

Molekulare Analysen zur Kortexentwicklung der Maus

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover,
zur Erlangung des Grades Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochemikerin Judit Oldekamp

geboren am 11.10.1974 in Nordhorn

2004

Referent:

Prof. Walter Müller,
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent:

Prof. Gregor Eichele,
Max Planck Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover

Tag der Promotion:

10. Mai 2004

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
ABSTRACT	2
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Die Entwicklung des Nervensystem	3
1.2 Entwicklung des Neokortex	4
1.2.1 Arealisierung	4
1.2.1.1 Pax6 and Emx2 im kortikalen Primordium	6
1.2.2 Entstehung der Schichten im Neokortex	7
1.2.2.1 Zellzyklus und Proliferation	9
1.2.3 Zellmigration.....	10
1.2.3.1 Radiale und tangentielle Migration	11
1.3 Molekulare Grundlagen der neuronalen Migration.....	12
1.3.1 Funktionelle Studien von Lis1 und Doublecortin	13
1.3.1.1 Neurabin II.....	16
1.3.1.2 RanBPM	16
1.3.2 Weitere Moleküle die bei der neuronalen Migration eine Rolle spielen.....	17
1.3.3 Die Rolle von Pax6 in der kortikalen Entwicklung.....	19
1.4 Entwicklung des Hippokampus im Archikortex	21
1.4.1 Emx2 in der Gyrus Dentatus Entwicklung.....	23
1.4.2 Rolle der bHLH-Transkriptionsfaktoren	25
2 MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 Behandlung und Haltung der Versuchstiere.....	28
2.2 Genotypisierung.....	28
2.3 GST Pull Down	30
2.3.1 Herstellung des Glutathion-Agarose-Konstrukts	30
2.3.1 Transkription und Translation	31
2.4 Yeast two Hybrid-Assay	32
2.4.1 Herstellung von kompetenten Hefezellen	32
2.4.2 Herstellung der Platten aus Minimalmedium.....	32
2.4.3 Transformation der Vektoren in die Hefezellen.....	33
2.5 Zellbiologie	33
2.5.1 Zellen passagieren und zählen.....	33
2.5.2 Transfektion und Kotransfektion	34
2.5.3 Ernten der Zellen.....	35
2.5.4 Fixieren von Zellen	36

2.6	Immunopräzipitation	36
2.6.1	SDS-PAGE.....	37
2.6.2	Western Blot.....	37
2.6.3	Immunoblotting.....	38
2.7	Immunofluoreszenz	38
2.8	Klonierungen.....	39
2.8.1	Restriktionsverdau.....	40
2.8.2	Agarosegelelektrophorese	41
2.8.3	Gelextraktion.....	41
2.8.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung	41
2.8.5	Ligationskalkulation.....	41
2.8.6	Ligation	42
2.8.7	Transformation.....	42
2.8.8	DNA-Minipräparation.....	43
2.8.9	Analytischer Restriktionsverdau	43
2.8.10	Sequenzierung.....	43
2.8.11	Endotoxinfreie Maxipräparation.....	44
2.9	Sondenherstellung	44
2.9.1	RNA-Isolierung.....	44
2.9.2	Reverse Transkription	45
2.9.3	Primer Design.....	45
2.9.4	PCR I.....	46
2.9.5	PCR II (<i>Large Scale PCR</i>)	46
2.9.6	RNA-Transkription	47
2.10	Kryo-Schnitte.....	48
2.11	<i>In Situ</i> Hybridisierungen.....	48
2.11.1	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	49
2.11.2	Posthybridisierung und Antikörperinkubation.....	49
2.11.3	Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation und Färbereaktion	50
2.12	Nissl-Färbung.....	50
3	ERGEBNISSE.....	51
3.1	Interaktion zwischen Neurabin II und Doublecortin	51
3.1.1	Immunofluoreszenz.....	51
3.1.2	<i>In Situ</i> -Hybridisierung.....	53
3.2	Interaktion zwischen RanBPM und Lis1	55
3.2.1	GST Pull Down	55
3.2.2	Hefe-Zwei-Hybrid-Assay (<i>Yeast Two Hybrid Assay, YTH</i>).....	56
3.2.3	Immunopräzipitation	57
3.3	Emx2-Projekt.....	58
3.3.1	Emx2-Expression im Gyrus Dentatus	59
3.3.2	Migrationen von proliferierenden Zellen und Neuronen sind unterschiedlich gestört....	61
3.3.3	Der mutante Gyrus Dentatus exprimiert das proneurale Gen Mash1 nicht.....	63
3.3.4	Notch1 und Delta1 sind in der Emx2-Mutante auf die ventrikuläre Schicht begrenzt....	64
3.3.5	Id3, Hes5 und Ngn2 sind in der Emx2-Mutante auf die ventrikuläre Schicht begrenzt..	66
3.3.6	Die Expression von Tenascin C und GFAP ist in der Mutante begrenzt	69
3.3.7	Körnerzellen brechen ihre Migration ab und akkumulieren in der Migrationsstraße	71

3.3.8	Die hippocampale Fissur fehlt im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante	73
3.3.9	Alp, Pcp4 und Smad1 fehlen im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante	75
3.4	Pax6-Projekt.....	77
3.4.1	Die Expression einiger Kandidaten ist in der germinalen Schicht verändert	78
3.4.2	Die Expression ist in der intermediären Schicht der Pax6-Mutante hochreguliert	81
3.4.3	Die Expression ist in der Subplatte der Pax6-Mutante verschwunden.....	81
3.4.4	Die Expression ist in der kortikalen Platte der Pax6-Mutante verändert	82
3.4.5	Die Expression nicht einzuordnender Kandidaten	84
4	DISKUSSION	86
4.1	Neurabin II als Interaktionspartner von DCX	86
4.2	RanBPM als möglicher Interaktionspartner von Lis1	88
4.3	Pax6 in der neuronalen Migration des Neokortex.....	89
4.4	Emx2 in der Entwicklung des Gyrus Dentatus.....	93
4.4.1	Expression von Markern, die Vorläuferzellen markieren	93
4.4.2	Funktion von Emx2 im Telenzephalon und im Gyrus Dentatus	94
4.4.3	Drastische Reduktion der sekundären Matrix in der Emx2-Mutante	94
4.4.4	Das gliale Gerüst im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante.....	95
4.4.5	Körnerzellen der Emx2-Mutante sind stark reduziert und nicht ausdifferenziert	96
4.4.6	Die hippocampale Fissur ist im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante nicht vorhanden...	96
4.4.7	Alp, Pcp4 und Smad1 fehlen im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante	97
5	LITERATUR	100
6	ANHANG	115
6.1	Tabelle	115
6.2	Abkürzungen.....	124
	Erklärung an Eides statt	127
	Danksagung.....	128
	Veröffentlichungen	129
	Lebenslauf	130

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Wege beschrrieben, um die Entwicklung des zerebralen Kortex der Maus zu untersuchen. Im Mittelpunkt des Interesses standen die neuronale Migration des Neokortex und die Formation der Körnerzellschicht im Hippokampus. Der Neokortex zeichnet sich vor allem durch seine „inside-out“ Schichtenbildung aus, während die Formation des Hippokampus bzw. des Gyrus Dentatus durch die Ausbildung ektopischer Proliferationsschichten charakterisiert ist.

Ein konventioneller Ansatz der Analyse der Entwicklung des Neokortex bestand in der Untersuchung von Proteinen, die mutiert zur humanen Krankheit Lissenzephalie führen (Lis1 und Doublecortin). Es wurden Protein-Protein-Interaktionstests mit Kandidaten aus *Yeast-Two-Hybrid-Screens* durchgeführt. Dabei konnte eine Interaktion zwischen Doublecortin und dem actinbindenden Protein Neurabin II nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, dass zwischen Lis1 und dem Kandidaten RanBPM keine Interaktion vorliegt.

