei handelt es sich um eine 420kb lange genomische Pax6-Region, die zu einer Expression des Proteins in allen kritischen Geweben führt (Schedl et al., 1996). Die beiden Maus-Allele von Pax6 wurden bei der Herstellung dieser transgenen Mäuselinie nicht verändert. Zur Einführung von Reportergenen in den hPax6-Locus wurde ein Teil des Locus entfernt. Dabei handelt es sich um eine Region um die Exons 8-11, in denen nur kodierende Sequenzen, nicht aber Intronsequenzen konserviert sind. Als Vehikel für die Vervielfältigung und Modifikation der hPax6-Region wurde ein künstliches Hefechromosom (engl.: „Yeast Artificial Chromosome“, YAC) verwendet. Durch die Einfügung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) aus dem Encephalomyokarditisvirus (EMCV) können von der transgenen mRNA zwei Proteine kodiert werden: ein Rest des menschlichen Pax6-Proteins und ein vollständiges Reporterprotein. Als Reportersystem wurde für diese transgene Mäuselinie ein Tetracyclin-kontrolliertes binäres Reportersystem verwendet. Bei diesem System wird zunächst ein Transaktivator unter der Kontrolle des gewebsspezifischen Promotors exprimiert. Der Transaktivator wiederum aktiviert erst durch Bindung an spezifische DNA-Elemente die Expression des Reportergens.



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

Im binären Reportersystem werden für die Expression eines Reportergens, in diesem Beispiel das Grün Fluoreszierende Protein (GFP), zwei unabhängige DNA-Konstrukte verwendet, ein Transaktivator und ein Reporter. Da der Transaktivator fest in der transgenen Mäuselinie verankert ist, der Reporter jedoch z.B. durch Elektroporation eingebracht wird, ist es möglich, eine Vielzahl verschiedener Reporter- oder Effektorgene zu exprimieren. Der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA) wird unter der Kontrolle des gewebsspezifischen humanen Promotors exprimiert. Das aktive tTA bindet mit hoher Spezifität an die doppelsträngige DNA des Tet-Response-Element (TRE), welches im Mausgenom nicht vorkommt. Das TRE wird zusammen mit dem Reporter (hier GFP) durch Elektroporation in die Zellen eingebracht. Die VP16-Domäne führt zu einer starken Aktivierung der Transkription des stromabwärts von TRE gelegenen Gens. In Abwesenheit von tTA wird das Reportergen nicht transkribiert. Zusätzlich läßt sich tTA durch Doxycyclin inaktivieren (verändert nach K. Benzing, Dissertation, 2002).

Als Transaktivator wurde in dieser Mäuselinie ein Fusionsprotein aus dem Tetracyclin-Repressor (TetR) aus *Escherichia coli* und der Transaktivierungsdomäne von VP16 aus dem Herpes simplex-Virus verwendet [**Tetracyclin-kontrollierter-Transaktivator (tTA)**]. Dadurch liegt in allen Pax6-positiven Zellen aktives tTA vor. Dieses Tetracyclin-kontrollierte System zeichnet sich durch hohe Spezifität aus und führt zu keinen bekannten phänotypischen Veränderungen in transgenen Mäusen. Das tTA kann mit seiner TetR-Domäne hochspezifisch an eine 42bp lange doppelsträngige DNA-Sequenz binden, die als **TetR-Response-Element (TRE)** bezeichnet wird, welche im Maus-Genom nicht vorkommt. Durch das Einbringen von TRE-enthaltenden Reporterkonstrukten in tTA beinhaltende Zellen, wird eine hochspezifische Expression erreicht. Wird zu dem System Tetracyclin, z.B. Doxycyclin, gegeben, führt dies zu einer Konformationsänderung der TetR-Domäne und zum Verlust der DNA-Binddefähigkeit (Abb. 8).

Wird ein Vektorsystem mit einem TRE-Element und einem Reporter-DNA-Konstrukt in tTA positive Zellen elektroporiert, kommt es zu einer selektiven Expression dieses Konstruktes ausschließlich in den Pax6 positiven Zellen dieser Mäuselinie. Wird z.B.

das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) als Reporter-DNA-Konstrukt verwendet, leuchten nach einer Elektroporation ausschließlich Pax6 positive Zellen grün und diese können somit unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

### **1.8 Zielsetzung und experimentelles Vorgehen**

Das Expressionsmuster verschiedener bisher untersuchter Proteine erklärt alleine nicht das Wanderungsverhalten der Zellen des pes. Es wurden daher Expressionsstudien zur Identifizierung weiterer wichtiger Faktoren für diesen Wanderungsstrom durchgeführt.

Über die Funktion und das Expressionsmuster der Eph Rezeptoren und ihrer Liganden ist bereits einiges bekannt. Da ein Einfluß der Eph Rezeptoren auf neuronale Wanderungen nachgewiesen werden konnte, wurden nach einer ausgiebigen Literaturrecherche zwei Eph Rezeptoren und zwei Ephrine ausgewählt, die laut Literatur Einfluss auf die Wanderungen des Rhombencephalons nehmen könnten. Daher stellte sich die Frage:

Können die Rezeptoren EphA3 und EphA7 sowie die Liganden EphrinA5 und EphrinB1 auf Grund ihrer Expressionsmuster als entscheidend für die neuronalen Wanderungen des Rhombencephalons identifiziert werden?

Die Netrin-1 Mutante zeigt keine Veränderung der pes Wanderung (Bloch-Gallego et al., 1999), daher wurde untersucht, ob Netrin-3 als Homolog des Netrin-1, entscheidend für den pes und andere tangentialen Wanderungen im Rhombencephalon sein kann. Über die Funktion des Netrin-3 ist bis heute nur sehr wenig bekannt. Eine Expressionstudie von Wang und Kollegen fanden eine Expression des Netrin-3 ausschließlich in den Spinalganglien (Wang et al., 1999).

Daher stellte sich die Frage: Ist Netrin-3 während der embryonalen Entwicklung in anderen Regionen als den Spinalganglien exprimiert?

Da über die grundlegenden Mechanismen des pes im Rhombencephalon bis heute nur sehr wenig bekannt ist, sollten durch erste Experimente folgende Fragen geklärt werden.

1. Welche Bedeutung hat der Bodenplattenbereich für die wandernden Zellen dieses Stroms?
2. Dient Netrin-1 als anziehendes Bodenplattensignal für die wandernden Zellen dieses Stroms?
3. Wandern die Zellen dieses Stroms entlang eines vom Substrat vorgegebenen Pfades?

Zur Klärung dieser Fragen wurden Transplantations- sowie Kollagenkokulturrexperimente durchgeführt.

Da in der Pax6<sup>Sey/Sey</sup> Mutante der Unc5H3 Rezeptor im Bereich des Nucleus cuneatus lateralis nicht exprimiert wird, wurde seine Bedeutung für den pes näher untersucht. Dafür wurden die vollständige cDNA sowie zwei verkürzte Versionen in verschiedene TRE-beinhaltende Expressionsvektoren kloniert. Anschließend wurden diese Vektoren durch Elektroporation jeweils in die wandernden Zellen des pes von YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Mäusen eingebracht, um so die Auswirkungen einer Über- bzw. Missexpression des Rezeptors untersuchen zu können.

Mit diesem Versuchsaufbau soll die Frage beantwortet werden, welche Rolle der Unc5H3 Rezeptor für die Wanderung spielt.

Die Expressionsmuster des Netrin-1 und seinen Rezeptoren sind für die embryonale Hirnentwicklung gut dokumentiert. Hingegen sind die Expressionsmuster von Neogenin und Unc5H4 für diesen Bereich bis heute nur sehr unzureichend beschrieben. Daher wurden die Expressionsmuster von Netrin-1, DCC, Neogenin und Unc5H1-4 durch eine vergleichende Studie untersucht, um folgende Fragen zu klären:

1. Welche Bedeutung haben Netrin-1 und seine Rezeptoren für Pax6 positive Zellwanderungen?
2. Wo sind Netrin-1 und seine Rezeptoren während der embryonalen und postnatalen Entwicklung der Maus im zentralen Nervensystem exprimiert?
3. Wie unterscheiden sich die Expressionsmuster des Netrin-1 und seiner Rezeptoren voneinander?
4. Gibt es zeitliche und räumliche Unterschiede im Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren im Verlauf der embryonalen und postnatalen Hirnentwicklung?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### Mikroskopie

- Photomikroskop Axiophot, Zeiss (Oberkochen) mit Plan-Neofluar Objektiven 2,5x/0,075 (Objektivvergrößerung/Numerische Apertur), 10x/0,30, 20x/0,50, 40x/0,75, 63x/1,25 Öl sowie mit Objektiven mit weitem Arbeitsabstand UD 20x/0,57 C und UD 40x/0,65 C. Fluoreszenzsatz 09 zur Beobachtung von GFP (Anregungsfilter: Bandpass 450-490 nm, Strahlenteiler: 510 nm, Sperrfilter: Tiefpass 520 nm)
- Gekühlte CCD-Kamera Spot 2 für Axiophot, Visitron (Puchheim)
- Stereomikroskop MZ12, Leica (Heerbrugg/Schweiz) mit Objektiv Plan 1,0x, 35mm-Kamera MPS 60

##### Histologische Schnitte und Präparation

- Vibratom Typ 1000, Technical Products International (St. Louis/USA)
- Präparationsbesteck: Fine Science Tools (Heidelberg), Aesculap (Tuttlingen)
- Horizontaler Kapillarpuller DMZ Universalpuller, Zeitz Instrumente (Augsburg)

##### Molekularbiologie

- Horizontale Gelelektrophoresekammern Mini-Sub Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT und Sub Cell 192, Biorad (München)
- Regelbares Netzgerät Power Pac 300, Biorad (München)
- Geldokumentationssystem Eagle Eye, Stratagene, über Biocrest (Amsterdam, Niederlande)
- Elektroporator für Bakterien E. coli Pulser, Biorad (München)
- PCR-Thermocycler MJ Research PTC-200 DNA Engine, Biozym (Hess. Oldendorf)
- Photometer zur DNA-Mengenbestimmung GeneQuant, Pharmacia (Erlangen)
- Spektrophotometer LC-55, Perkin Elmer (Überlingen)
- Tischzentrifugen Heraeus Biofuge fresco und Biofuge pico, Kendro (Hanau)
- Zentrifuge für Bakterienkulturen Heraeus Typ 4123, Kendro (Hanau)
- Zentrifuge Sorvall Super T-21 mit Rotoren SL-50T und SL-250T, Kendro (Hanau)
- Brutschränke Heraeus Typ B12, B6, Kendro (Hanau)
- Wasserbad Typ 1003, GFL (Burgwedel)

- Schüttelinkubator Typ 3033, GFL (Burgwedel)
- Apothekerwaage Spoerhase Typ B6, Sartorius (Göttingen)
- Laborwaage Typ 1419 MP8-1, Sartorius (Göttingen)

#### Zellkultur

- Inverses Mikroskop, Zeiss (Oberkochen) mit Objektiv 40/0,60
- Schüttelwasserbad Typ 1083, GFL (Burgwedel)
- Sicherheitswerkbänke Heraeus LaminAir TL und HeraSafe HS12, Kendro (Hanau)
- CO<sub>2</sub>-begaste Brutschränke Heraeus, Kendro (Hanau)

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

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

#### Puffer, Lösungen und Kulturmedien

- 2xBBS [BES buffered saline]: 50mM BES (N,N-bis-[2-Hydroxyethyl]-2-Aminomethan-Sulfonsäure), 280mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, sterilfiltrieren.
- BSA-Gelatine: Für ca. 500 ml: 450 ml PBS mit 2,2g Gelatine versetzen, bei 60°C rühren bis gelöst, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, 70g Rinderserumalbumin einrühren bis gelöst, aliquotieren und bei -20 C aufbewahren
- DMEM/F12: Dulbecco's MEM / NUT Mix F-12 (Gibco), (1:1) mit 0,6% Glucose, 0,02mM Glutamin, 5mM HEPES, 5% Horse Serum, 5% Fötale Kälberserum, 100U/ml Penizillin, 0,1mg/ml Streptomycin
- 0.5M EDTA: 186,1g/l EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) Na<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 8,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
- Ethidiumbromidlösung: 0.5mg/l in H<sub>2</sub>O bidest.



- Färbelösung (ISH): 4,5µl/ml NBT-Stammlösung (75mg/ml in 70% DMF), 3,5µl/ml BCIP-Stammlösung (50mg/ml in DMF) in NTMT
- Hybridisierungspuffer (ISH): 1x Salzlösung (für ISH), 50% Formamid (ultra-rein, Sigma), 10% Dextransulfat, 1mg/ml Hefe-RNA, 1x Denhardtsche Lösung (Sigma), 2% Boehringer-Blockierungsreagenz (Roche) in H<sub>2</sub>O dest. (DEPC-behandelt). Bei 50 C inkubieren, bis das Blockierungsreagenz gelöst ist
- LB-(Luria-Bertani) Medium: 10g/l NaCl, 10g/l Trypton oder Pepton, 5g/l Hefeextrakt in H<sub>2</sub>O bidest., für Platten 20 g/l Agar hinzufügen, autoklavieren.
- LB-Ampicillin-Agar-Platten: LB-Medium; für Platten 20 g/l Agar hinzufügen, autoklavieren. Vor Zugabe von 1g/l Ampicillin (sterilfiltriert) auf höchstens 50°C abkühlen lassen
- Lösung A: 0,2x oder 1x SSC, 50% Formamid (reinst), 0,1% Triton-X100 oder Tween-20 in H<sub>2</sub>O bidest.
- NTMT: 100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 9,5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton-X100 oder Tween-20 in H<sub>2</sub>O bidest.
- 4% Paraformaldehyd: PBS auf 60 C erhitzen, Paraformaldehyd unter Rühren zufügen, mit einigen Tropfen 1M NaOH klären; pH soll etwa 7,0 sein. Aliquotieren, bei -20°C lagern
- PBS [(engl.) Phosphate Buffered Saline]: 8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, autoklavieren
- PBT: PBS + 0,1% Triton-X-100
- Prähybridisierungspuffer (ISH): 1x Salzlösung (für ISH), 50% Formamid (ultra-rein, Sigma), 10% Dextran (Sigma), 2% Boehringer-Blockierungsreagenz (Roche) in H<sub>2</sub>O dest. (DEPC-behandelt). Bei 50 C inkubieren, bis das Blockierungsreagenz gelöst ist
- 10x Salzlösung (für ISH): 114g NaCl, 14,04g Tris-HCl, 1,34g Tris-Base, 7,8g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 7,1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100ml 0,5M EDTA, ad 1000ml H<sub>2</sub>O bidest., pH 7,5, autoklavieren
- SOB-Medium: 20g/l Trypton oder Pepton, 5g/l Hefeextrakt, 0,5g/l NaCl in H<sub>2</sub>O bidest. durch Rühren lösen, 0,25% 1M KCl-Lösung und 0,5% 2M MgSO<sub>4</sub> zufügen, pH7 mit 1M NaOH einstellen, auf 1l mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen und autoklavieren
- SOC-Medium: SOB-Medium, 2% sterilfiltrierte 1M Glucose in H<sub>2</sub>O zugeben
- 20x SSC [(engl.) Standard Sodium Citrate]: 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 7 einstellen, autoklavieren
- 10x TBE-Puffer: 108g TRIZMA/Tris Base, 55g Borsäure, 40ml 0,5M EDTA (pH 8) in 1000ml H<sub>2</sub>O lösen. pH nicht einstellen.