Ein zweiter Ansatz zur Untersuchung der Entwicklung des Neokortex wurde durch Charakterisierung der Pax6-defizienten Maus (*small eye*) verfolgt. Er sollte zur Aufklärung der von dem Transkriptionsfaktor Pax6 im Neokortex kontrollierten Signalkaskaden beitragen. Aus einer Datensammlung von über 1000 Genen der Expressionsdatenbank *genepaint.org* wurden schichtspezifisch exprimierte Kandidaten definiert und mit Hilfe des in unserem Institut entwickelten *High-Throughput In Situ*-Hybridisierungsroboters auf Gewebeschnitten (E15.5) der mutanten Pax6-Maus getestet. So wurden über 100 Gene gefunden, die im Vergleich zum Wildtyp im Neokortex verändert exprimiert sind. Die histologischen Ergebnisse zeigen eine veränderte germinale Schicht, das Fehlen der Subplatte und eine kondensierte kortikale Platte. Es ergibt sich ein erstes Bild über mögliche Einflüsse von Pax6 auf so vielfältige Vorgänge wie z.B. Adhäsion, Zellzyklus und Proliferation, die anhand der veränderten Gene noch weiter charakterisiert werden müssen.

Die Entwicklung des Gyrus Dentatus im Hippokampus wurde mittels der Emx2-defizienten Maus analysiert. Dieser Maus fehlt die Körnerzellschicht und die tertiäre Matrix. Es stellte sich die Frage wie Emx2 die Formation der Körnerzellschicht kontrolliert. Mittels automatisierter *In Situ*-Hybridisierung (s.o) wurden Gene auf Gewebeschnitten verschiedenen Alters der Emx2-defizienten Maus getestet. Sie wurden u.a. aufgrund ihres veröffentlichten Expressionsschemas ausgesucht. Die Kandidaten Notch, Delta, die proneuralen Gene (bHLH) und Tenascin C werden in der Mutante exprimiert, die Zellen (neurale und gliale Vorläuferzellen), die diese Gene exprimieren sind aber nicht in der Lage die germinale Schicht zu verlassen und zu migrieren. Ein zweites Ergebnis zeigt, dass der Emx2-defiziente Gyrus Dentatus eine reduzierte Anzahl nicht ausdifferenzierter defekter Körnerzellen aufweist. Desweiteren wurde die komplette Abwesenheit des Astrozytennetzwerkes festgestellt, das im Wildtyp von Körnerzellen als Gitter für die Migration benutzt wird. Aufgrunddessen kann die Histogenese des Gyrus Dentatus nicht stattfinden. Ein weiteres histologisches Ergebnis zeigt, dass die hippokampale Fissur nicht ausgebildet wird.

Schlagwörter: zerebraler Kortex, neuronale Migration, Gyrus Dentatus

Abstract

For analyses of cerebral cortex development in mouse different approaches were used. The focus were on neuronal migration in the neocortex and the formation of the granule cell layer in the hippocampus. Important for neocortical development is the „inside-out“ layering, whereas the formation of the hippocampus is characterized through ectopic proliferative zones.

One approach for analysing neocortex development was the examination of proteins mutated in the human disease lissencephaly (Lis1 and Doublecortin). Protein-protein interaktion assays were performed with candidates isolated from a yeast two hybrid screen. An interaction was shown between Doublecortin and actin-binding protein Neurabin II. Furthermore it was shown that there is no interaction between Lis1 and RanBPM.

A second approach for analysing neocortex development was to characterize the Pax6-deficient mouse (small eye), to enlight signalling-cascades induced by transcriptionfactor Pax6 in the neocortex. Out of a data pool of more than 1000 genes from the expression-database *genepaint.org* layer-specific expressed candidates were choosen. They were tested on mutant and wildtype tissue-slides on our high troughput *in situ*-hybridisationrobot developed in our institue. More than 100 genes with different expression patterns at wild-type and mutant were found. Histological results show a modified germinal layer, a missing subplate and the a condensed cortical plate. The results show mainifold influences of Pax6 on processes like adhesion, cell cycle and proliferation. The single marker genes have to be analysed more intensively for further characterisation of the signalling cascade.

Development of dentate gyrus in the hippocampus was analysed by Emx2-deficient mice. The Emx2 mutant dentate does not have a granule cell layer and the tertiary matrix is missing. To reveal the influences of Emx2 on reglation of dentate granule cell formation high throughput *in situ*-hybridisation was used. Candidate genes were mainly choosen according to their published expression pattern and tested on mutant and wildtype tissue-slides. Although candidate genes Notch, Delta, proneural cascade genes and TenascinC are correctly expressed in the mutant, cells expressing these genes (neural and glial precursors) are not able to leave the germinal layer and to migrate. The second conclusion from this work is that Emx2-deficient dentate gyrus has a reduced number of defective, not correctly differentiated granule cells. Furthermore the astrocyte network that in wildtype is used by granule cells as a scaffold for migration was found to be complete absent and dentate histogenesis cannot take place. Another histological result show that Emx2-deficient dentate neither have a granule cell layer, nor a hippocampal fissure.

Keywords: cerebral cortex, neuronal migration, dentate gyrus

1 Einleitung

Der zerebrale Kortex ist eine der komplexesten Strukturen, die sich im Laufe der biologischen Evolution herausgebildet haben, und stellt z.B. die neurale Grundlage für menschliche mentale Leistungen dar. Kennzeichnend für den Kortex von Säugetieren ist eine laminare Struktur, die in anderen Vertebraten nicht zu finden ist. Der Kortex wird in funktionell unterschiedliche Regionen unterteilt, von denen jede eine charakteristische histologische Erscheinung hat, sowie durch spezifische Neuronenverbindungen gekennzeichnet ist. Von besonderem Interesse in dieser Arbeit sind die Entwicklungen des Neokortex und des Hippokampus.

Bei der Untersuchung dieser Regionen steht die Frage im Vordergrund, wie die Wirkung spezifischer regulatorischer Gene bzw. morphoregulatorischer Moleküle die komplexe Struktur des Kortex auszubilden vermögen.

1.1 Die Entwicklung des Nervensystem

Nach Befruchtung der Eizelle und Durchlaufen der Gastrulation besteht der Embryo aus drei Keimblättern. Während das Entoderm die inneren Organe, das Mesoderm Muskeln, Bindegewebe und Blutgefäße bildet, entwickelt sich aus dem äußersten Keimblatt, dem Ektoderm, die Epidermis und das Nervensystem. Durch Wechselwirkungen von Mesoderm und Ektoderm beginnt ab Embryonaltag 7.5 der Maus (E7.5) die neuronale Induktion, die zur Bildung von Neuroepithel führt (Gilbert, 1997). Nach der Faltung der Neuralplatte zum tubulären Neuralrohr entstehen am rostralen Ende drei Gehirnbläschen, die zunächst Anlagen von Vorder-, Mittel- und Hinterhirn (Pros-, Mes- und Rhombenzephalon) bilden (Abb.1.1).

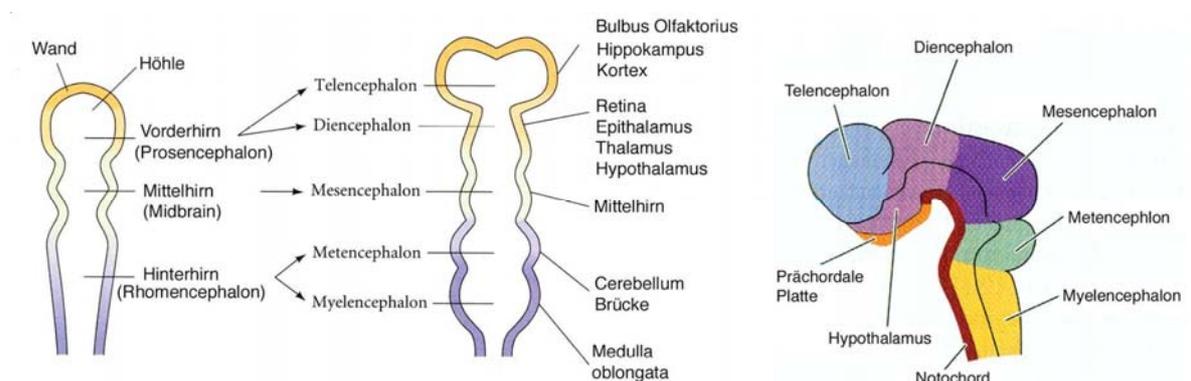


Abb. 1.1: Entwicklung der einzelnen Strukturen (verändert nach Gilbert et al., 1997, Rauber et al., 1987)

Mit fortschreitender Entwicklung bilden sich aus dem Prosenzephalon das Endhirn (Telencephalon) und das Zwischenhirn (Diencephalon). Im adultem Gehirn umfaßt das

Telenzephalon Riechhirn, Hippokampus und Neokortex sowie Thalamus und Hypothalamus. Aus dem anterioren Teil des Rhombenzephalons, dem Metenzephalon (Nachhirn), entwickeln sich Pons (Brücke) und Cerebellum (Kleinhirn). Das Myelenzephalon (Markhirn) bildet die Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark) (Rauber und Kopsch, 1987).