- TB-Waschlösung: 3,02g/l Pipes, 2,2g/l CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 18,64g/l KCl in H<sub>2</sub>O bidest. durch rühren lösen, pH 6,7-7 mit 5M KOH (oder 5M NaOH) einstellen, evtl. im Wasserbad bei 37°C erwärmen, 10,88g/l MgCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O zugeben auf 100% auffüllen und sterilfiltrieren
- 10x TBS [(engl.) Tris Buffered Saline]: 60,5g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan], 87,7g/l NaCl in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 7,4 mit HCl conc. einstellen, autoklavieren
- 10x TBST [(engl.) Tris Buffered Saline + Triton]: 81,8g/l NaCl, 2g/l KCl, 25% 1M Tris pH 7,5 in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, autoklavieren, nach dem Abkühlen 1% Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat) oder Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) zugeben
- 1M Tris: 60,5g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan] in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, gewünschten pH mit HCl conc. einstellen, autoklavieren
- TE [Tris-EDTA-Puffer]: 1,6g/l TRIZMA Base [Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan], 0,1% 1M EDTA in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 7,4 einstellen, autoklavieren

#### Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Die hervorgehobenen Nukleotide geben die Restriktionsschnittstelle wie folgt an:

**ACT AGT**: *SpeI*

**TCT AGA**: *XbaI*

**CTC GAG**: *XhoI*

Nr.	Bezeichnung	Sequenzen in 5'-3'-Richtung
1	5H3-A-U	GAT <b>ACT AGT</b> CTG GCT GGG CTT TCG GCTGTT
2	5H3-A-L	CAT TGA GTG GGG CTG GGT TGG TG
3	5H3-B-U	GAA GAG TCG GAA GGC ATA C
4	5H3-B-L	TAC AGT CAC ATA CAT TTC ATA
5	5H3-C-U	TGT GGT GGC CCT GTT TGT GTA TCG
6	5H3-C-L	CCT CCC ATT TGC CTC TCC AGT TGT
7	5H3-D-U	ATC TTT GGG CCC CTC TGC TGC TCT
8	5H3-D-L	TAT CCG TCC CCC AAG TTT CCT GTT
9	Unc5H3FrIV-L2	AGC CAG GAG <b>TCT AGA</b> CCG GAT AGG GAG AGG
10	Unc5H3FrII-U	GAG CAG GAA <b>ACT AGT</b> CTC CAG TGT CGG CCA CCT

11	UNC5H3-2-L	TGA GGA GTC <b>TCT AGA</b> AAT GAT GTC AGA CTC AAA
12	UNC5H3-4-U	AGC CTT GAT <b>ACT AGT</b> CTG GAG TAC AGC ATT AGA GTC
13	UNC5H3-4-L	TCC TTC TGC <b>TCT AGA</b> ATA CTG TCC TTC TGC TGC CAA
14	UNC5H3delIC-L	TGA GGA GTC <b>ACT AGT</b> AAT GAT GTC AGA CTC AAA
15	UNC5H3delIDD-L	AGC CAG GAG <b>ACT AGT</b> CCG GAT AGG GAG AGG AAT
16	UNC5H3full-L	TCC TTC TGC <b>ACT AGT</b> ATA CTG TCC TTC TGC TGC CAA
17	EphrinB1-U	GAC GGG GCT <b>TCT AGA</b> TCT GCC CCG GGG AAA ATG G
18	EphrinB1-L	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAC <b>TCG</b> <b>AGG</b> CCG CCC GCT GCT GTG TAT G
19	EphrinA5-U	TTT GGG TCG <b>TCT AGA</b> GCT GGC TAG GCG TGA TGT
20	EphrinA5-L	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAC <b>TCG</b> <b>AGC</b> AAA AGG CGG CTG GGT AT
21	EphA7-U	GAC GGG GCT <b>TCT AGA</b> CAA GCA GCT CCC TCG CAA GTG A
22	EphA7-L	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAC <b>TCG</b> <b>AGT</b> AAC CCG GGA AAG GCC AAA ATC
23	EphA3-U	GAC GGG GCT <b>TCT AGA</b> GCT CGG CTG CTG CGT CCT C
24	EphA3-L	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAC <b>TCG</b> <b>AGC</b> CTT CCG GCC TCC TGT GTC C
25	Netrin-3-U	CGC AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA <b>CTC</b> <b>GAG</b> GCC GCC CTG GTG CTC TGC TAT
26	Netrin-3-L	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAT <b>CTA</b> <b>GAC</b> CGT CCC TGG TGT CTC CCT GAA
27	er81-U	GGA ACA <b>CTC GAG</b> CAA ACA TCC CCT TCC CAC CAC AA

28	er81-L	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAT CTA GAT ACT CCC GCC CAC CAG CAA ATA
----	--------	--

### Plasmidvektoren

#### pBluescript II SK (+) Vektor

Klonierungsvektor für PCR Produkte. Polylinkerregion; lacZ'-Komplementierungsfragment; ColE1-Replikationsursprung; f1-Phagenreplikationsursprung; Ampizilinrestistenz und einer „multiple cloning side“ (MCS). 2961bp Genbank X52328; Stratagene

#### p-Drive Klonierungsvektor

Klonierungsvektor für PCR-Produkte; Polylinker – lacZ- $\alpha$ - Komplementierungsfragment, f1- Phagenreplikationsursprung, Ampizilin- und Kanamycin-Resistenz; ColE1-Replikationsursprung; MCS; 4552bp; Qiagen.

#### pDrive HA Vektor

Der originale pDrive Cloning Vektor wurde innerhalb der MCS um das HA-Epitop erweitert. Bei dem HA-Epitop handelt es sich um die Peptid Sequenz YPYDVPDYA aus dem humanen Influenza Hämagglutinin Protein (Wilson et al., 1984). In der Wildtyp-Maus kommt dieses Protein nicht vor, daher ist es gut zur Detektion und Markierung von Proteinen geeignet, indem das Protein an das HA-Epitop fusioniert und das translatierte Epitop anschließend mit Hilfe eines Anti-HA Antikörpers nachgewiesen wird.

#### pDrive Myc Vektor

Der originale pDrive Cloning Vektor wurde innerhalb der MCS um das c-Myc Epitop erweitert. Bei dem c-myc Epitop handelt es sich um die Peptid Sequenz EQKLISEEDL aus dem humanen c-myc Protein (Evan et al., 1985). Dieses Protein ist nukleär lokalisiert und konnte in verschiedenen humanen Tumoren nachgewiesen werden (Alitaro et al., 1983). In der Wildtyp-Maus kommt dieses Protein nicht vor, daher ist es gut zur Detektion und Markierung von Proteinen geeignet, indem das Protein an das c-myc Epitop fusioniert und das translatierte Epitop anschließend mit Hilfe eines Anti-c-myc Antikörpers nachgewiesen wird.

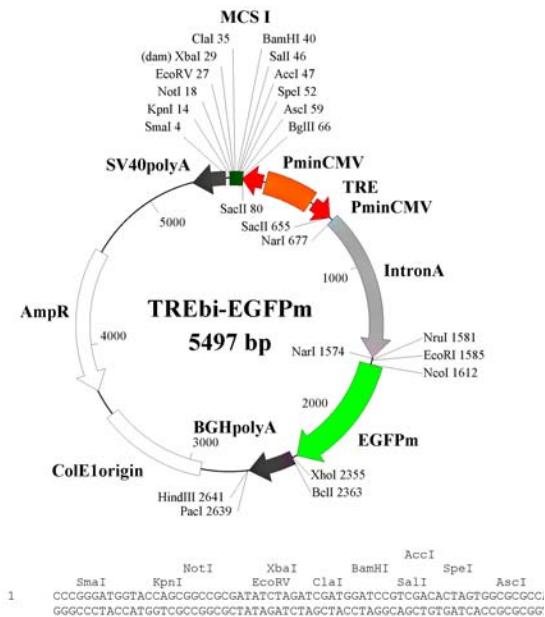
### pDrive-EGFPm Vektor

Der originale pDrive Cloning Vektor wurde innerhalb der MCS um das EGFPm erweitert; 4552bp.

### TREbi- EGFPm Vektor

Expressionsvektor für Transreporterkonstrukte; zwei CMV-Promotoren, die in entgegengesetzter Richtung (bidirektionell (bi)) die Transkription steuern; das TRE-Element, Tet-Response-Element, ist die Bindestelle für das tTA der YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA-Mäuselinie. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus der Tetracyclin-Repressor-(TetR)-Domäne aus *E. coli*, die hochspezifisch an TRE bindet und VP16, einer Transaktivierungsdomäne, die stromabwärts gelegene Elemente von TRE stark zur Transkription anregt. Der Vektor besitzt eine Polylinkerregion, anschließend folgt ein Polyadenylierungssignal, Ampizilinresistenz und der ColE1- Replikationsursprung; Weiterhin enthält der Vektor ein EGFPm Konstrukt, das Enhanced Grün Fluoreszierende Protein (Cormack et al., 1996) Dieses unterscheidet sich vom nativen GFP aus *Aequorea victoria* (Shimomura & Johnson, 1975) durch einen humanisierten Codongebrauch (Zolotukhin et al., 1996), der zu einer verbesserten Expression in Säugetierzellen führt; 5497bp.

Dieser Vektor ist Teil des binären Reportersystems, der im Zusammenhang mit der YAC-transgenen Mauslinie P<sub>hPax6</sub>-tTA (siehe Versuchstiere) verwendet wird. Dabei wird unter Kontrolle des gewebespezifischen Promotors, dem humanen Pax6, ein Transaktivator exprimiert, der seinerseits erst durch Bindung an das DNA-Element TRE die Expression des Reportergens, z.B. EGFP oder andere Gene die in den Vektor kloniert wurden, kontrolliert (Abb. 9).



**Abb. 9: TREbi-EGFPm Vektor zur Expression von Transreporter-Konstrukten**

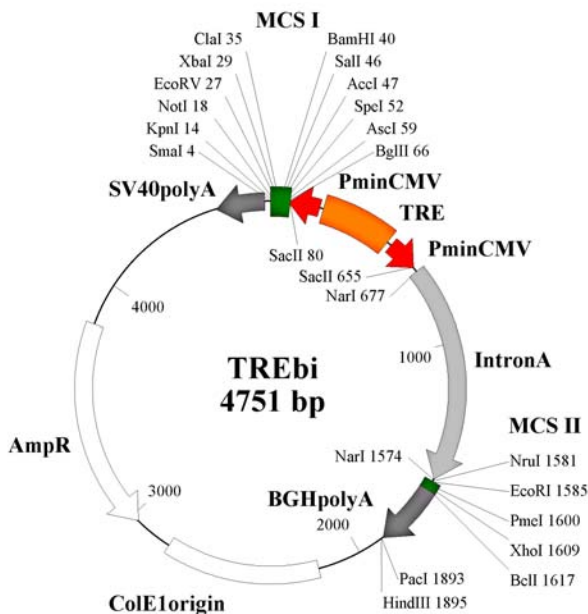
Der Vektor besitzt zwei CMV- Promotoren, die in entgegengesetzter Richtung die Transkription steuern. Das TRE-Element (Tet-Response-Element) ist die Bindestelle für tTA. Dies ist ein Fusionsprotein aus der Tetracyclin-Repressor-(TetR)-Domäne aus E. coli, die hochspezifisch an TRE bindet und VP16, einer Transaktivierungsdomäne, die stromabwärts gelegene Elemente von TRE stark zur Transkription anregt. Die Polylinkerregion des Vektors ist im Detail angegeben.

**TREbi-EGFPm Vektor**

Expressionsvektor für Transreporterkonstrukte. Dieser Vektor besitzt statt eines EGFPm ein nukleäres EGFP. Der restliche Aufbau des Vektors entspricht dem Aufbau des TREbi-EGFPm; 5578bp (siehe Abb. 9).

**TREbi-4751 Vektor**

Dieser Vektor hat grundsätzlich den gleichen Aufbau wie der TREbi-EGFPm Vektor. Der Unterschied liegt einzig in dem Austausch des EGFPm durch eine zweite Polylinkerregion. Durch diese Änderung kann das Transreporterkonstrukt und das Markerprotein (z.B. GFP) variabel in den Vektor eingebaut werden, 4751bp (Abb.10).



**Abb. 10: TREbi 4751bp Vektor zur Expression von Transreporter-Konstrukten**

Der Vektor besitzt, genau wie der TREbi-EGFPm Vektor zwei CMV-Promotoren, die in entgegengesetzter Richtung die Transkription steuern. Dieser Vektor unterscheidet sich vom TREbi-EGFPm durch eine zweite Polylinkerregion. Dafür besitzt dieser Vektor kein EGFP: Dadurch können gleichzeitig zwei Gene variabel in den Vektor eingebaut werden.