Neben der Kompartimentierung des Gehirns entwickeln sich aus mitotischen Vorläuferzellen eine Vielzahl von Nerven- und Gliazellen. Dies geschieht in ventrikulären Schichten. Durch die Migration neuraler Zellen zu ihrem Zielort und die darauf folgende Differenzierung bilden sich im Gehirn komplexe Strukturen und Verschaltungen.

1.2 Entwicklung des Neokortex

1.2.1 Arealisierung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung des Telenzephalons. Das embryonale Telenzephalon wird in einen dorsalen und einen ventralen Part unterteilt. Zum ventralen Telenzephalon gehören die Basalganglien, die Amygdala und die Substantia Innominata, während aus dem dorsalen Telenzephalon der zerebrale Kortex (Pallium) entsteht, der sich weiter unterteilen lässt in 1. Archikortex (mit Hippokampus) 2. Neokortex, 3. Paleokortex und 4. limbischer Kortex (Übersichtsartikel Schuurmans und Guillemot, 2002 und Abb.1.2).

Obwohl die telenzephalischen Unterregionen ursprünglich auf der Basis unterschiedlicher Morphologie und Verbindungen, sowie neurochemischer Profile entworfen wurden, unterscheiden sich die dorsale und ventrale Domäne des embryonalen Telenzephalons auch durch unterschiedlich Aktivierung von Markergenen. Diese Muster reflektieren den anfänglichen Erwerb regionaler Identität durch die Bevölkerung mit bestimmten Vorläuferzellen (Schuurmans und Guillemot, 2002). Diese Vorläuferzellen lassen im embryonalen Telenzephalon verschiedene neuronale und gliale Zellen entstehen, die durch Migrationen ihre Endposition im differenzierten zerebralen Kortex und in den Basalganglien erreichen (Price und Willshaw, 2000).

Der adulte Neokortex ist tangential in verschiedene Areale organisiert, die spezialisierte Funktionen, wie die Steuerung sensorischer Prozesse und motorische Kontrolle, ausüben (Abb.1.3). Diese Areale werden anhand ihrer Verbindungen und ihrer Architektur unterschieden. Die Spezifizierung und Differenzierung der neokortikalen Areale wird durch einen Wechsel zwischen extrinsischen und intrinsischen Mechanismen kontrolliert (Bishop et al., 2000).

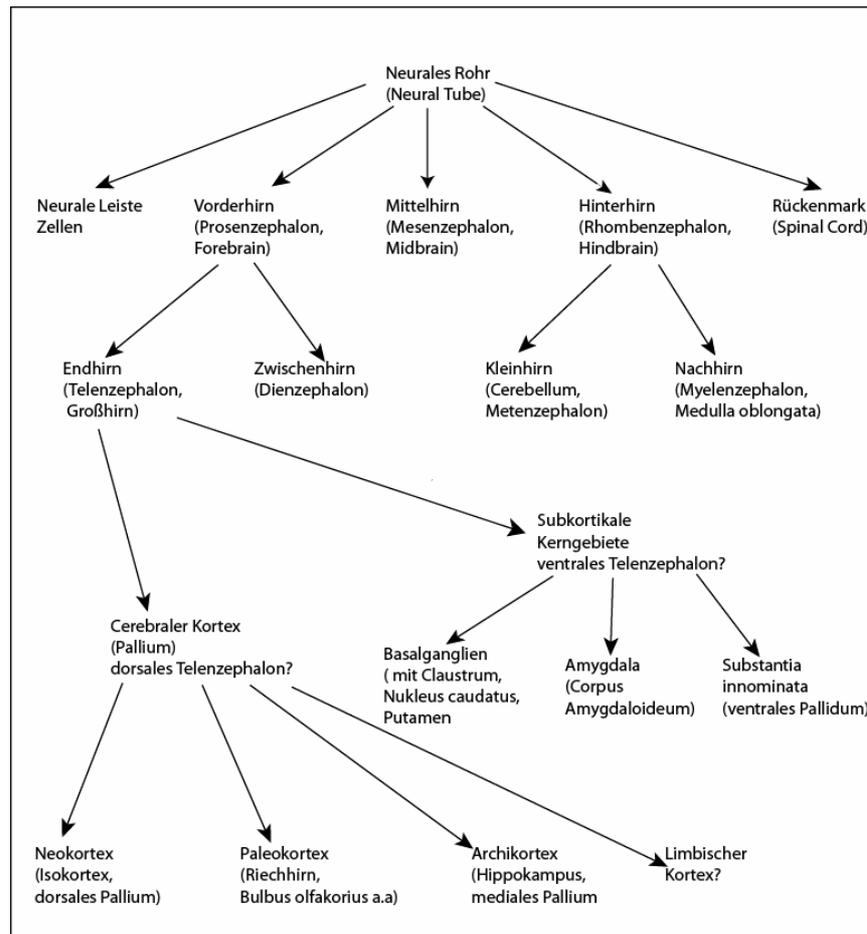


Abbildung 1.2: Die Differenzierung der Gehirnstrukturen in der Embryonalentwicklung (verändert nach Price und Willshaw, 2000)

Traditionell gab es zwei Hypothesen für den Mechanismus, der die Entwicklung der Arealidentität bestimmt. Die sogenannte die Protomap-Hypothese wurde 1988 von Rakic formuliert. Sie besagt, dass die genetische Basis der Neuronen verantwortlich ist für kortikale Verbindungen, weil kortikale Neuronen zum Zeitpunkt ihrer Geburt in der ventrikulären Schicht schon spezifiziert seien. Das frühe Neuroepithelium sei so programmiert, dass es in verschiedenen kortikalen Regionen spezifische Neuronen generiert, so dass die relative Position und Größe der kortikalen Areale schon festgelegt seien (Intrinsische Mechanismen).

Im Gegensatz zu dieser Hypothese unterstützt das Protokortex-Model von O'Leary (1989) die Rolle von extrinsischen Faktoren, die durch etablierte thalamokortikale Verbindungen auf die Arealisierung Einfluß nehmen. Die funktionalen Areale des Kortex seien noch nicht definiert, bevor sie die Fortsätze aus subkortikalen Regionen erreichen (O'Leary 1989).

Nach dem heutigen Forschungsstand wird der Prozess der Spezifizierung und Regionalisierung des Neokortex in zwei Phasen geteilt: 1. Ein früher Regionalisierungsschritt, der stattfindet bevor Axone des Thalamus den Kortex erreichen

und in dem Neurone ihre regionale Identität durch zellautonome Regulation ihrer Genexpression bestimmen. 2. Ein späterer Spezifizierungsschritt, der sich durch die Ankunft der thalamokortikalen Projektionen ereignet. Durch den Spezifizierungsschritt werden die vorgeformten kortikalen Areale durch extrinsische Faktoren und Mechanismen, einschließlich thalamokortikaler Einflüsse, aufrechterhalten (Monuki und Walsh, 2001; O'Leary und Nakagawa, 2002).

Die Gene, die die neokortikale Arealisierung kontrollieren, werden vermutlich in einem Gradienten im embryonalen Kortex reguliert (Chenn et al., 1997). Zwei Proteine, die diese Kriterien erfüllen, sind *Emx2* und *Pax6*. Beide Gene werden im Neuroepithelium des dorsalen Telenzephalons exprimiert. In dieser proliferativen Schicht entstehen kortikale Neurone (Gulisano et al., 1996; Walther und Gruss, 1991, Stoykova und Gruss, 1994). *Emx2* wird in einem Gradienten von niedrig-rostral bis hoch-caudal und von niedrig-lateral bis hoch-medial exprimiert (Gulisano et al., 1996), wohingegen *Pax6* in einem niedrigen caudalen bis hohen rostralen und niedrigen medialen bis hohen lateralen Gradienten exprimiert wird (Walther und Gruss, 1991, Stoykova und Gruss, 1994) (Abb. 1.3).

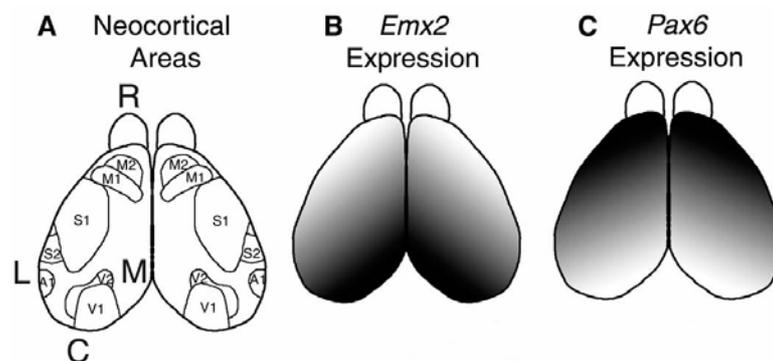


Abbildung 1.3: Neokortikale Areale und die Expression von *Emx2* und *Pax6*. Dorsale Ansicht der Oberfläche des Neokortex der Maus. A) Organisation des Neokortex der Maus. Gezeigt werden das auditorische Areal (A1), die motorischen Areale (M1, M2), die somatosensorischen Areale (S1, S2) und die visuellen Areale (V1, V2). M, medial; L, lateral; R, rostral; C, caudal. B) Expression von *Emx2* im Neokortex: Die Expression ist hoch im medialen und caudalen Neokortex und niedrig im lateralen und rostralen Neokortex. C) Expression von *Pax6* im Neokortex: Die Expression ist hoch im lateralen und rostralen Neokortex und niedrig im medialen und caudalen Neokortex (aus Bishop et al., 2000).

1.2.1.1 *Pax6* and *Emx2* im kortikalen Primordium

Die Transkriptionsfaktoren *Pax6* und *Emx2* werden in einem entgegengesetzten Gradienten entlang der A/P-Achse (anterio-posterior) des kortikalen Primordiums exprimiert (s. Abb. 1.3). In *Pax6*- und *Emx2*-defizienten Mäusen verschiebt sich das Expressionsmuster entlang der A/P-Achse. Diese Verschiebungen sind in den Mutanten komplementär und belegen eine Kooperation zwischen *Emx2* und *Pax6*, die die neokortikale Arealisierung kontrolliert (Bishop et al., 2002). In den Maus-Mutanten des jeweils anderen Gens

verändern sich die Expressionsmuster von Emx2 und Pax6 (Muzio et al., 2002b). Es gibt bisher keinen biochemischen Beweis für eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Zwischen den beiden Expressionsmustern gibt es zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung eine scharfe Grenze, und die Aktivierung der Gene wird nicht vom gleichen Signalmolekül kontrolliert (Muzio et al., 2002b).

Die Ähnlichkeit in der Verschiebung kortikaler Genexpression zwischen der Emx2-Mutante und Mäusen, bei denen Fgf8 überexprimiert ist (Bishop et al., 2002), legt nahe, dass Fgf8 den Expressionsgradienten von Emx2 im kortikalen Primordium kontrolliert. Beobachtungen in Mäusen und Hühnchen unterstützen diese Hypothese. Überexpression von Fgf8 reguliert die Emx2-Expression nach unten und fehlendes Fgf8 reguliert Emx2 nach oben (Grove, 2003; Ohkubo et al., 2002; Garel et al., 2003).

Trotz der Ähnlichkeit in der Verschiebung kortikaler Genexpression zwischen Pax6-Mutanten und Mäusen mit reduzierten Fgf-Signalen konnte keine direkte Wechselwirkung zwischen Pax6 und Fgf8 nachgewiesen werden (Grove, 2002; Muzio et al., 2002b; Garel et al., 2003).

1.2.2 Entstehung der Schichten im Neokortex

Der zerebrale Neokortex geht aus dem dorsalen Telenzephalon des Vorderhirns hervor. Im adulten Stadium besteht der Neokortex aus sechs Schichten, die sich aus dem Neuroepithelium entwickeln. Die kortikalen Schichten zeigen eine unterschiedliche Morphologie (aufgrund ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Neuronen), unterschiedliche Muster afferenter und efferenter axonaler Verbindungen und sie exprimieren unterschiedliche Markergene. Sie entwickeln sich aus dem Neuroepithelium des dorsalen Telenzephalons.

Der erste Schritt zur Schichtenbildung im dorsalen Telenzephalon ist die Teilung des Neuroepitheliums in eine innere Ebene mit proliferierenden Zellen, die ventrikuläre Schicht, und in eine äußere Ebene, die bekannt ist als primordiale, plexiforme Schicht oder *Preplate* (Marin-Padilla, 1971; Smart, 1983). Die *Preplate* enthält zukünftige Cajal-Retzius-Zellen, die über lange tangential Fortsätze (parallel zur Kortexoberfläche) verfügen. Cajal-Retzius-Zellen werden früh im ventrikulären Neuroepithelium generiert (Raedler und Raedler, 1978). Sie beginnen sich zu differenzieren, noch bevor sich die kortikalen Schichten ausbilden (Cajal, 1911; Uylings et al. 1990; Frotscher und Soriano, 1998). Wenn der Kortex dicker wird, erscheinen zwei weitere Schichten (E13). Dabei handelt es sich um die intermediäre Schicht und um die kortikale Platte. Die intermediäre

Schicht befindet sich direkt über der ventrikulären Neuroepithelium und enthält eine geringe Zahl an nicht-mitotischen Zellen. Die kortikale Platte entsteht in der Mitte der *Preplate* und besteht aus dicht gepackten Zellen. Die Entstehung der kortikalen Platte spaltet die *Preplate* in die oben liegenden Marginalzone und die unten liegende Subplatte. Zu diesem Zeitpunkt erscheint eine weitere Schicht zwischen dem ventrikulären Neuroepithelium und der intermediären Schicht, die sogenannte subventrikuläre Schicht. Diese enthält proliferierende Zellen, die im Neuroepithelium produziert wurden (Price und Willshaw, 2000). Zur Schichtenbildung siehe auch Abbildung 1.4.

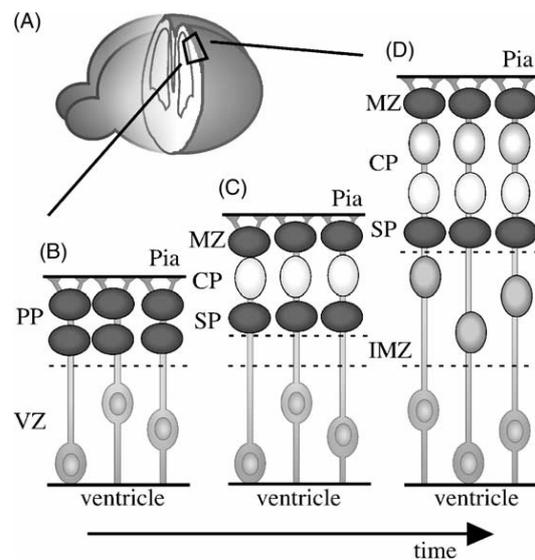


Abbildung 1.4: Schichtenbildung im Neokortex A) Schematisches Diagramm eines embryonalen Mäusegehirns. B-D) Illustration der verschiedenen Stadien in der neokortikalen Entwicklung. Neokortikale Entwicklung beginnt mit der Migration der ersten postmitotischen Neuronen zur pialen Oberfläche, um die *Preplate* (PP) über der ventrikulären Schicht (VZ) zu bilden. Anschließend sequentielle Migration von Neuronen spaltet die *Preplate* und teilt sie in eine zur Oberfläche gewandten marginalen Schicht (MZ), die Cajal-Retzius-Zellen (CR) enthält und in eine tiefer gelegene Subplatte (SP). Dazwischen bilden die Neuronen die kortikale Platte und nehmen ihre Positionen in einer „inside-out“-Formation ein, d.h. die später generierten Neuronen sind näher an der Oberfläche lokalisiert als die früher generierten Neuronen. IMZ, intermediäre Schicht (aus Honda et al., 2003).