### 2.1.3 Eigene Subklonierungen

Alle durch PCR gewonnenen Subklone wurden bei MWG Biotech, Ebersberg, sequenziert. Alle durch Restriktionsverdau und Ligation von Plasmid-DNA gewonnenen Subklone wurden anhand des Bandenmusters im Restriktionsverdau identifiziert und in der Regel nicht sequenziert.

#### Subklonierung des Unc5H3 Gens

Für die Subklonierung des Unc5H3 Gens wurde ein 2850bp langes Genfragment verwendet, das alle relevanten Abschnitte des Rezeptors enthält. Dieser Abschnitt des Gens wurde mit Hilfe von 4 Primerpaaren durch PCR subkloniert und anschließend zusammenkloniert. Weiterhin wurden trunkierte Versionen des Gens hergestellt. Es entstand eine vollständige Version die das ganze Gen beinhaltet, eine Version, in der das Gen ohne der Death Domäne vorhanden ist ( $\Delta DD$ ) und eine Version in der der ganze intrazelluläre Bereich des Gens bei der Klonierung weggelassen wurde ( $\Delta IC$ ). Genbank: NM 009472; NCBI.

A: Klonierung der Unc5H3 in den TREbi-EGFPm/mn-Vektor

PCR Fragment 1 (Fr1): Oligonukleotid 1 + 2; Lesebereich: 82-1033bp, PCR Produktlänge: 952bp; oberen Primer mit *SpeI* Schnittstelle.

PCR Fragment 2 (Fr2): Oligonukleotid 3 + 4; Lesebereich: 609-1863bp, PCR Produktlänge: 1255bp

PCR Fragment 3 (Fr3): Oligonukleotid 5 + 6; Lesebereich: 1335-2318bp, PCR Fragmentlänge: 984bp

PCR Fragment 4 (Fr4): Oligonukleotid 7 + 8; Lesebereich: 2206-3083bp, PCR Fragmentlänge: 878bp

Die 4 Fragmente wurden jeweils mit dem PCR Cloning Plus Kit Transformation Protocol (Qiagen) in den pDrive Klonierungsvektor transformiert.

Fr1 und Fr2 schneiden mit *BamHI*, ligieren= Fr1+2

Fr1+2 und Fr3 schneiden mit *KpnI*, ligieren= Fr1+2+3

Fr1+2+3 und Fr4 schneiden mit *ApaI*, ligieren= vollständiges Gen im Vektor

Vollständiges Gen mit *SpeI* und *NotI* schneiden und in TREbi-EGFPm- und TREbi-EGFPmn Vektor klonieren.

B: Klonierung des Unc5H3Gens in den pDrive-Myc- und pDrive-HA-Vektor und anschließende Klonierung der Unc5H3 Varianten mit dem c-Myc/HA Tag in den TREbi-EGFPm/mn Vektor

Vollständige Version: Oligonukleotid 12 + 13; Lesebereich: 2230-2943bp, PCR Fragmentlänge: 714bp; PCR Produkt mit *SpeI* und *XbaI* schneiden. Die Vektoren pDrive Myc/Ha mit *SpeI* schneiden. Miteinander ligieren. Resultat und Fr4 (Klonierung A) mit *SpeI* und *BglII* schneiden und miteinander ligieren.

ΔDD: Oligonukleotid 9+13; Lesebereich:2206-2680bp, PCR Fragmentlänge:475bp; PCR Produkt mit *SpeI* und *XbaI* schneiden. Die Vektoren pDrive Myc/HA mit *SpeI* schneiden. Miteinander ligieren. Resultat und Fr4 (Klonierung A) mit *SpeI* und *BglII* schneiden und miteinander ligieren.

ΔIC: Oligonukleotid 10+11; Lesebereich: 706-1461bp, PCR Fragmentlänge: 755bp; PCR Produkt und pDrive Myc/HA Vektor mit *XbaI* und *SpeI* schneiden und ligieren. Resultat und Fr1 (Klonierung A) mit *SpeI* und *BamHI* (ΔIC), *SpeI* und *BspHI* (oder *BglII*, vollständige Version, ΔDD) schneiden und miteinander ligieren.

Alle 6 erhaltenen Vektoren mit dem Unc5H3 Gen (Myc/HA, Myc/HA ΔDD, Myc/HA ΔIC) und die Vektoren TREbi-EGFPm und TREbi-EGFPmn mit *SpeI* und *NotI* schneiden und miteinander ligieren.

C: Klonierung der drei Unc5H3 Varianten in den TREbi4751-Klonierungsvektor

Den Klonierungsvektor TREbi4751 und die erhaltenen Vektoren von Klonierung B mit *SpeI* und *NotI* schneiden. Den Vektor TREbi4751 und die drei Unc5H3 Varianten aus der Klonierung B miteinander ligieren.

D: Klonierung der drei Unc5H3 Varianten in den TREbi4751 Vektor fusioniert mit EGFP (aus pDrive EGFPm-Vektor) in beide MCSs

Vollständige Version: Oligonukleotid 12 + 17; Lesebereich: 2233-2943bp, PCR Fragmentlänge: 711bp;

ΔDD: Oligonukleotid 12 + 15; Lesebereich: 2233-2697bp, PCR Fragmentlänge: 465bp;

ΔIC: Oligonukleotid 10 + 14; Lesebereich: 706-1392bp, PCR Fragmentlänge: 687bp;

Alle drei PCR Produkte und den pDrive EGFPm Vektor mit *SpeI* schneiden und miteinander ligieren. Resultat der vollständigen Version und das Resultat aus Klonierung A mit *EcoRI* und *BglII* schneiden und miteinander ligieren. Resultat der ΔDD Version und das Resultat aus Klonierung A mit *EcoRI* und *EcoRV* schneiden und miteinander ligieren.



Resultat der  $\Delta IC$  Version und das Resultat aus Klonierung A mit *EcoRI* und *EcoRV* schneiden und miteinander ligieren. Alle drei Versionen und den TREbi4751bp Vektor mit *XhoI* oder *Sall* und *NruI* schneiden und entsprechende Paare miteinander ligieren. Somit ist jede Version jeweils in einer der beiden MCSs.

#### Subklonierung der Ephrine und Eph-Rezeptoren

Von den Ephrinen und ihren Rezeptoren wurden jeweils nur Teilstücke der DNA für eine *in situ* Hybridisierung subkloniert. Der obere Primer jedes Klons enthielt jeweils eine *XbaI*-, der untere Primer jeweils eine *XhoI*-Schnittstelle. Über diese Schnittstellen wurden die PCR Produkte in den pBluescript II SK(+) Vektor kloniert und anschließend sequenziert.

Eph-Rezeptoren:

EphA3: Primer 23 + 24; Lesebereich: 118-1151bp; PCR Produktlänge: 1034bp; Genbank: U 14941; NCBI

EphA7: Primer 21 + 22; Lesebereich: 28-1057bp; PCR Produktlänge: 1030bp; Genbank: X81466; NCBI

Ephrine:

EphrinA5: Primer 19 + 20; Lesebereich: 1-659bp; PCR Produktlänge: 659bp; Genbank: MMU90664; NCBI

EphrinB1: Primer 17 + 18; Lesebereich: 712-1556bp; PCR Produktlänge: 845bp; Genbank: BC 006797; NCBI

#### Subklonierung des Netrin-3

Vom Netrin-3 wurde nur ein Teilstück der DNA für eine *in situ* Hybridisierung subkloniert. Primer 25 + 26; Lesebereich: 422-1253bp; PCR Produktlänge: 832bp; Verwendete Restriktionsenzyme: oberer Primer: *XhoI*, unterer Primer: *XbaI*; Über diese Schnittstellen wurde das PCR Produkt in den pBluescript SK(+) Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Genbank: NM 010947; NCBI.

#### Subklonierung des er81

Vom er81 wurde nur ein Teilstück der DNA für eine *in situ* Hybridisierung subkloniert. Primer 27 + 28; Lesebereich: 832-1821bp; PCR Produktlänge: 990bp; Verwendete Restriktionsenzyme: oberer Primer: *XhoI*, unterer Primer: *XbaI*; Über diese Schnittstellen wurde das PCR Produkt in den pBluescript SK(+) Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Genbank: NM 007960; NCBI.

### 2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper:

- Monoklonaler Anti-HA Antikörper, Roche. Verdünnung 1:500
- Monoklonaler Anti-c-myc Antikörper, Roche. Verdünnung 1:500
- Monoklonaler Anti-Fluorescein Antikörper, Verdünnung 1:4000

Sekundäre Antikörper:

- Polyklonaler Anti-Maus-IgG aus Esel, gekoppelt an Fluoresceindiisothiocyanat (FITC), Jackson Immunolabs. Verdünnung 1:500

### 2.1.5 Versuchstiere, Zelllinien und Bakterienstämme

Mäuse:

**CD1**, Zucht im MPI für Hirnforschung, Frankfurt am Main. Diese Wildtyp-Mäuse wurden für Vibratonschnitte und anschließender *in situ* Hybridisierung verschiedener Gene verwendet.

**YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA**: Hergestellt von K. Benzing (Benzing K., Dissertation, Mainz 2000), nun in Zucht im MPI für Hirnforschung. In dieser Mäuselinie wurde das YAC 593 zusammen mit dem tTA stabil in das Mausgenom transfektiert. Das YAC 593 enthält dabei in der Mitte die menschliche genomische Pax6 Region. Diese Region dient als gewebespezifischer Promoter für das anschließende tTA-Konstrukt. Dieses wiederum wurde zusammen mit dem YAC 593 ins Mausgenom transfektiert. Die Expression des tTA wird durch den humanen Pax6-Promoter gesteuert und kann daher nur in Zellen stattfinden, die Pax6 exprimieren. Mit dieser transgenen Mäuselinie ist die visuelle Darstellung der Pax6 positiven Wanderungsströme durch eine Expression eines Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) beinhaltenden Reporter-DNA-Konstrukts möglich. Durch diese Reporter-DNA-Konstrukte ist auch eine gleichzeitige Expression des GFP mit einem weiteren Reporter-DNA-Konstrukt möglich (z.B. eines an der Wanderung beteiligten Proteins).

Säuger-Zelllinien:

**HEK-293**: aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die mit Adenovirus 5 DNA transformiert wurden (Graham et al., 1977)

COS-7: aus der Nieren-Fibroblasten-Zelllinie CV-1 (aus afrikanischen grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*)) durch Transformation mit einer replikationsdefizienten SV40-Variante. Die Zellen enthalten das T-Antigen (Gluzman, 1981).

Beide Zelllinien sind in Kultur bei U. Arbogast, MPI für Hirnforschung, Frankfurt am Main.

Bakterien:

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup> deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk\*) supE44-1 thi-1 gyrA96 relA1, wurde zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien verwendet, die für die Transformation und Vervielfachung der DNA dienen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA Standardmethoden

Standardmethoden zur Vervielfachung, Aufreinigung, Analyse und Modifikation von Plasmid- und genomischer DNA wurden gemäß den etablierten Vorschriften durchgeführt.

Dazu gehören:

- Nährmedien zur Kultur von *E.coli*
- Transformation von elektro- (Chuang et al., 1995) und chemisch kompetenten *E.coli* (Inoue et al., 1990)
- Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Mini- und Maxiprep Kits, Qiagen)
- Aufreinigung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (Mäuse)
- Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösung
- Elektrophoretische Auftrennung von DNA (Agarose-Gel)
- Aufreinigung von DNA aus Gelen und Lösungen
- Restriktionsverdau von DNA
- Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA
- Ligation von DNA-Fragmenten
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

### 2.2.2 Kultur und Transformation von Zelllinien

Die Kultur von COS-7 und HEK-293-Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Als Kulturmedium wurde DMEM/Nut Mix F-12 (Gibco) verwendet. Dem Medium wurden folgende Substanzen zugesetzt: 10% fötales Kälberserum (Roche), 2mM L-Glutamin,

100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden 2x pro Woche passagiert und mit neuem Medium versehen. Zur Ablösung der Zellen wurde Trypsin-EDTA verwendet. Alle Kulturmedien und Lösungen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert.

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

- Für jede zu transfizierende Petrischale wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt:
  - 5µg DNA
  - 225µl H<sub>2</sub>O
  - 250µl 2xBBS
- Je Schale wurde 25µl 2,5M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu der vorgelegten DNA-Lösung gegeben, durch Pipettieren gemischt und unmittelbar auf die Zellkultur pipettiert. Dabei sollte die ganze Zelloberfläche mit der DNA-Lösung beträufelt werden.
- Die Zellkultur wurde durch leichtes Schwenken durchmischt.
- Nach 6-24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

### 2.2.3 c-Myc/HA Färbung von Zellkulturen

- Die Kulturen wurden 1x mit PBS gewaschen
- Anschließend wurden die Kulturen mit 4% PFA in PBS für 10min. fixiert
- Die Kulturen wurden 3x mit PBS gewaschen
- die Kulturen wurden für 20min. in PBS-BSA ( 2% BSA in PBS) fixiert und erneut mit PBS gewaschen
- der Antikörper 1 (Anti-c-myc, 1:500 oder Anti-HA, 1:500; beide Roche) wurde in PBS-BSA gelöst und mindestens für eine Inkubationszeit von 30min. zu den Kulturen gegeben
- Die Kulturen wurden 3x für 5min. mit PBS gewaschen
- für 20min. wurde mit 2% Ziegen Serum in PBS-BSA inkubiert und wieder 2x für 5min. mit PBS gewaschen
- der Antikörper 2 (FITC, goat anti mouse 1:500) wurde in PBS-BSA gelöst und mind. für 30min. inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt!!
- Die Kulturen wurden 5x für 5min. mit PBS gewaschen
- Die Kulturen wurden mit 5 Tropfen Vectashild (Vector Laboratories,U.K), mit 0,1mg/ml Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma), zur Zellkernfärbung, eingedeckelt

#### 2.2.4 Verpaarung und Präparation von Embryonen

Die Mäuse wurden über Nacht verpaart und trüchtige Tiere am nächsten Tag durch den Vaginalpfropf identifiziert. Der Mittag des auf die Kopulationsnacht folgenden Tages wurde als Embryonaltag (E) 0,5 definiert. Die tatsächliche Entwicklung der einzelnen Embryonen eines Wurfes weicht besonders bei jungen Embryonalstadien stark voneinander ab. Verwendete Tiere wurden daher zusätzlich über ihre äußerlichen Merkmale einem Entwicklungsstadium zugeordnet (Theiler, 1972; Bard et al., 1998).

Präparation:

Die trüchtigen Mäuse wurden – in Übereinstimmung mit den tierschutzrechtlichen Bestimmungen – durch einen Genickbruch getötet. Zur Entnahme der Embryonen wurde das ventrale Integument sowie das Bauchfell aufgeschnitten und die Uteri entnommen. Die Uterushörner und die Fruchtblasen, die im Uterushorn aufgereiht sind, wurden aufgeschnitten und die Embryonen entnommen und für die weitere Präparation in PBS (4°C) überführt.

Fixierung:

Je nach Verwendungszweck wurden die Präparate unterschiedlich behandelt:

- Für die *in-situ*-Hybridisierungen wurde das Gewebe für mindestens 24h in 4% PFA fixiert (siehe 2.2.5)
- Für Elektroporationen wurden die Gewebe in GBSS überführt und anschließend sofort weiterverarbeitet (siehe 2.2.6)

#### 2.2.5 Genexpressionsanalyse

Schnittanfertigung

- die Embryonen wurden nach der Fixierung in 4% PFA für 2x 10 min. in PBS gewaschen
- anschließend wurden die Embryonen für 5min. in Glutaraldehyd präfixiert. Zum Einbetten wurde 400µl 25% Glutaraldehyd (Sigma) zu 4 ml BSA/Gelatine-Mix gegeben, schnell gemischt und in eine Mulde gegeben (Resin Embedding Moulds 12mm x 15mm x 5mm von Agar Scientific LTD; Plano). Die Embryonen wurden vorsichtig in dem BSA/Gelatine Gemisch platziert, bis die Masse hart wurde.
- Anschließend wurde der Block vorsichtig aus der Mulde genommen, zurechtgeschnitten und mit Sekundenkleber am Vibratomblock befestigt.
- Das Vibratombad wurde mit eiskaltem PBS gefüllt

- Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 150µm hergestellt (Vibratomeinstellungen: Geschwindigkeit: 3 bis 5; Amplitude: 8-10).
- Die Schnitte wurden in Gewebekulturplatten (24 Vertiefungen; nur einen Schnitt pro Vertiefung!) transferiert und durch eine Methanolreihe ( 5-10min. pro Schritt): 25%, 50%,75% Methanol in PBST, 2x 100% Methanol dehydriert
- Anschließend konnten die Schnitte für bis zu 6 Monate bei -20°C gelagert werden

#### Probensynthese für die RNA-*in-situ*-Hybridisierung

- Die folgenden Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge bei Raumtemperatur gemischt

	20µl Reaktion	50µl Reaktion
Steriles destilliertes Wasser (DEPC behandelt)	12,5µl	32,75µl
10x Transkriptionspuffer	2,0µl	5,0µl
10x NTP mix-Dig labelled UTP	2,0µl	5,0µl
Linearisiertes Plasmid	1,0µl	1,0µl
RNase Inhibitor	0,5µl	1,25µl
SP6, T7 oder T3 RNA Polymerase (20U/ml)	2,0µl	5,0µl

- Der Syntheseansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert
- Der Ansatz wurde anschließend mit 2,5µl (6,5µl\*) 4M LiCl und 75µl (185µl\*) Ethanol präzipitiert; die Lösung wurde gemischt und für 2 Stunden bei -20°C oder für 30min. bei -70°C inkubiert
- Nach der Inkubation wurde die Probe für 10min. zentrifugiert und das Pellet für kurze Zeit luftgetrocknet - wenn das Pellet zu trocken ist, ist es nicht mehr möglich es zu resuspendieren (ein wenig Ethanol beeinträchtigt die Hybridisierung nicht).
- Das Pellet wurde in 100µl Wasser (DEPC-behandelt) gelöst und 500µl Hybridisierungspuffer dazugegeben
- Die Probe wurde bei -20°C gelagert

\*für 50µl Reaktionen

Die verwendeten RNA Sonden gegen Netrin-1, DCC, Unc5H1-4, Pax6 und tTA stammen aus dem Material von D. Engelkamp.

## RNA-*in-situ*-Hybridisierung an Vibratomschnitten

### 1.Tag: Prähybridisierung, Hybridisierung

- Die Schnitte wurden über eine Methanolreihe (5-10min. pro Schritt) in PBST rehydriert und anschließend für 10min. mit 6% Wasserstoffperoxid in PBT gebleicht
- Die Schnitte wurden für 2x 10min. in PBT gewaschen
- Der Prähybridisierungspuffer wurde zu den Schnitten gegeben (200/500µl pro Vertiefung in 24/12 Platten) und für 4-5 Stunden bei 68°C inkubiert (mit Parafilm abdecken).
- Die Probe wurde im Hybridisierungspuffer gelöst (Verdünnung 1:200-1:1000) und gevortext. Der Probenmix wurde für 5-10min. bei 70°C denaturiert und abzentrifugiert
- Der Prähybridisierungsmix wurde durch den Probenmix (120µl/240µl pro Vertiefung) ersetzt und die Schnitte bei 68°C (mit Parafilm abdecken) über Nacht hybridisiert

### 2.Tag: Posthybridisierungswaschen, Blocken und Antikörperinkubation

- Der Hybridisierungsmix wurde entfernt und 2x 10min. und 2x 30min. bei 68°C in Lösung A (1xSSC) gewaschen
- Die Schnitte wurden anschließend 2x 10min. bei 68°C in Lösung A (0,2x SSC) gewaschen, auf Raumtemperatur heruntergekühlt und 3x10min. in TBST gewaschen
- Die Schnitte wurden mit 10% hitzeinaktiviertem Schafserum in 1x TBST für >3 Stunden bei Raumtemperatur geblockt und anschließend wurde das Schafserum durch 1:2500 anti-Dig AP-Fab (Primärantikörper) in 1% Schafserum in 1x TBST ersetzt
- Die Inkubation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt

### 3.Tag: Waschen, Färbung

- Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur 2x 10min. und 6x 30min. in TBST (auf langsam rotierendem Schüttler) gewaschen
- Anschließend wurden die Schnitte 2x 10min. in NTMT gewaschen und das NTMT durch die NBT/BCIP Färbelösung (300/600µl) ersetzt
- Die Schnitte wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und regelmäßig die Färbeintensität kontrolliert.
- Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte 2x 10min. in NTMT gewaschen
- Die Schnitte wurden in PBS (pH 3-4)/1% TritonX-100 für mindestens 30min. (bei 4°C bis zu 3 Tagen) gewaschen.

4.Tag:

- Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 20min. in 4% PFA/0.1% Glutaraldehyd nachfixiert und mit PBS, pH 5,5 und anschließend mit 25% Glycerol in PBS, pH 5,5 gewaschen
- Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und in Kaisergelatine (Merck) eingedeckelt
- Nach mindestens einem Tag der Aushärtung wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet

RNA-*in-situ*-Hybridisierung an Gewebekulturen (*in vitro* Hirnstämme)

Die RNA-*in-situ*-Hybridisierung an Gewebekulturen wurde nach dem gleichen Protokoll wie die RNA-*in-situ*-Hybridisierung an Vibratomschnitten durchgeführt. Bei der Hybridisierung an Gewebekulturen wurde bei jedem Schritt die Menge an Waschlösung, Prähybridisierungsmix, Hybridisierungsmix, Blockierungslösung, Antikörperlösung und Postfixierungsmix im Vergleich zum Ausgangsprotokoll verdoppelt.

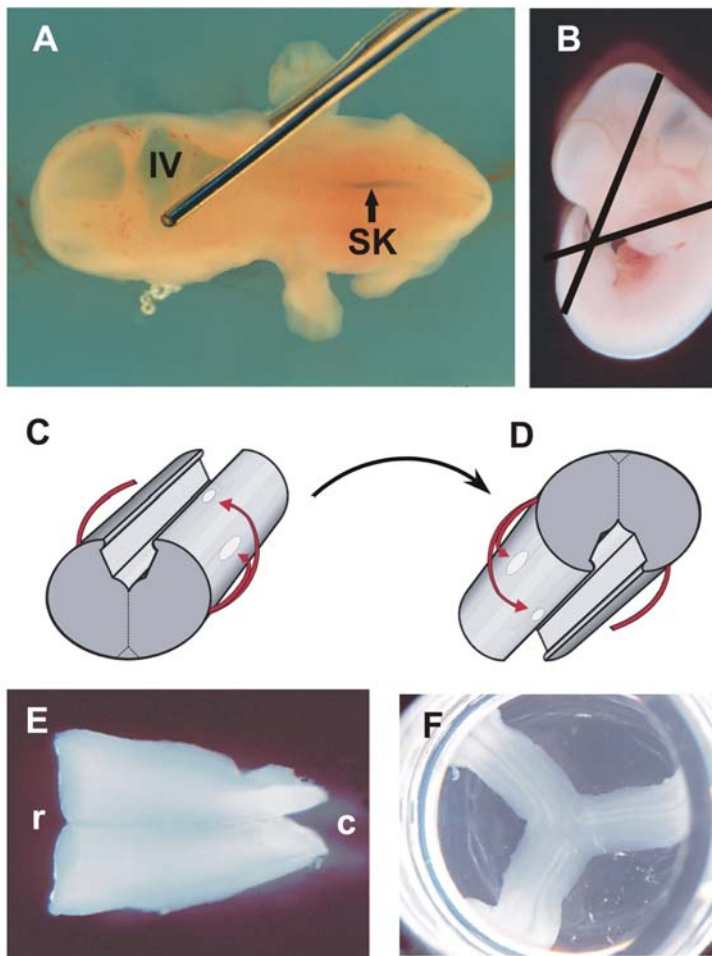
### 2.2.6 Elektroporation der Medulla, Präparation und Kultur

Für die Elektroporation der rhombischen Lippe mit DNA-Konstrukten wurden ausschließlich YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgene Embryonen des Stadiums E12,5 verwendet. Die Embryonen wurden, wie in 2.2.4 beschrieben, aus dem Uterus und der Fruchtblase präpariert und in GBSS (Gey's Balanced Salt Solution, Sigma) transferiert.

Für die Injektion der DNA wurde in die Mitte einer Petrischale, gefüllt mit 1%iger Agarose, eine Vertiefung geschnitten, in die die Embryonen mit der ventralen Seite nach unten platziert wurden. Die DNA wurde mit einer Konzentration von ca. 0,5µg/µl in TE-Puffer verwendet. Da die DNA-Lösung durchsichtig ist und somit keine visuelle Kontrolle bei der Injektion gegeben ist, wurde die DNA-Lösung mit Methyl-Echtgrün (<0,01%, FastGreen, Sigma) angefärbt. Dadurch konnte die Menge der injizierten Lösung kontrolliert werden. Pro Embryo wurden ca. 2µl DNA mit einer ausgezogenen Glaskapillare in den Spinalkanal und den vierten Ventrikel injiziert. Direkt nach der DNA-Injektion wurde der Embryo elektroporiert. Für die Elektroporation stand der Elektroporator EPI 2500 (von Dr. L. Fischer; Lutherstr. 25a, 69120 Heidelberg) sowie selbst hergestellte zangenartige Elektroden mit Platin Enden (Ø 0,5mm; Länge 30mm) zur Verfügung. Die Anode der Elektrode wurde für die Elektroporation an der dorsalen Spitze der rhombischen Lippe und die Kathode auf der ventralen Seite des Embryos platziert. Jeweils eine der rhombischen



Lippen wurde 5x mit einem Rechteckimpuls von 50 Volt, einer Impulsdauer von 50ms und einem Impulsintervall von 1s elektroporiert.



**Abb. 11: Gentransfer durch Elektroporation und Präparation des Rhombencephalons**

A. In den Spinalkanal (SK) wurde DNA, angefärbt mit Methyl-Echtgrün, injiziert, bis der vierte Ventrikel (IV) gefüllt war. Die Anode der Elektrode wurde für die Elektroporation an der dorsalen Spitze der rhombischen Lippe und die Kathode auf der ventralen Seite des Embryos platziert. Jeweils die rechte rhombische Lippe wurde 5x mit einem Rechteckimpuls von 50 Volt, einer Impulsdauer von 50ms und einem Impulsintervall von 1s elektroporiert.

B. Für die Präparation des Stammhirns wurde mit einem Skalpell ein Schnitt durch das Mesencephalon und das Auge gesetzt, ein weiterer rostral der Vorderextremitäten (angedeutet durch die Linien). Anschließend wurde die Dachplatte geöffnet und das Stammhirn herauspräpariert. C-F: Für die Kultivierung wurden die Stammhirne mit der ventrikulären Seite nach unten (upside down)

Polytetrafluorethylen, Ø 30mm, Höhe 5mm, Porengröße: 0,4µm, Millipore) in DMEM/F12 Medium in einer 100 x 20 mm Gewebekulturschale kultiviert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. E: r:rostral; c: caudal.

Nach der Elektroporation wurde umgehend das Stammhirn aus dem Embryo präpariert. Dafür wurde mit einem Skalpell ein Schnitt durch das Mesencephalon und das Auge gesetzt und ein weiterer rostral der vorderen Extremitäten. Anschließend wurde die Dachplatte geöffnet und das Stammhirn herauspräpariert. Das Stammhirn wurde sofort mit der ventrikulären Seite nach unten („upside down“) auf einer Millicell CM Membran (Hydrophilisiertes Polytetrafluorethylen, Ø 30mm, Höhe 5mm, Porengröße: 0,4µm, Millipore) in DMEM/F12 Medium in einer 100 x 20mm Gewebekulturschale kultiviert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Auf jeder Membran wurden drei bis fünf Stammhirne mit dem caudalen Ende zueinander kultiviert. Unter diesen Bedingungen konnten die Präparate über eine Woche in Kultur gehalten werden. Zur visuellen Darstellung wurde jede Membran mit 0,5ml Neurobasalmedium in eine 35 x 10mm Gewebekulturschale transferiert und unter einem aufrechten Mikroskop mit Objektiven mit weitem Arbeitsabstand

betrachtet und digital fotografiert. Es wurden sowohl Durchlichtaufnahmen als auch Auflichtfluoreszenzaufnahmen hergestellt. Mit dem Computerprogramm MetaView war es möglich, Fotos zu generieren die das Schärfepoptimum aus einer ganzen Serie von Fotos darstellen. Dabei wurden 2-15 Fotos des gleichen Bereichs mit unterschiedlichen Fokusebenen aufgenommen und mit diesem Programm auf eine Ebene optimiert.