Die zellulären Prozesse, die diesen anatomischen Veränderungen zugrunde liegen, sind in den letzten Jahrzehnten gut untersucht worden. Sie beinhalten die Generierung von Neuronen in oder nahe der ventrikulären Schicht des Neokortex und ihre anschließende Migration zur pialen Oberfläche, wo sie differenzieren (Angevine und Sidman, 1961; Rakic, 1974, 1988, 1997; Lund und Mustari, 1977; Smart und Smart, 1982; Luskin und Shatz, 1985 a,b; Shatz und Luskin, 1986; Jackson et al., 1989; Gillies und Price, 1993a; Caviness et al., 1995). Auf die zellulären Prozesse, die der Schichtenbildung zugrunde liegen, wird nach dem Einschub des Kapitels „Zellzyklus und Proliferation“ im Kapitel „Zellmigration“ näher eingegangen.

1.2.2.1 Zellzyklus und Proliferation

Wann und wie die Zellen die ventrikuläre Schicht verlassen, steht in engen Zusammenhang mit Zellzyklus und Proliferation. Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen wird in vier Phasen eingeteilt. Dabei handelt es sich um die M-Phase (M steht für Mitose), in der der Nukleus und das Zytoplasma sich teilen, die G1-Phase (G steht für *Gap* = Lücke) zwischen dem Ende der M-Phase und dem Beginn der DNA-Synthese, die S-Phase (S steht für Synthese), während dieser Phase wird der Nukleus repliziert, sowie die G2-Phase zwischen dem Ende der S-Phase und der nächsten M-Phase. Die Länge des Zellzyklus kann abhängig von Zellart und Entwicklungsstadium stark variieren. Variationen der Zykluslänge finden hauptsächlich in der G1-Phase statt. Einige Zellen, wie z.B. Neuronen, werden in der G1-Phase in einem Ruhestadium, bekannt als G₀, festgesetzt (Price und Willshaw, 2000).

Kerne ventrikulärer Zellen bewegen sich intrazellulär. In der S-Phase (DNA-Replikation) ist der Kern noch weit entfernt von der Oberfläche der ventrikulären Schicht. In der G2-Phase bewegt sich er sich zur ventrikulären Oberfläche, um in die Mitose einzutreten (Sidman et al., 1959; Fujita, 1964). Zwei unterschiedlichen Arten der Zellteilung finden in der ventrikulären Schicht statt: die symmetrische und die asymmetrische Teilung (Chenn und McConnell, 1995; Mione et al., 1997). Die symmetrische Teilung ist eine vertikale Spaltung, die zwei Tochterzellen generiert, die beide zu Stammzellen werden. In der asymmetrischen Teilung kommt es zu einer horizontalen Spaltung der Zelle. Dabei wird eine Tochterzelle generiert, die zur kortikalen Platte wandert. Die zweite Tochterzelle bleibt als Stammzelle in der ventrikulären Schicht. Es wird angenommen, dass die symmetrische Teilung häufiger in der frühen Kortigogenese stattfindet, wenn die Anzahl der Stammzellen expandiert. Asymmetrische Teilung dagegen dominiert in der späten Kortigogenese, wenn die neuronale Produktion größer ist (Price und Willshaw, 2000) (Abb.1.5).

Während der letzten Zellteilung findet eine Spezifizierung ventrikulärer Vorläuferzellen statt (Bohner et al., 1997, Edlund und Jessel, 1999). Neben Vorläuferzellen für Neurone, den Neuroblasten, entstehen auch Vorläuferzellen für Gliazellen, wie die Oligodendroblasten, Astroblasten und Radialglioblasten (mehr dazu im Kapitel „bHLH-Transkriptionsfaktoren“).

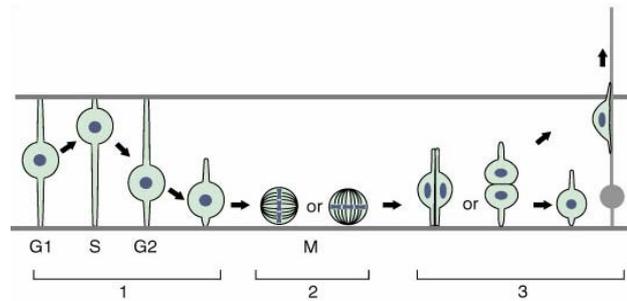


Abbildung 1.5: Neuronale Zellen in der ventrikulären Zone während des Zellzyklus (1), während der Mitose (2) und nach der Zellteilung (3). Von den Zellen, die sich asymmetrisch (parallel zur ventrikulären Oberfläche) teilen, bleibt eine undifferenziert, während die andere abwandert und differenziert. Bei einer symmetrischen (horizontal zur ventrikulären Oberfläche) Teilung bleiben beide Zellen in der ventrikulären Zone. Welche Teilung stattfindet, hängt von der Lage der Spindel während der Mitose ab (aus Faulkner et al., 2000).

1.2.3 Zellmigration

Schon früh in der Analyse der kortikalen Neurogenese wurde festgestellt, dass postmitotische neuronale Vorläuferzellen, generiert in der proliferativen Region des Neuroepitheliums, die intermediäre Schicht in enger Nachbarschaft zu den verlängerten Auswüchsen von Gliazellen durchwandern. Diese Gliazellen durchziehen die kortikale Schicht und werden radiale Gliazellen genannt. Sie werden früh in der kortikalen Neurogenese gebildet, bleiben während der gesamten Periode der neuronalen Migration bestehen und hören in diesem Zeitraum auf sich zu teilen, um die Migration der kortikalen neuronalen Vorläuferzellen zu unterstützen (Schmechel und Rakic, 1979).

Neuronale Vorläuferzellen migrieren in der Reihenfolge, in der sie generiert werden. Die erstgeborenen Neuronen bilden die *Preplate*. Diese Population wird später tangential durch migrierende Zellen geteilt, die die kortikale Platte bilden. Die Zellen oberhalb der kortikalen Platte bilden die marginale Schicht und die ersten sich differenzierenden Neuronen, die Cajal-Retzius-Zellen. Die Zellen unterhalb der kortikalen Platte bilden die Subplatte (Luskin und Shatz, 1985b; Whale und Meyer, 1987; Gosh et al., 1990; Wood et al., 1992)

Neuronale Vorläuferzellen, die die tieferen Schichten der kortikalen Platte bilden, werden früher geboren, als solche, die die Schichten bilden, die näher an der Oberfläche liegen. Später geborene Zellen durchwandern die früher gebildeten Schichten der kortikalen Platte in einem sogenannten „Inside-Out“-Mechanismus (Gillies und Price, 1993a) (siehe auch Kapitel „Neokortikale Schichtenbildung“ und Abb.1.4).

1.2.3.1 Radiale und tangentielle Migration

Zwei verschiedene Mechanismen der Migration wurden bisher identifiziert: radiale und tangentielle Migration. Erstere teilt sich in nukleare Translokation und Lokomotion auf.

Die nukleare oder auch somale Translokation findet statt, indem Neurone ihren Hauptfortsatz (*leading process*) zur pialen Oberfläche ausdehnen (Morest, 1970; Brittis et al., 1995). So erreichen sie unabhängig von radialen Gliazellen ihren finalen Bestimmungsort (Morest, 1970).

Diese Art der radialen Migration verläuft als kontinuierliche Bewegung, in der der Zellkern zum oberen Rand (*leading edge*) des Neurons wandert. Dadurch verkürzt sich der Hauptfortsatz, der an der pialen Oberfläche angeheftet ist. Durch die Anheftung kann das Neuron radial migrieren und falls nötig seine Vorgänger passieren. Am Embryonaltag 12-13 der Maus-Entwicklung benutzen Neuronen die nukleare Translokation, um die *Preplate* zu spalten. Nukleare Translokation erfolgt im gesamten Neokortex, solange die zerebrale Wand noch so dünn ist, dass Neurone ihren Hauptfortsatz an die piale Oberfläche anheften können. Das Zellsoma der Neurone befindet sich zu diesem Zeitpunkt noch in der ventrikulären Schicht (Gupta et al., 2002).

Die nukleare Lokomotion bezeichnet die Migration von Neuronen entlang radialer Gliazellen (Rakic, 1971a, b; 1972; O'Rourke et al 1992; Edmondson und Hatten, 1987).

Zellen, die sich mittels radialer Gliazellen fortbewegen, halten die Länge ihres Hauptfortsatzes aufrecht, weil sich das Zellsoma und der Hauptfortsatz zusammenbewegen. Diese Bewegung kann unterbrochen werden. Im Stadium E15-E16 der Maus ist die *Preplate* schon geteilt, und die kortikale Platte expandiert schnell. Während dieser Zeit dominiert die Lokomotion, aber nukleare Translokation geschieht weiterhin in der oberen Hälfte des Neokortex. In einem breiteren Neokortex können Neuronen diesen ohne die Hilfe radialer Gliazellen nicht überwinden, weil ihre Hauptfortsätze zu kurz sind. Deswegen benutzen Neuronen zuerst radiale Gliazellen, um sich durch Lokomotion zu bewegen, und gehen zur nuklearen Translokation über, wenn sie den Kortex soweit durchwandert haben, dass sie ihren Hauptfortsatz an die piale Oberfläche anheften können (Gupta et al., 2002) (s. Abb. 1.6).

Einige kortikale Vorläuferzellen folgen nicht dem radialen Weg und verbreiten sich in tangentialer Richtung (Hatten, 1993; Rakic 1995). O'Rourke und Kollegen (1992) beobachteten *in vitro*, dass eine signifikante Menge Zellen orthogonal zu den radialen Gliazellen migrierte.

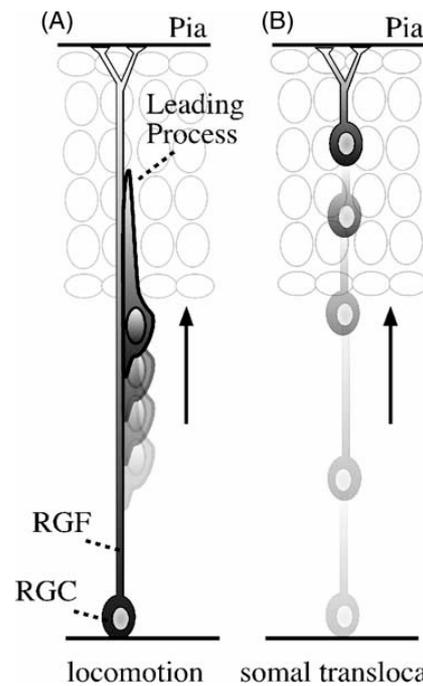


Abbildung 1.6: Migrationsmechanismen der neokortikalen Neurone. Im sich entwickelnden Kortex gibt es zwei Sorten der radialen Migration: Lokomotion und nukleare (somale) Translokation. A) Zellen, die sich mit Hilfe der Lokomotion bewegen verändern nicht die Länge des Hauptfortsatzes. B) Zellen, die mittels nuklearer Translokation migrieren, haben ihre radial orientierten Fasern an die piaale Oberfläche angeheftet und bewegen sich kontinuierlich. Die Migrationsgeschwindigkeit der nuklearen Translokation ist schneller ($60 \mu\text{m/h}$) als die der Lokomotion ($35 \mu\text{m/h}$) (aus Honda et al., 2003). Abkürzungen: RGC, radiale Gliazelle; RGF, radialer Gliafortsatz

Dazu kam die Beobachtung *in vivo*, dass einige migrierende Neuronen sich nicht radial orientieren und andere Substrate als Gliazellen (z.B. Axone) nutzen, um tangential zu migrieren (Valverde et al., 1989; O'Rourke et al., 1995). Weitere Studien haben tangential orientierte postmitotische Neuronen in der ventrikulären und in der subventrikulären Schicht gezeigt (O'Rourke et al., 1997; Menezes und Luskin, 1994).

Diese tangential wandernden Zellen haben ihren Ursprung in der proliferativen Schicht des ventralen Telenzephalons (Corbin et al., 2001; Parnavelas, 2000; Tekki-Kessaris et al., 2001).

1.3 Molekulare Grundlagen der neuronalen Migration

Nachdem die grundlegenden Prinzipien der neuronalen Schichtenbildung im Neokortex erläutert wurden, werden nun die molekularen Mechanismen betrachtet, die diesen Prozess kontrollieren. In Abbildung 1.7 sind einige Moleküle mit ihrer Funktion und ihrem Wirkungsort aufgeführt.

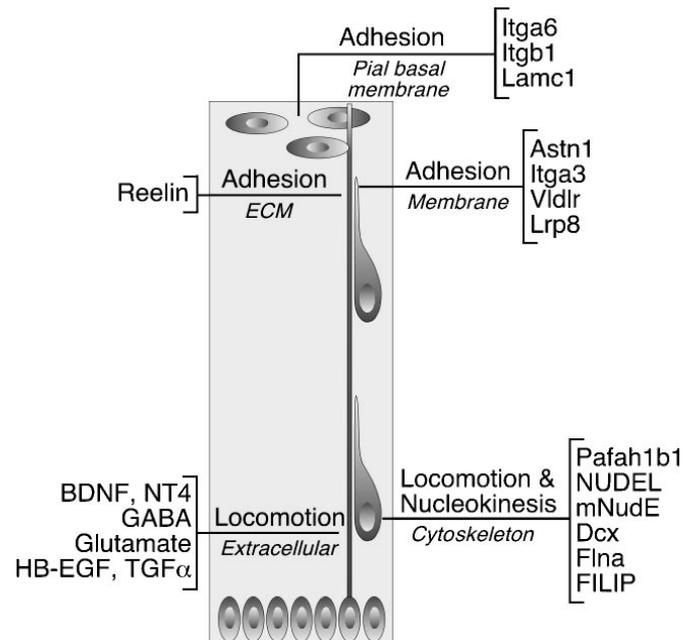


Abbildung 1.7: Mechanismen, die die radiale Migration im zerebralen Kortex regulieren. Die ventrikuläre Schicht befindet sich unten und die marginale Schicht oben. Moleküle, die in die radiale Migration verwickelt sind, werden entsprechend ihrer Funktion (z.B. Adhäsion) und ihrem Wirkungsort (z.B. Membran) dargestellt (aus Marin und Rubenstein, 2003)

1.3.1 Funktionelle Studien von Lis1 und Doublecortin

Ein kritischer Aspekt der radialen Migration ist die dynamische Anpassung des Mikrotubuli-Netzwerkes. Zwei Prozesse des Mikrotubuli-Zytoskeletts sind für die neuronale Migration essenziell: die Extension des Hauptfortsatzes und die Translokation des Nukleus (s.o; Edmondson und Hatten, 1987; Komuro und Rakic, 1996; Nadarajah et al., 2001; Rakic et al., 1996; Rivas und Hatten, 1995). Diese Beobachtungen legen nahe, dass Proteine, die die zelluläre Maschinerie kontrollieren, wahrscheinlich eine große Rolle in der neuronalen Migration spielen.

Einige Gene, die die radiale Migration regulieren, stehen in Verbindung zum Mikrotubuli-zytoskelett. Bei einem dieser Gene handelt es sich um Lis1, die nichtkatalytische Untereinheit der *Platelet-activating factor acetylhydrolase*, *Pafah1b1*. Lis1 kodiert ein Protein, das in multiple Protein-Protein-Interaktionen verwickelt ist (Feng und Walsh, 2001; Gupta et al., 2002). Mutationen im humanem Lis1-Gen verursachen ein schwere Form der Lissenzephalie, auch Miller-Dieker Syndrom genannt (Hattori et al. 1994, Reiner et al., 1993). Lissenzephalie wird durch einen disorganisierten zerebralen Kortex charakterisiert, der durch eine anomale neuronale Migration verursacht wird. Die Furchen

und Windungen der Gehirnoberfläche sind nur gering ausgebildet (Lissenzephalie = glattes Gehirn). Klinische Symptome sind geistige Behinderung und Epilepsie (Aicardi, 1991).