### **2.2.7 Transplantationsexperimente**

Insgesamt wurden 4 verschiedene Transplantationsexperimente durchgeführt.

Für jeden dieser Versuche wurde eine bzw. beide rhombische Lippe(n) eines YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Embryos des Stadiums E12,5 mit dem TREbi-EGFPm-Klonierungsvektor elektroporiert. Durch die Expression dieses Vektors werden alle elektroporierten und Pax6 positiven Zellen grün fluoreszieren. Dadurch kann die natürliche Wanderung der Progenitorzellen des pes beobachtet werden.

Nach der Elektroporation wurde das Stammhirn jedes Embryos, wie in 2.2.6 beschrieben, präpariert und kultiviert. Anschließend wurden die Stammhirne mit einem Skalpell (BAYHA, Tuttlingen) an verschiedenen, für jeden Transplantationsversuch spezifischen, Stellen geschnitten.

### **2.2.8 Kollagenkokultur (nach Guthrie&Lumsden, 1994)**

Herstellung des Kollagens

Das benötigte Kollagen kann entweder selbst hergestellt werden oder kommerziell erworben werden. Da das kommerzielle Kollagen nicht die gewünschte Wirkung hat, wurde es selbst hergestellt.

Für die Herstellung wurden 3 gefrorene Rattenschwänze in 95% Ethanol aufgetaut und anschließend die Sehnen mit sterilen Instrumenten und unter der Sterilbank vom restlichen Gewebe gelöst. Um die Sehnen lösen zu können wurden einzelne Wirbel des Schwanzes, am dünnen Ende beginnend, abgebrochen und die Sehnen frei gelegt. Die Sehnen wurden mit sterilem Wasser gereinigt, von Bindegewebsresten befreit und anschließend in ein Gefäß mit 250ml 0,5N Essigsäure gegeben. Die verwendeten Sehnen sollten ein Gewicht von mindestens 2g haben. Die Sehnen wurden in der Essigsäure für 24-48 Stunden bei 4°C gelöst und dabei wurde die Lösung ständig mit Hilfe eines Rührfischs in Bewegung gehalten. Erst als die Lösung trüb geworden war, wurde die Lösung bei 20.000g<sub>max</sub> und 4°C für eine Stunde abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weiter gearbeitet.

## Dialyse

Für die Dialyse wurden ausschließlich sterile Dialyseschläuche (25x16mm; Sigma) verwendet. Dafür wurden die Schläuche in EDTA-Wasser mit pH 7 ausgekocht und anschließend mit destilliertem Wasser durchgespült. Das Kochen und Spülen des Schlauches wurde 3x wiederholt. Abschließend wurde der Schlauch in Wasser autoklaviert. Dabei musste der Schlauch die ganze Zeit unter Wasser getaucht sein. Für die Dialyse wurde ein Dialysemedium vorbereitet, das aus 1/10 Basal Eagle's Medium mit Earle's Salz aber ohne L-Glutamin oder Natriumbicarbonat (BME, JRH Biosciences), pH 4, besteht.

Der sterile Schlauch wurde mit einer sterilen Dialyseklammer am Rand eines sterilen Becherglases befestigt und die Kollagen-Essigsäure-Lösung in das andere Ende des Schlauches gefüllt. Das zweite Ende wurde ebenfalls mit einer Dialyseklammer am Glas befestigt. Das Becherglas wurde mit dem 1/10 BME Medium gefüllt und bei 4°C für 24 Stunden gerührt. Das Medium wurde 3x, jeweils nach 24 Stunden gewechselt.

Nach drei Tagen der Dialyse wurden die Schläuche aus dem Medium genommen und das fertige Kollagen in 50 oder 15ml Falconröhren gesammelt.

## Herstellung des Kollagengels

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und unter der Sterilbank durchgeführt.

Für die Herstellung des Gels werden 10x BME mit Phenolrot, 7,5% Natriumbicarbonat und das hergestellte Kollagen benötigt.

In einem 1,5ml Eppendorfgefäß wurden durch vortexen gemischt:

450,0µl Kollagen

50,0µl 10x BME

1,3µl Natriumbicarbonat

Das Volumen des Natriumbicarbonats ist abhängig von der jeweiligen Zusammensetzung des Kollagens und kann zwischen 1-2µl variieren.

Von dem fertig gemischtem Gel wurden 20µl in eine 35 x 10mm Gewebekulturschale pipettiert und zur Polymerisation für 5min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücke auf dem Gel platziert und mit 50µl des Gels beschichtet. Die Gewebestücke sollten ca. 200 – 500µm auseinander liegen. Anschließend wurde die Gewebekulturschale wiederum bei 37°C für ca. 20min. inkubiert und danach ca. 1ml DMEM-F12 Medium zu der Kulturschale gegeben. Das fertige Explantat wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für mehrere Tage in Kultur gehalten und konnte mikroskopisch analysiert werden.

### **2.2.9 Apoptosedetektion mit der TUNEL-Methode und anschließender Anti-Fluorescein Färbung mit Alkalischer Phosphatase (*in situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)**

- Die Kulturen wurden 3x 10min. in PBS gewaschen und für mind. 30-60min. in Proteinase K [10-20µg/ml in 10mM Tris/HCl, pH 7,4-8] inkubiert
- Anschließend wurden die Kulturen 3x 20min. in PBS gewaschen
- Positivkontrolle: Eine Kultur wurde für 90min. bei 37°C in DNaseI [DNaseI: 1µg/ml in PBS] inkubiert
- Färbung: Die Kulturen wurden 1-2h im TUNEL-Mix bei 37°C (vor Licht schützen!) inkubiert  
 Ansatz: 450µl aus Flasche 2 (550µl) in Flasche 1 (50µl) geben und mischen  
 100µl Rest ist für die Negativkontrolle
- Die Kulturen wurden 3x 20min. in PBS gewaschen und für 1 Stunde in 4% Schafserum in 1x TBST präinkubiert
- Über Nacht wurden die Kulturen in Anti-Fluorescein ( $\alpha$ -FITC; 1:4000) in 1% Schafserum in 1x TBST inkubiert und am nächsten Tag 2x 10min. und 4x 30min. in TBST gewaschen
- Die Kulturen wurden 2x 10min. in NTMT gewaschen und das NTMT durch die NBT/BCIP Färbelösung [4,5µl NBT + 3,5µl BCIP auf 1ml NTMT] ersetzt. Die Färbedauer war abhängig von der Intensität
- Die Kulturen wurden 2x 10min. in NTMT und für mindestens 30min. und maximal 3 Tage bei 4°C in PBS (pH 3-4)/ 1% TritonX-100 gewaschen
- Die Postfixierung wurde für 20min. in 4% PFA/0,1% Glutaraldehyd bei Raumtemperatur durchgeführt und abschließend wurden die Schnitte in PBS (pH5,5) und mit 25% Glycerol in PBS (pH 5,5) gewaschen

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expressionsmuster von möglichen regulatorischen Proteinen der tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons

Mittlerweile ist eine ganze Reihe von Proteinen bekannt, die einen direkten Einfluß auf die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons nehmen. Dazu gehören das Netrin-1 mit seinen Rezeptoren DCC und Unc5H1-3 (Alcantara et al., 2000; Bloch-Gallego et al., 1999; Causeret et al., 2002), die Slit-Proteine und ihre Rezeptoren Robo1, Robo2 und Rig1 (Causeret et al., 2002; Gilthorpe et al., 2002) sowie das Morphogen Sonic Hedgehog (Charron et al., 2003). Daneben gibt es aber auch viele Proteine von denen ein Einfluß auf neuronale Wanderungen im Gehirn bereits bekannt ist, dies aber für die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons noch nicht nachgewiesen ist. Bei diesen Proteinen stellt sich daher die Frage, ob sie einen Einfluß auf die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons nehmen. Dazu gehören die Rezeptortyrosinkinasen Eph und ihre Liganden, die Ephrine. Von den bisher bekannten 14 verschiedenen Eph Rezeptoren und 8 Ephrinen wurden für eine nähere Untersuchung zwei Eph Rezeptoren und zwei Ephrine ausgewählt, die nachweislich Einfluß auf Zellwanderung oder Axonleitung nehmen. Unter den Eph Rezeptoren gehört dazu der EphA3 Rezeptor, der im Gehirn in den Regionen und zu den Zeiten der neuronalen Wanderung und axonalen Wegfindung exprimiert ist (Kilpatrick et al., 1996) und der EphA7 Rezeptor, der u.a. entscheidend für die Lobusbildung des Cerebellums während der Entwicklung ist (Rogers et al., 1999). Unter den Ephrinen gehört dazu das EphrinA5, das eine abstoßende Wirkung auf retinale Ganglienzellen hat und inhibierend auf das Axonwachstum wirkt (Drescher, 1997; Frisen et al., 1998), sowie das EphrinB1, das entscheidend an der Wanderung der Körnerzellen des Cerebellums beteiligt ist (Karam et al., 2000).

Das Protein Netrin-3 ist bekannt als Homolog des Netrin-1, ob es aber eine ähnlich wichtige Rolle für die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalon spielt wie Netrin-1 ist noch nicht bekannt. Daher soll auch die Bedeutung dieses Proteins näher untersucht werden.

Als erster Schritt zur näheren Untersuchung der Bedeutung der Eph Rezeptoren, der Ephrine und des Netrin-3 wurde eine *in situ* Hybridisierung mit spezifischen RNA Sonden durchgeführt. Dadurch wird ein Einblick in das Expressionsmuster der jeweiligen RNA, aus der anschließend das entsprechende Protein translatiert wird,

erhalten. Aus dem Expressionsmuster ist somit erkennbar, wo das Protein exprimiert wird und seine Funktion ausübt.

### **3.1.1 Expressionsmuster der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden im embryonalen Gehirn der Wildtyp-Maus**

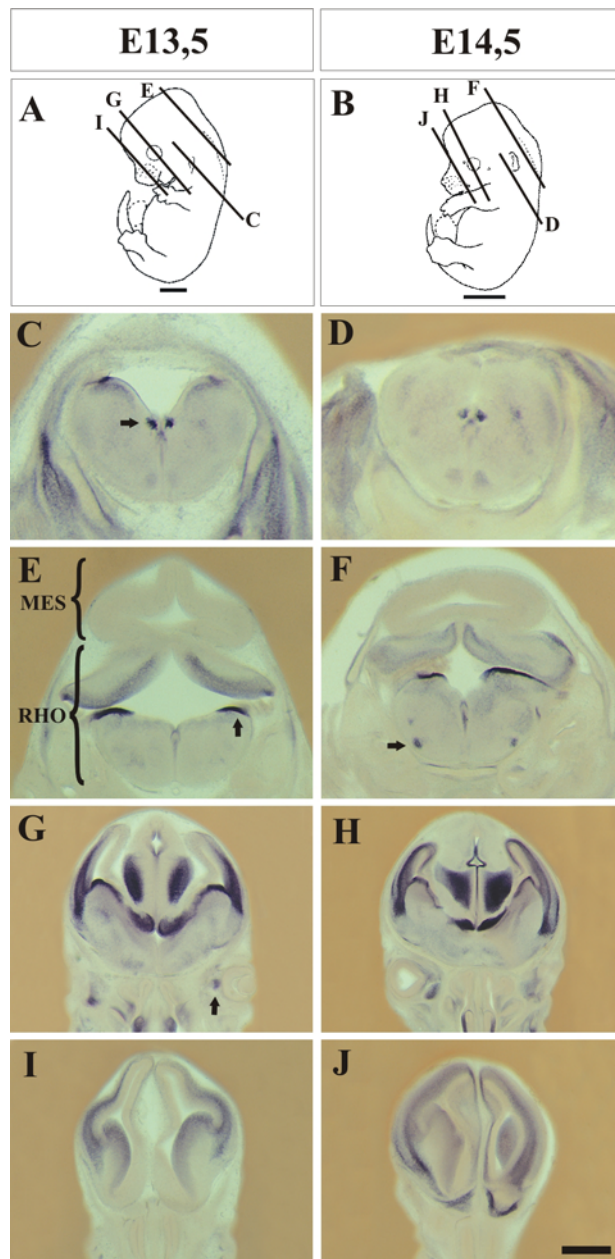
Zur Untersuchung des Expressionsmusters von EphA3, EphA7, EphrinA5 und EphrinB1 im Gehirn der Wildtyp-Maus wurden von coronalen Vibratomschnitten der Stadien E13,5 und E14,5 *in situ* Hybridisierungen mit RNA Sonden gegen diese RNA durchgeführt. Die Oligonukleotide 23 und 24 dienten zur Synthese der EphA3 cDNA aus embryonalem neuronalem Gewebe. Die Oligonukleotide 22 und 23 dienten zur Synthese der EphA7 cDNA, die Oligonukleotide 19 und 20 zur Synthese der EphrinA5 cDNA und die Oligonukleotide 17 und 18 zur Synthese der EphrinB1 cDNA. Die gewonnenen cDNAs wurden sequenziert und mit der mRNA der Datenbanknummern M68513 (EphA3), X81466 (EphA7), U90664 (EphrinA5) und BC006797 (EphrinB1) (NCBI) abgeglichen.

#### *Der EphA3 Rezeptor*

Die *in situ* Hybridisierungen gegen EphA3 Rezeptor RNA zeigen im embryonalen Stadium E13,5 und E14,5 eine Expression in der rhombischen Lippe sowie im Nucleus hypoglossus (Pfeil, Fig. 1C-F). Außerdem ist der EphA3 Rezeptor in E14,5 in der Region des späteren Nucleus reticularis lateralis exprimiert (Pfeil, Fig. 1F). Im Rhombencephalon findet sich in beiden Stadien zusätzlich eine Expression im cerebellaren Neuroepithel (Fig. 1E, F). Neben dieser Expression im Rhombencephalon ist außerdem eine Expression in den lateralen Bereichen des corticalen Neuroepithels (Fig. 1G- J), im ventralen hypothalamischen Neuroepithel, im Dach des dritten Ventrikels sowie im Nervus opticus (Pfeil, Fig. 1H) vorhanden. Im Neuroepithel des Bulbus olfactorius ist der EphA3 Rezeptor ebenfalls in beiden Stadien exprimiert (ohne Abb.).

Auf Grund dieses Expressionsmusters des EphA3 Rezeptors ist eine Funktion für die tangentialen Wanderungen im Rhombencephalon durchaus möglich. Besonders die Expression des Rezeptors im Bereich der rhombischen Lippe fällt zeitlich mit dem Beginn des pes und aes zusammen. Zusätzlich ist der Rezeptor in einem der späteren Zielgebiete der Zellen dieser Wanderungsströme exprimiert. Daneben deutet die

Expression des Rezeptors im Cerebellum auf eine Funktion für die Wanderung der späteren Körnerzellen hin.



**Fig. 1: *In situ* Hybridisierung gegen den EphA3 Rezeptor an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus**

Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E13,5 (A) und E14,5 (B) geben die Schnittebenen der 150µm dicken Vibratomschnitte an. Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von C und D, E und F, G und H, I und J wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Balken: 200µm in C und D; 400µm in E und F; 800µm in G und I; 1mm in A, H und J; 2mm in B.

MES: Mesencephalon

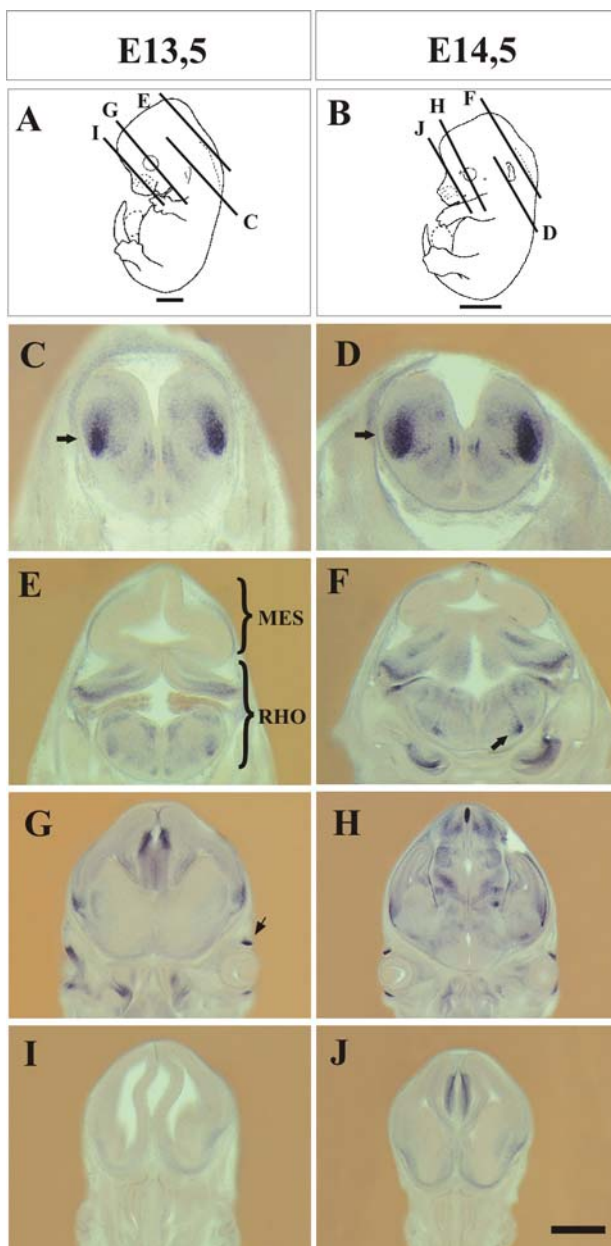
RHO: Rhombencephalon

*Der EphA7 Rezeptor*

Die *in situ* Hybridisierungen gegen EphA7 Rezeptor RNA zeigen im Rhombencephalon des Stadiums E13,5 und E14,5 eine Expression in den späteren Bereichen des Nucleus reticularis lateralis, im Nucleus hypoglossus und in der rhombischen Lippe (Pfeile, Fig. 2C-F). Im cerebellaren Neuroepithel ist der Rezeptor in beiden Stadien exprimiert (Fig. 2E, F). Außerdem findet sich eine Expression des EphA7 Rezeptors im Thalamus sowie eine schwache Expression im corticalen Neuroepithel (Fig. 2G-J) beider Stadien. Nicht

neuronal ist der Rezeptor in diesen Stadien an den Grenzen der Augenlider exprimiert (Pfeil, Fig. 2G, H).

Dieser Rezeptor ist somit, ähnlich wie der EphA3 Rezeptor, zu Beginn des pes und aes in der rhombischen Lippe und während dieser Wanderungen im Nucleus reticularis lateralis exprimiert. Daher ist eine Funktion dieses Rezeptors für diese Wanderungsströme möglich. Durch die Expression des Rezeptors im Cerebellum ist auch eine Funktion für die Wanderung der Zellen von der oberen rhombischen Lippe in das Stratum granulosum nicht auszuschließen.



**Fig. 2: *In situ* Hybridisierung gegen den EphA7 Rezeptor an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus**

Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E13,5 (A) und E14,5 (B) geben die Schnittebenen der 150µm dicken Vibratomschnitte an. Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von C und D, E und F, G und H, I und J wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Balken: 200µm in C und D; 400µm in E und F; 800µm in G und I; 1mm in A, H und J; 2mm in B.

MES: Mesencephalon

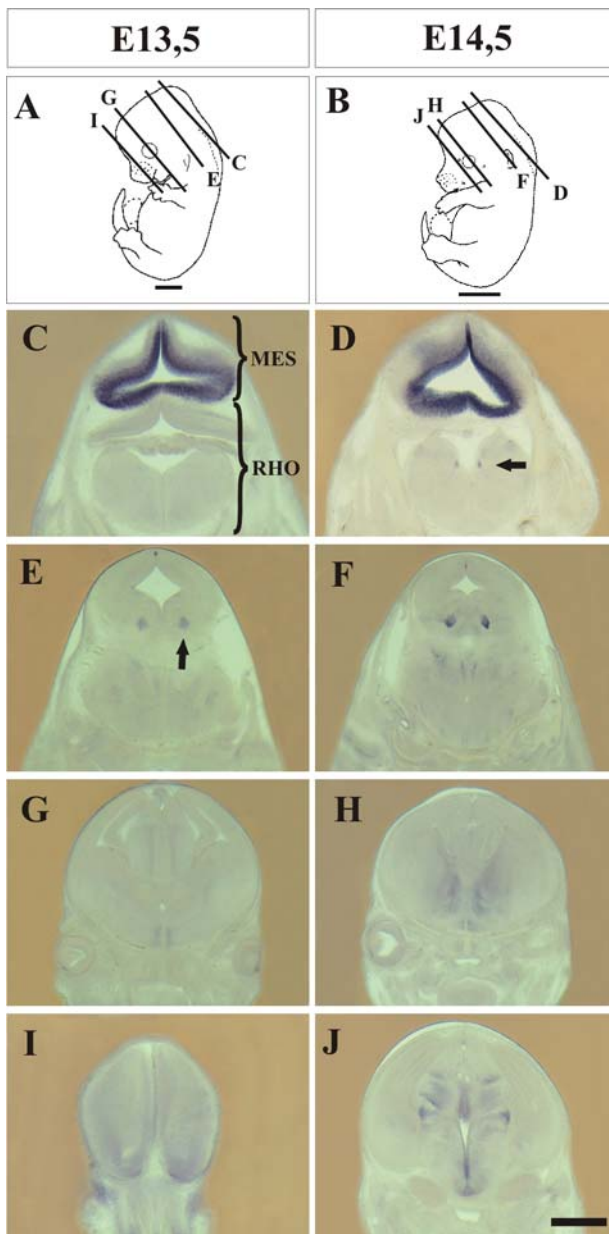
RHO: Rhombencephalon



### Der EphrinA5 Ligand

Die *in situ* Hybridisierungen gegen EphrinA5 RNA zeigen in den Stadien E13,5 und E14,5 im Rhombencephalon eine schwache Expression im Nucleus hypoglossus und im Pons (Pfeile, Fig. 3C, D, E, F). Daneben ist der Ligand noch im Neuroepithel des mesencephalen Colliculus superior (Fig. 3C, D), schwach im Diencephalon, corticalen Neuroepithel und im Mesencephalon exprimiert (Fig. 3G-J).

Ein Einfluß des EphrinA5 Liganden auf die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons ist nahezu ausgeschlossen, da weder eine Expression in der rhombischen Lippe, in den Zielgebieten der wandernden Zellen, noch in den umgebenden Gebieten der Wanderungen zu beobachten ist.



**Fig. 3: *In situ* Hybridisierung gegen den EphrinA5 Liganden an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus**

A und B: Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E13,5 (A) und E14,5 (B) geben die Schnittebenen der 150µm dicken Vibratomschnitte an. Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von C und D, E und F, G und H, I und J wurden an vergleichbarer Position gewählt.

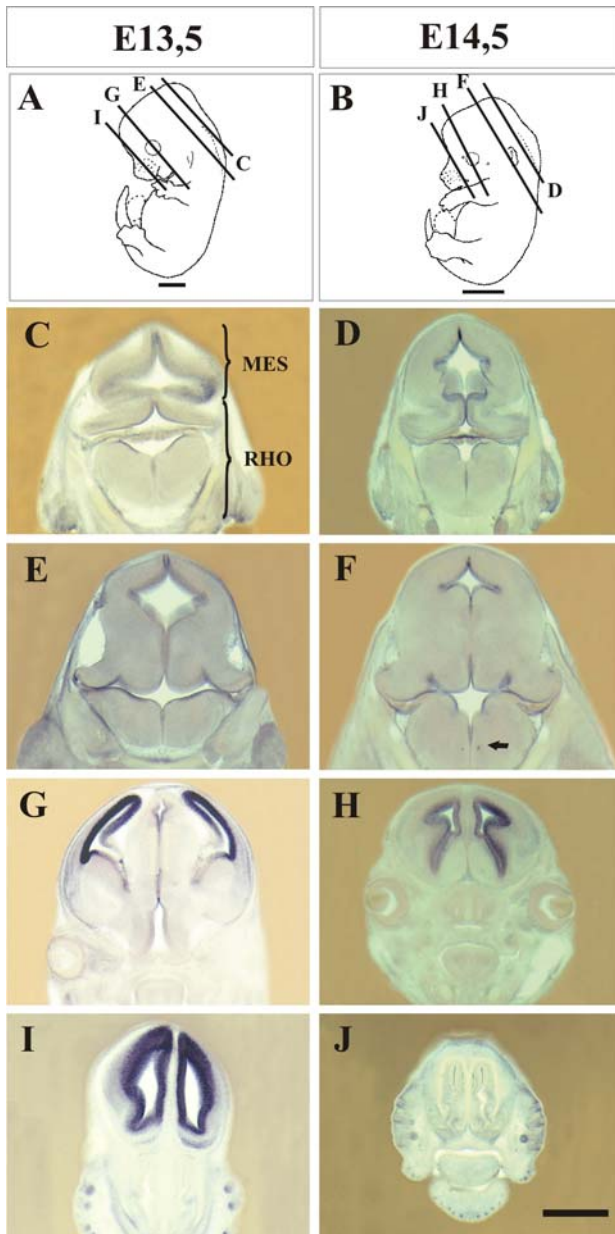
Balken: 400µm in C; 500µm in D; 800µm in E, G und I; 1mm in A, F, H und J; 2mm in B.

MES: Mesencephalon  
RHO: Rhombencephalon

*Der EphrinB1 Ligand*

Die *in situ* Hybridisierungen gegen EphrinB1 RNA zeigen in den Stadien E13,5 und E14,5 eine Expression in den gleichen Hirnbereichen. Im Rhombencephalon findet sich eine Expression in der rhombischen Lippe (Fig. 4C-F) und eine schwache Expression im Nucleus hypoglossus (Pfeil, Fig. 4F). Im cerebellaren Neuroepithel zeigt sich nur eine schwache Expression (Fig. 4C, D), dagegen ist die Expression im Neuroepithel des mesencephalen Colliculus superior stärker (Fig. 4C-F). Außerdem ist eine starke Expression im corticalen Neuroepithel (Fig. 4G-J) erkennbar.

Dieser Ligand ist somit zu Beginn der Wanderungen des Rhombencephalons in der rhombische Lippe exprimiert und könnte, ähnlich wie die Rezeptoren EphA3 und EphA7, entscheidend für den Start des pes und aes sein. Durch die Expression des Liganden im cerebellaren Neuroepithel ist außerdem eine Funktion für die Wanderung der Zellen von der unteren rhombischen Lippe in das Stratum granulosum möglich.



**Fig. 4: *In situ* Hybridisierung gegen den EphrinB1 Liganden an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus**

Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E13,5 (A) und E14,5 (B) geben die Schnittebenen der 150 $\mu$ m dicken Vibratomschnitte an. Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von C und D, E und F, G und H, I und J wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Balken: 400 $\mu$ m in C; 500 $\mu$ m in D; 800 $\mu$ m in E, G und I; 1mm in A, F, H und J; 2mm in B.