Die Funktion von Lis1 in der neuronalen Migration ist immer noch unklar. NudF, ein Lis-Homolog in *Aspergillus nidulans*, und Drosophila dLis1 werden für die nukleare Migration benötigt (Lei und Warrior, 2000, Xiang et al., 1995). In allen untersuchten Organismen bindet Lis1 an Tubulin und andere Proteine, die mit dem Mikrotubulinetzwerk interagieren (Sapir et al., 1997). Bei einem dieser Proteine handelt es sich um zytoplasmatisches Dynein (Faulkner et al., 2000; Smith et al., 2000). Dynein ist ein Motorprotein des Tubulin-basierenden Transports, das in den intrazellulären Transport von Organellen verwickelt ist. Überexpression von Lis1 führt zur Aggregation von Dynein und Dynaktin und zum Transport von Mikrotubulifragmenten zur Zellperipherie (Smith et al., 2000). Lis1 scheint die Dynamik der Mikrotubuli in migrierenden Zellen durch Assoziation mit Tubulin und Dynein/Dynaktin zu kontrollieren.

Zwei weitere Proteine interagieren direkt mit Lis1 in Säugetieren: Nudel und mNudE, Homologe des *A.nidulans*-Proteins NudF (Efimov und Morris, 2000; Kitagawa et al., 2000; Niethammer et al., 2000; Sasaki et al., 2000). Nudel und mNudE kolokalisieren und interagieren in verschiedenen Entwicklungsstadien mit Lis1 (Efimov und Morris, 2000; Kitagawa et al., 2000; Niethammer et al., 2000; Sasaki et al., 2000). Zusätzlich bindet mNudE spezifische Proteine des Zentrosoms (das wichtigste Mikrotubuli-organisationszentrum tierischer Zellen) und die leichte Kette des Dyneins, wohingegen Nudel in erster Linie mit der schweren Kette des Dyneins interagiert (Feng et al., 2000). Überexpressionsexperimente legen nahe, dass Nudel die Lokalisation von Dynein kontrolliert (Niethammer et al., 2000; Sasaki et al., 2000), und mNudE das Mikrotubulinetzwerk am Zentrosom beeinflusst (Feng et al., 2000). Weil das Zentrosom eine wichtige Rolle in der Zellteilung spielt, ist es möglich, dass Lis1-mNudE-Dynein-Interaktion an der Mitose und dem Zellzyklus mitwirken (Faulkner et al., 2000; Liu et al., 2000).

Doublecortin (DCX) ist ein anderes Gen, dessen Mutation im Menschen zu Lissenzephalie führt (des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998). Mutationen in DCX führen bei männlichen Patienten zu Lissenzephalie, während weibliche Patienten einen doppelten Kortex ausbilden, bekannt als *Subcortical Band Heterotopia*. DCX ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP), dessen Funktion das Mikrotubulinetzwerk stabilisiert (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999a; Horesh et al., 1999). Es wird in migrierenden und sich differenzierenden Neuronen exprimiert, wo es mit polymerisiertem Mikrotubuli interagiert. Rekombinantes DCX stimuliert die Polymerisation von Tubulin *in vitro* (Gleeson et al.,

1999a). Am C-terminalen Ende von Doublecortin befindet sich eine Serin/Prolin-reiche Region und ein Tetrapeptid (YLPL), das mit dem Clathrin-assoziierten Protein μ 1A interagiert (Friocourt et al., 2001; Tsukada unveröffentlicht). μ 1A ist eine Untereinheit des heterotetrameren AP-1-Adapter-Komplexes, der für den clathrin-unterstützten vesikulären Transport zwischen Trans-Golgi-Netzwerk und Endosomen benötigt wird (Kirchhausen, 1999; Pearse et al., 2000).

Eine mutante DCX-Maus zeigt eine anomale Zytoarchitektur im Hippokampus und eine normale Schichtenbildung im Neokortex (Corbo et al., 2002). Mäuse mit Lis1-Mutation zeigen ebenfalls einen eher subtilen Phänotyp im Neokortex aber einen hervorstechenden hippokampalen Defekt (Fleck et al., 2000). Heterozygote Lis1-Mäuse zeigen in heterotopen pyramidalen Neuronen des Hippokampus dendritische Defekte (weniger Zweige, reduzierte Länge der Dendriten etc.) (Fleck et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Lis1 auch in der Proliferation von Neuroblasten, der Entwicklung von Dendriten und im axonalen Transport bei *Drosophila* eine Rolle spielt (Liu et al., 2000).

Lis1 und DCX werden koexprimiert, interagieren miteinander und sind im gleichen Proteinkomplex im sich entwickelnden Gehirn aktiv (Caspi et al., 2000). Obwohl ihre Funktionen verschieden sind, koordinieren diese Proteine wahrscheinlich ähnliche Prozesse der neuronalen Migration, wie z.B. die Tranlokation des Nukleus. Die Rollen von Lis1 und DCX im sich entwickelnden Kortex illustrieren den starken Einfluß, den die Dynamik von Mikrotubuli auf die neuronale Migration hat.

Das Aktin-Zytoskelett reguliert ebenfalls die Beweglichkeit von migrierenden Neuronen. Das wird durch einen Migrationsdefekt belegt, der bei Menschen mit Mutationen in einem Gen beobachtet wird, dass für das aktinbindende Protein Filamin1 (Flna) kodiert (Fox et al., 1998; Moro et al., 2002; Sheen et al., 2001). Mutationen in Flna verursachen periventikuläre Heterotopia. Dabei handelt es sich um einen Migrationsfehler bei dem viele Neurone, die für die kortikale Platte bestimmt sind, nahe des Neuroepitheliums akkumulieren (Eksioglu et al., 1996). Flna verbindet F-Aktin in einer orthogonalen Ordnung, die die Viskosität des F-Aktin-Netzwerkes erhöht und die Zellbeweglichkeit steigert (Stossel et al., 2001). Flna wird in wandernden Neuronen exprimiert, die die ventrikuläre Schicht verlassen (Fox et al., 1998), was eine Überlappung mit Mechanismen vermuten lässt, die den Start der Migration von kortikalen Neuronen signalisieren. Neuronale Migration benötigt also das Mikrotubuli- und das Aktin-Netzwerk. Es ist aber nicht bekannt wie beide Komponenten interagieren, um gerichtete Zellbewegung zu produzieren (Walsh und Goffinet, 2000; Feng und Walsh, 2001).

1.3.1.1 Neurabin II

Neurabin II, auch Spinophilin genannt, ist die regulatorische Untereinheit des Phosphatase 1-Bindeprotein (PP1)-Komplexes und moduliert dessen Aktivität *in vitro*. Es ist verstärkt in dendritischen Fortsätzen (Spines) von Neuronen lokalisiert. Diese speziellen Fortsätze erhalten die meisten exzitatorischen Informationen im zentralen Nervensystem (Allen et al., 1997). In der Aminosäuresequenz von Neurabin II wurden eine PDZ-Domäne (interagiert mit Transmembranproteinen), eine F-Aktin-bindende Domäne und eine Coiled-Coil-Domäne gefunden (Allen et al., 1997; Vivo et al., 2001). Dass Neurabin II tatsächlich an F-Aktin bindet, wurde 1998 von Satoh und Kollegen nachgewiesen.

Neurabin II wurde in unserem Labor mittels eines *Yeast Two Hybrid-Screens* mit DCX als Köder identifiziert. Die Bestätigung der Interaktion könnte die Frage der Verknüpfung von Mikrotubuli- und Aktinnetzwerk während der neuronalen Migration entscheidend voranbringen.

1.3.1.2 RanBPM

Die Abkürzung steht für **Ran Binding Protein in Microtubule organizing center** (MOTC) und das Kürzel Ran steht für **Ras like nuclear small GTPase**. RanBPM ist also ein Bindeprotein der kleinen GTPase RAN. RAN reguliert die Mikrotubuliformation durch RanBPM. RanBPM zeigt ausserdem eine spezifische Interaktion mit RanGTP. Es ist während des Zellzyklus zusammen mit γ -Tubulin im Zentrosom lokalisiert und initiiert die ektopische Mikrotubulinukleation. (Nakamura et al., 1998). Diese Mikrotubulinukleationen resultieren in einer Reorganisation des Mikrotubulinetzwerkes. Nakamura und Kollegen folgerten daraus, dass Ran das Zentrosom durch RanBPM reguliert.