MES: Mesencephalon

RHO: Rhombencephalon

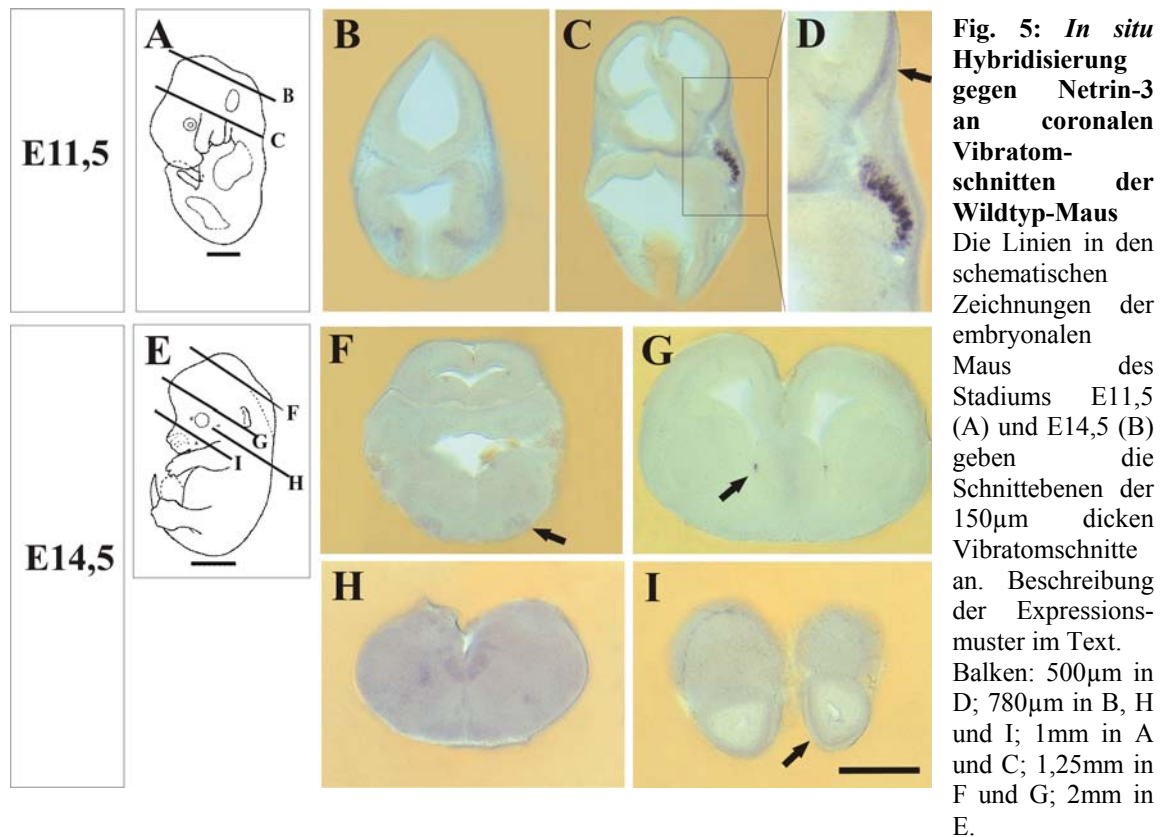
### 3.1.2 Expressionsmuster von Netrin-3 im embryonalen Gehirn der Maus

Zur Untersuchung des Expressionsmusters von Netrin-3 im Gehirn der Wildtyp-Maus wurden von coronalen Vibratomschnitten der Stadien E11,5 und E14,5 *in situ* Hybridisierungen mit einer RNA Sonde gegen Netrin-3 durchgeführt. Die Oligonukleotide 25 und 26 (siehe Material und Methode, 2.1.2) dienten zur Synthese der Netrin-3 cDNA aus embryonalem neuronalen Gewebe. Die gewonnene cDNA wurde sequenziert und mit der mRNA der Datenbanknummer NM\_010947 (NCBI) abgeglichen.

Die *in situ* Hybridisierungen gegen Netrin-3 RNA zeigen zum Zeitpunkt E11,5 eine Expression hauptsächlich in den Spinalganglien (Fig. 5C,D). Weiterhin ist in E11,5 eine schwache Expression im nicht neuronalen Gewebe zu beobachten (Pfeil, Fig. 5D). Im

Stadium E14,5 zeigt sich eine schwache Expression von Netrin-3 in der Oliva superior (Pfeil, Fig. 5F), in punktierten Bereichen des telencephalen Neuroepithels (Pfeil, Fig. 5G) sowie im Neuroepithel des Bulbus olfactorius (Pfeil, Fig. 5I).

In den für die Wanderungen des Rhombencephalons entscheidenden Bereichen ist Netrin-3 nicht exprimiert, daher ist eine Funktion des Liganden für diese Wanderungen nahezu ausgeschlossen.



Die Ergebnisse dieser Expressionsstudie deuten auf einen Einfluß von EphA3, EphA7 und EphrinB1 für die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons der Maus. Das Expressionsmuster von EphrinA5 und Netrin-3 dagegen gibt nur wenige Hinweise auf einen möglichen Einfluß für diese Wanderungen. Auf Grund dieser Befunde scheinen weiterführende Untersuchungen der Funktion von EphA3, EphA7 und EphrinB1 für die Wanderungen des Rhombencephalons sinnvoll.

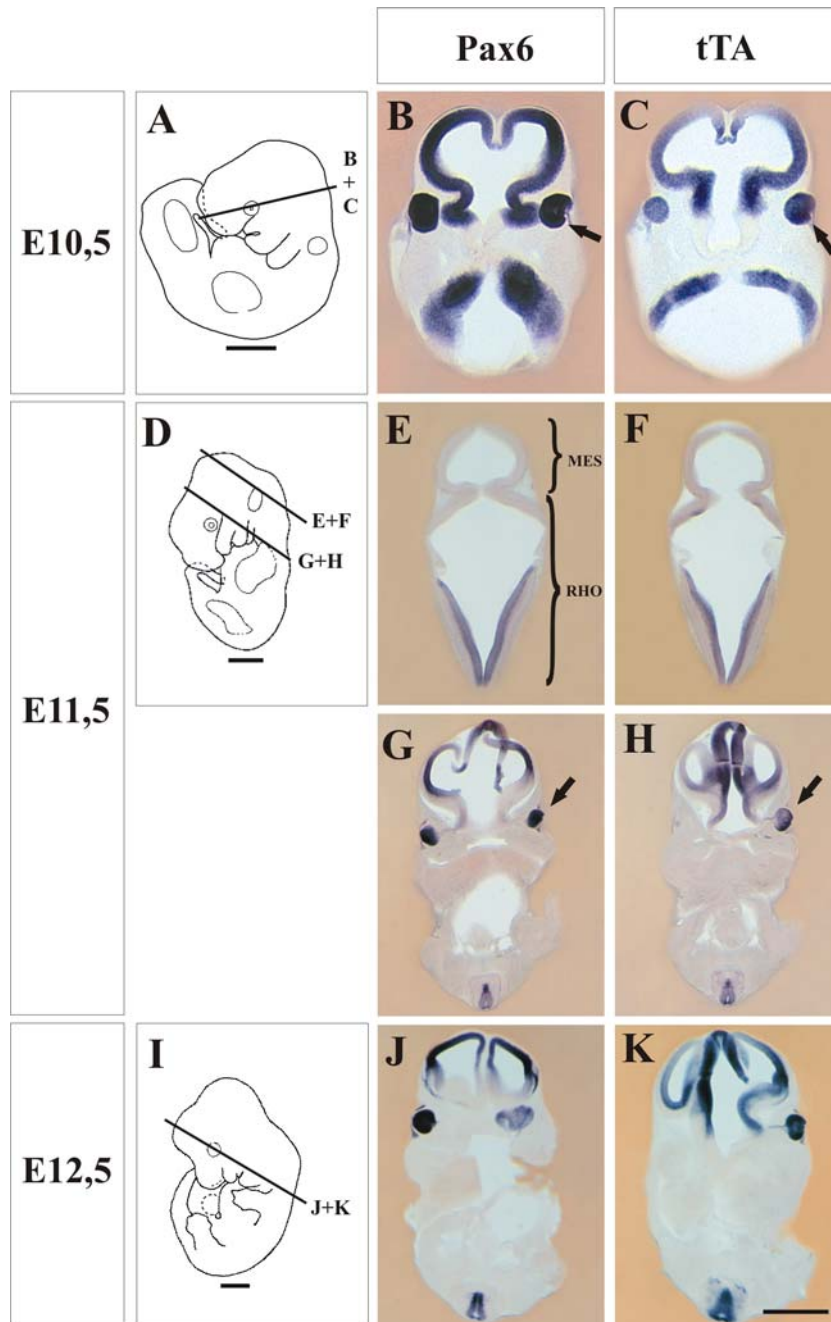
Aus zeitlichen Gründen wurden die Untersuchungen an EphA3, EphA7 und EphrinB1 in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

### 3.2 Prinzip der YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Mäuselinie

In der YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Mäuselinie wurde das YAC 593 zusammen mit dem tTA stabil in das Mausgenom transfektiert. Das YAC 593 enthält dabei in der Mitte die menschliche genomische Pax6 Region. Diese Region dient als gewebsspezifischer Promoter für das anschließende tTA-Konstrukt, das wiederum zusammen mit dem YAC 593 ins Mausgenom transfektiert wurde. Die Expression des tTA wird durch den humanen Pax6-Promoter gesteuert und kann daher nur in Zellen stattfinden, die Pax6 exprimieren. Mit dieser transgenen Mäuselinie ist die visuelle Darstellung der Pax6 positiven Wanderungsströme durch die Expression eines Reporter-DNA-Konstrukts, das Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) beinhaltet, möglich.

#### 3.2.1 Expressionsanalyse der YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Mäuselinie

K. Benzing konnte in seiner Doktorarbeit bereits die Funktionsfähigkeit der von ihm erstellten transgenen Mäuselinie YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA belegen. Es stellt sich aber die Frage, ob tTA und Pax6 in der transgenen Mäuselinie ein vollkommen übereinstimmendes Expressionsmuster aufweisen, da dies in verschiedenen transgenen Mäusen nicht immer gegeben ist. Um die Expression von tTA und Pax6 in der transgenen Mäuselinie vergleichen zu können, wurden *in situ* Hybridisierungen von heterozygoten YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA-transgenen Mäusen mit Pax6 und tTA spezifischen RNA Sonden durchgeführt. Die *in situ* Hybridisierungen wurden an coronalen Vibratomschnitten von Embryonen der Stadien E10,5; 11,5; 12,5 sowie von Gehirnen der Stadien E16,5 und 18,5 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser *in situ* Hybridisierungen zeigen grundsätzlich das gleiche Expressionsmuster von Pax6 und tTA in YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA-transgenen Mäusen. So konnte die RNA von Pax6 und tTA im Neuroepithel des dorsalen und ventralen Telencephalons, im Neuroepithel des anterioren und ventralen Thalamus sowie in den Augen von Embryonen des Stadiums E10,5 nachgewiesen werden (Fig. 6B, C). Im Stadium E11,5 zeigt sich eine Expression im Neuroepithel des anterioren und posterioren Pons, dem Neuroepithel der Medulla sowie der Medulla spinalis (Fig. 6E, F). Während des gleichen Stadiums sind Pax6 und tTA, wie im Stadium E10,5, in der Medulla spinalis und im Neuroepithel des dorsalen Telencephalons exprimiert. Außerdem ist die RNA von Pax6 und tTA im Neuroepithel des anterioren Thalamus nachweisbar (Fig. 6G, H). In E12,5 entspricht das Expressionsmuster dem des Stadiums E11,5 (Fig. 6J, K).

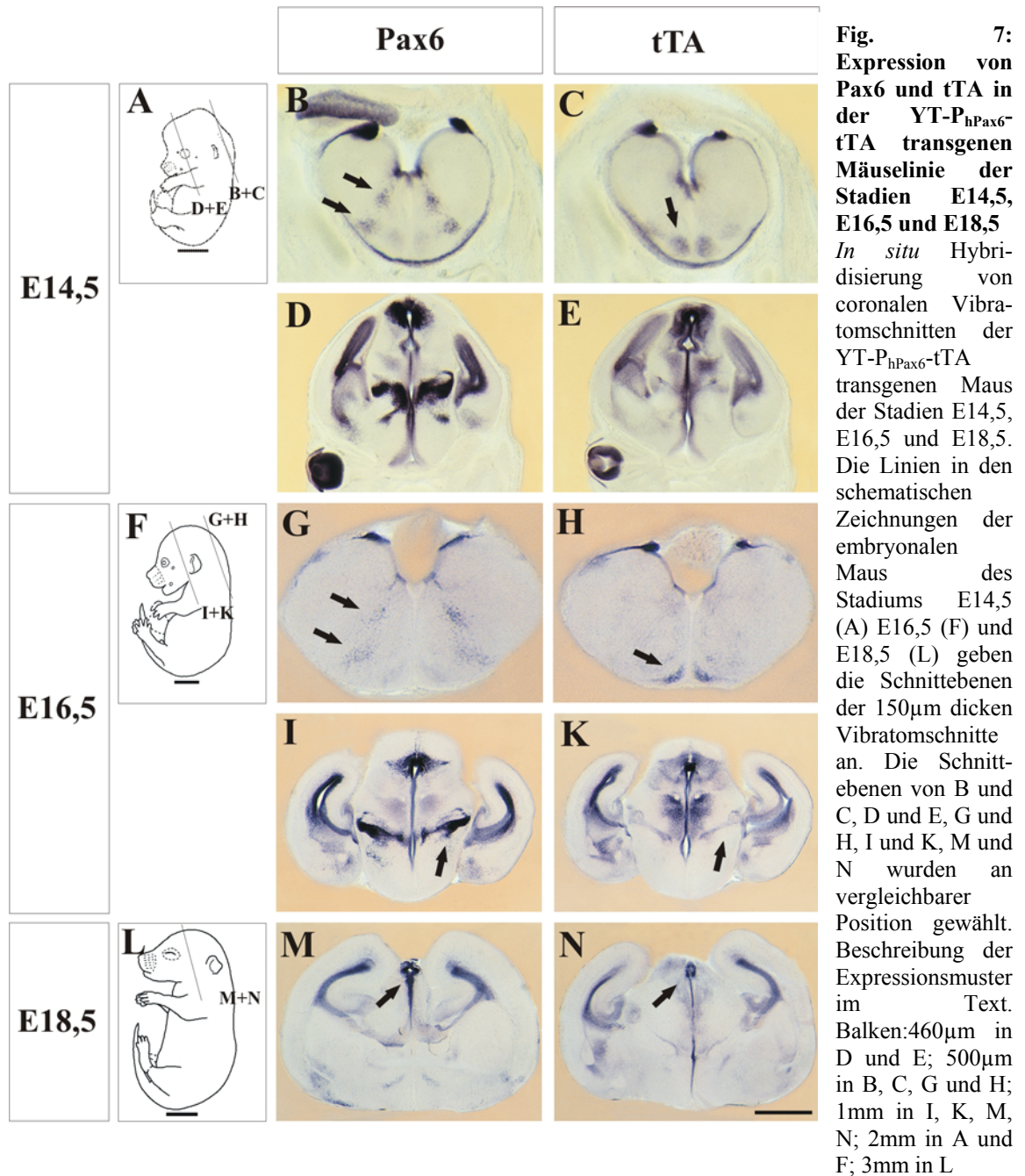


**Fig. 6: Expression von Pax6 und tTA in der YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Mäuselinie der Stadien E10,5-12,5**  
*In situ* Hybridisierung von coronalen Vibratomschnitten der YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Maus der Stadien E10,5, E11,5 und E12,5. Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E10,5 (A), E11,5 (D) und E12,5 (I) geben die Schnittebenen der 150µm dicken Vibratomschnitte an. Die Schnittebenen von B und C, E und F, G und H, J und K wurden an vergleichbarer Position gewählt. Beschreibung der Expressionsmuster im Text.  
 Balken: 500µm in B, C; 1mm in A, D-K  
 MES: Mesencephalon  
 RHO: Rhombencephalon

Im embryonalen Stadium E14,5 ist die RNA von Pax6 und tTA in der rhombischen Lippe, in den Zellen des pes sowie dem medullären Neuroepithel des Rhombencephalons exprimiert (Fig. 7B, C). Zusätzlich ist Pax6 in zwei Zellgruppen des Marks exprimiert. (Pfeile, Fig. 7B). tTA ist in diesen Zellen nicht exprimiert, dafür aber in der Oliva inferior, in der Pax6 nicht oder nur schwach exprimiert ist (Pfeile, Fig. 7C). Weiter rostral sind Pax6 und tTA im epithalamischen und corticalen Neuroepithel, ventralen Thalamus und im Auge exprimiert. Im embryonalen Stadium E16,5 ist die RNA von Pax6 und tTA im Rhombencephalon in gleichen Bereichen wie in E14,5 exprimiert (Pfeile, Fig. 7B, C, G, H), damit zeigt sich auch hier ein Unterschied im

Expressionsmuster von Pax6 und tTA in den zwei Zellgruppen des Marks und der Oliva inferior. Weiterhin sind Pax6 und tTA in E16,5 im cingulären, hippocampalen, neocorticalen, striären, amygdaloiden, subiculären sowie im anterioren und ventralen thalamischen Neuroepithel exprimiert (Fig. 7I, K). In E18,5 entspricht das Expressionsmuster dem des Stadiums E16,5 (Fig. 7M, N). Weiterhin sind Pax6 und tTA in den genannten Bereichen nicht nur in den Neuroepithelien sondern auch in den differenzierenden Neuronen exprimiert. Das Expressionsmuster von Pax6 und tTA unterscheidet sich somit ausschließlich im Rhombencephalon in zwei Zellgruppen räumlich voneinander. Daneben scheint es noch zeitliche Unterschiede im Expressionsmuster zu geben, sowie Unterschiede in der Expressionsstärke, da tTA in den Augen (Pfeile, Fig 6B, C, G, H), im ventralen Thalamus (Pfeile, Fig. 7I, K) sowie im Neuroepithel des Epithalamus (Pfeile, Fig.X 7M, N) schwächer exprimiert ist als Pax6.





Als Kontrollexperiment wurde eine *in situ* Hybridisierung gegen tTA an Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Dabei zeigt sich in keinem embryonalen Stadium eine Färbung (ohne Abb.).

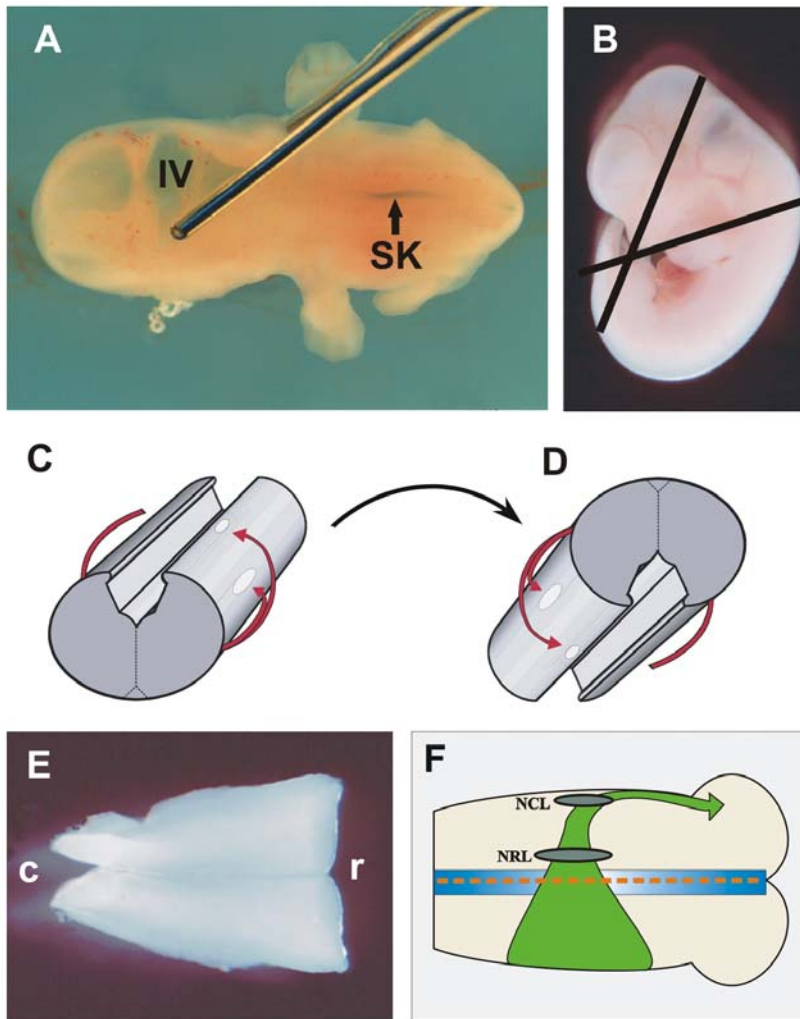
Somit zeigen tTA und Pax6 eine weitgehend übereinstimmende Expression während der Embryonalentwicklung. Ausschließlich im Rhombencephalon finden sich Unterschiede im Expressionsmuster von Pax6 und tTA. Geringe Unterschiede ergeben sich zusätzlich in der Stärke und dem zeitlichen Erscheinen der Expression. Eine schwächere Färbung könnte methodische Gründe haben, da jede *in situ* Sonde unterschiedlich gut an der Ziel-RNA anhaftet. Zusätzlich ist die Färbeintensität von der Färbedauer abhängig. Eine schwächere Färbung der beiden Proben ist damit nicht mit einer unterschiedlich starken



Expression der beiden RNAs gleichzusetzen. Eine verspätete Expression des tTA gegenüber dem Pax6 deutet auf eine unterschiedliche Transkriptionsrate der beiden RNAs hin. Da sie beide über ähnliche, aber nicht gleiche Promotoren, humanes Pax6 und murines Pax6, abgelesen werden, ist eine unterschiedliche Transkriptionsrate möglich. Der Unterschied in diesen beiden Promotoren könnte auf zeitlichen Entwicklungsunterschieden von Mensch und Maus beruhen, so daß es durch die Verwendung des humanen Promotors zu einer langsameren Expression des tTA kommt.

### **3.2.2 Schematische Darstellung des pes in Kultur**

Um die Zellen des pes sichtbar zu machen wurde die rhombische Lippe von YT-P<sub>hPax6</sub>-tTA transgenen Embryonen an E12,5 mit einem GFP beinhaltenden Transreporter Konstrukt elektroporiert und anschließend auf einer Membran mit der ventrikulären Seite nach unten kultiviert (Fig. 8A-E). Dadurch kann der pes mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beobachtet werden. Die Zellen beginnen ihre Wanderung an E13 von ihrem Entstehungsort, der rhombischen Lippe, und wandern über die piale Oberfläche des Hinterhirns zur Bodenplatte. Anschließend kreuzen die Zellen die Mittellinie und lassen sich an E16 kontralateral im Nucleus reticularis lateralis (NRL) und Nucleus cuneatus lateralis (NCL) nieder (Schematische Darstellung in Fig. 8F; Altman & Bayer, 1987x).



**Fig. 8: Elektroporation und Präparation des Rhombencephalons**

A: In den Spinalkanal (SK) wurde DNA, angefärbt mit Methyl-Echtgrün injiziert, bis der vierte Ventrikel (IV) gefüllt war. Die Anode der Elektrode wurde für die Elektroporation an der dorsalen Spitze der rhombischen Lippe und die Kathode auf der dorsalen Seite des Embryos platziert.

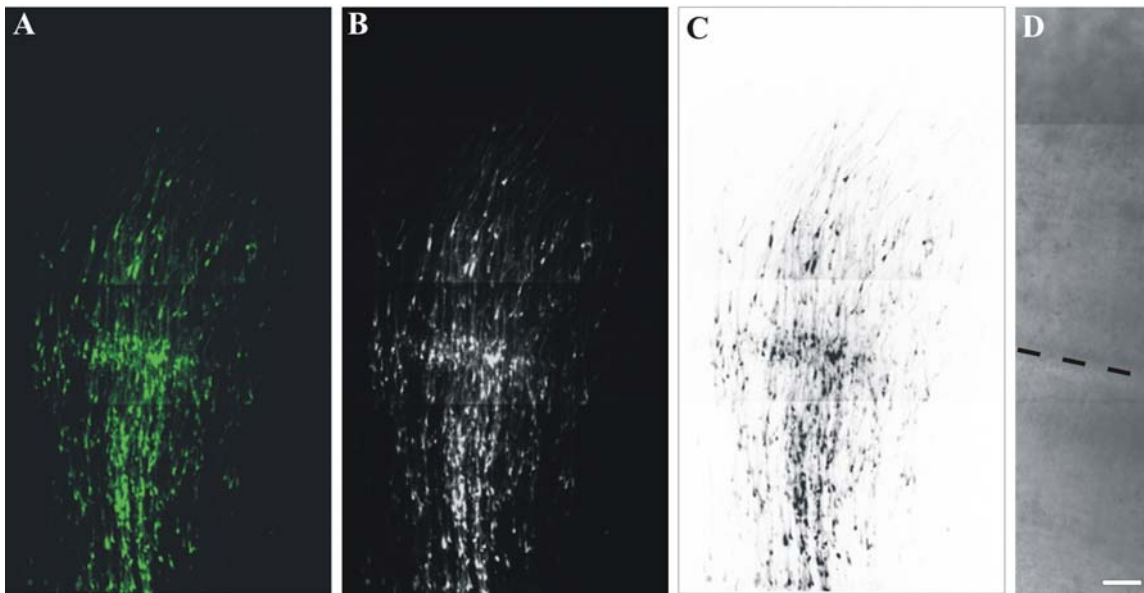
B: Für die Präparation des Stammhirns wurde mit einem Skalpell ein Schnitt durch das Mittelhirn und das Auge gesetzt, ein weiterer rostral der vorderen Extremitäten (Linien). Anschließend wurde die Dachplatte geöffnet und das Stammhirn herauspräpariert.

C-E: Für die Kultivierung wurden die Stammhirne mit der ventrikulären Seite nach unten auf einer Membran in DMEM/F12 Medium kultiviert.

F: Schematische Darstellung des pes. Die Zellen starten ihre Wanderung von der rhombischen Lippe, wandern über die Bodenplatte (blau) und lassen sich kontralateral im Nucleus reticularis lateralis (NRL) und Nucleus cuneatus lateralis (NCL) nieder. Die Axone der wandernden Zellen ziehen als Moosfasern ins Cerebellum.

In allen gezeigten Darstellungen des pes wurde nur die rechte rhombische Lippe elektroporiert, und nur die Zellen dieser wurden mikroskopisch sichtbar. Dies diente der Vereinfachung und besseren Darstellung, da eine getrennte Darstellung der zwei Wanderungsströme, von der linken und rechten rhombischen Lippe, nicht mehr möglich ist, sobald die Zellen die Bodenplatte gekreuzt haben. Die Darstellungen des Wanderungsstroms wurden weiterhin so dargestellt, daß die rechte rhombische Lippe, von der die markierten Zellen ihre Wanderung beginnen, am unteren Bildrand zu liegen kommt.

Wegen der stärkeren Kontrastierung von Schwarz-Weiß-Aufnahmen wurden die Wanderungen in dieser Arbeit immer Schwarz-Weiß dargestellt und anschließend invertiert (Fig. 9C).



**Fig. 9: Darstellungen des pes**

Die Abbildungen zeigen alle auf verschiedene Weise, den pes nach 48 Stunden in Kultur.

A: Fluoreszenzaufnahme. B: Schwarz-Weiß-Aufnahme. C Invertierte Darstellung von B. D: Durchlichtaufnahme, die gestrichelte Linie gibt die Lage der Mittellinie des Stammhirns an.

Balken: 100 $\mu$ m

### 3.2.3 Vergleich des pes *in vivo* und *in vitro*

Bei einer Betrachtung der Wanderung von ihrem Beginn bis zum Erreichen der Zielkerne fällt auf, daß die Zellen langsamer wandern als *in vivo*. Sie erreichen ihre Zielgebiete *in vitro* ca. zwei Tage später als *in vivo*. Diese Verlangsamung der Wanderung kann verschiedene Gründe haben: Während der Elektroporation und Präparation wurden die Stammhirne in einem Puffer gehalten und anschließend in Medium kultiviert. Durch die Zeit im Puffer könnte die Wanderung bereits in ihrem Beginn verzögert worden sein. Anschließend wurden die Kulturen für mehrere Tage in DMEM/F12 Medium kultiviert. Auf Grund seiner Inhaltsstoffe spiegelt das Medium die *in vivo* Situation wieder. Jedoch ist diese Simulation des *in vivo* Zustandes sicherlich nicht absolut, so daß auch hier ein Grund in der verspäteten Wanderung liegen kann. Außerdem ist die Nährstoffversorgung auf dem Filter geringer als *in vivo*, da die Kultur nur von der ventrikulären Seite mit Medium benetzt ist. Insgesamt spiegelt der Ablauf der Wanderung die *in vivo* Situation wieder.