RAN ist ein kleines GTP-bindendes Protein das zur Ras-Superfamilie gehört und für die Translokation von RNA und Proteinen durch den nuklearen Porenkomplex essenziell ist (Ren et al., 1993). Das RAN-Protein steuert die Kontrolle der DNA-Synthese, des Zellzyklus und den zytoplasmatischen Transport. Es reguliert die Formation des Mikrotubulinetzwerkes und induziert spindelähnliche Strukturen im M-Phase-Extrakt (Carazo-Salas, 1999). Aufgrund der Verbindung von RAN und RanBPM mit dem Mikrotubuli-Netzwerk und Chromosomen könnte eine Wechselwirkung zwischen RanBPM und LIS1 die neuronale Migration mit der Zellteilung verknüpfen.

RanBPM wurde in unserem Labor in einem *Yeast Two Hybrid Screen* mit Lis1 als Köderprotein identifiziert. Zu dem Zeitpunkt als diese Arbeiten durchgeführt wurden, gab

es nur einen Artikel von Nakamura et al., 1998 (s.o). Als die Arbeiten an diesem Projekt fast abgeschlossen waren, erschien ein zweiter Artikel (Nishitani et al., 2001), der besagte, dass das 55 kDa RanBPM ein verkürztes, abgeschnittenes Protein sei. Das vollständige RanBPM verfüge über ein Gewicht von 90 kDa und sei nicht mehr am Zentrosom lokalisiert, sondern in der perinuklearen Region oder dem Nukleus. In unseren Versuchen wurde das 55 kDa große Protein verwendet.

1.3.2 Weitere Moleküle die bei der neuronalen Migration eine Rolle spielen

Die Analyse von Mutationen in Mäusen und Menschen legt nahe, dass die Interaktion zwischen migrierenden Neuronen und Cajal-Retzius Zellen für den Prozess der neuronalen Migration essenziell ist. Cajal-Retzius-Zellen exprimieren Reelin, ein großes sekretierendes Proteine, dessen Mutation (Reeler-Mutante) eine Unterbrechung der neuronalen Migration verursacht (D’Arcangelo et al., 1995; Hirotsune et al., 1995; Ogawa et al., 1995). Die Reeler-Mutation ist auch für Lissenzephalie mit zerebraler Hypoplasia beim Menschen verantwortlich (Hong et al., 2000).

Der Phänotyp der Reeler-Mutante zeigt, dass die *Preplate* nicht gespalten wird und jüngere Neuronen deshalb nicht in der Lage sind die älteren zu passieren. Dadurch kommt es zu einer Inversion des eigentlichen kortikalen Musters (Caviness 1982, Hoffarth et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Rice und Curran, 2001; Sheppard und Pearlman, 1997).

Reelin ist ein hoch affiner Ligand für zwei Mitglieder der LDL-Familie der Lipoprotein-Rezeptoren. *Very-Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor* (VLDLR) und *Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor-Related Protein 8* (LRP8, auch bekannt als ApoER2), die von migrierenden kortikalen Zellen exprimiert werden (D’Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999). Die Anlagerung von Reelin an VLDLR/LRP8 vermittelt die Internalisierung von Reelin und die Tyrosin-Phosphorylierung des Proteins Dab1. Dab1 ist das Maus-Homologe des Drosophilaproteins Disabled (D’Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999; Howell et al., 1999, 2000). Bei Dab1 handelt es sich um ein zytoplasmatisches Adapterprotein, dass mit den zytoplasmatischen Domänen von VLDLR und LRP8 interagiert. Es wird mit der Reorganisation von Mikrotubuli und Mikrofilamenten im Zytoskelett in Verbindung gebracht (Trommsdorff et al., 1998, 1999).

Mäuse, denen beide Rezeptoren fehlen (Trommsdorff et al., 1999) und Mäuse mit einer Mutation im Dab1-Gen (*Scrambler- und Yotari-Mäuse*) (Howell et al., 1997; Gonzalez et al., 1997; Rice et al., 1998; Sheldon et al., 1997; Sweet et al., 1996; Ware et al., 1997; Yoneshima et al., 1997) zeigen Defekte in der Schichtenbildung, die von denen der Reeler-

Maus nicht zu unterscheiden sind. Dies legt nahe, dass Reelin, VLDLR, LRP8 und Dab1 in derselben genetischen Signalkaskade wirken, die die Positionierung der Neuronen während der radialen Migration kontrolliert (siehe auch Abbildung 1.8).

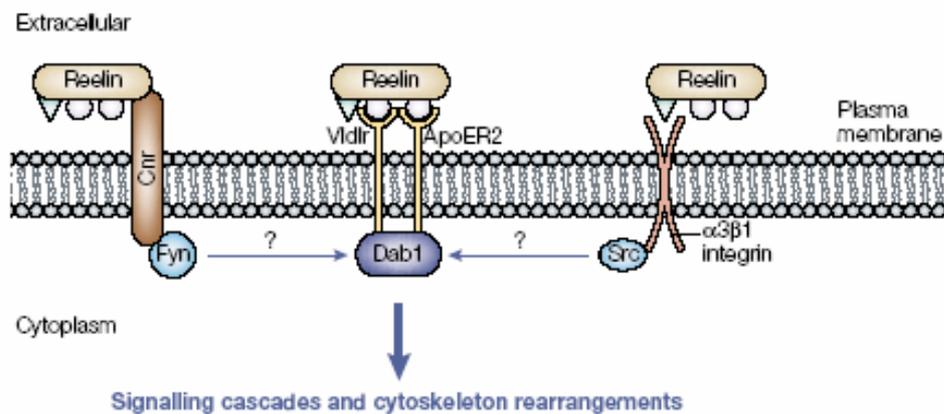


Abbildung 1.8: Durch Reelin gesteuerte Signalkaskade

Die Bindung von Reelin an den VLDLR- oder ApoER2-Rezeptor resultiert in einer Tyrosin-Phosphorylierung von Dab1. Diese ist für die Aktivierung der Signalkaskade, die die zellulären Effekte von Reelin steuert, notwendig. Die Identität der Kinase ist noch nicht bekannt. Potenzielle Kandidaten sind die *non-receptor* Tyrosinkinase der Src-Familie. Nach dieser Theorie binden Fyn und Src an *cadherin-related* neuronale Rezeptoren (Crns) und Integrine, die ebenfalls Rezeptoren für Reelin darstellen (aus Gupta et al., 2002).

Ein zweiter Signalweg, der die neuronale Positionierung während der Kortexentwicklung reguliert, ist von der Cyclin-abhängigen Kinase 5 (Cdk5) und ihren aktivierenden Untereinheiten p35 und p39 abhängig. Mutante Mäuse für Cdk5 und p35 zeigen Defekte in der Schichtenbildung, die denen des Reelin-Signalweges ähnlich aber nicht identisch sind (Chae et al., 1997; Gilmore et al., 1998; Ko et al., 2001; Kwon und Tsai, 1998; Ohshima et al., 1996). Mutationen in der Cdk5-Signalkaskade resultieren in einer normal gespaltenen *Preplate*, die kortikale Platte zeigt aber immer noch eine Inversion der Schichten. Diese Beobachtungen legen nahe, dass das Spalten der *Preplate* und der Erwerb einer normalen kortikalen Schichtenbildung unabhängig voneinander verlaufen können. Die initiale Invasion der *Preplate* scheint primär von Reelin abzuhängen.

Gibt es eine Verknüpfung zwischen dem Reelin- und dem Cdk5-Signalweg? Die Ähnlichkeit der Defekte in den Mutanten beider Signalkaskaden lässt eine Überlappung der von Reelin und Cdk5 gesteuerten Signale vermuten. Cdk5 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die Proteine phosphoryliert, die die zytoskeletale Struktur aufrechterhalten (Marin und Rubenstein, 2003). Unabhängig voneinander können Cdk5- und Reelin-Signale Dab1 phosphorylieren (Keshvara et al., 2002). Es ist nicht bekannt, wie die Phosphorylierung von Dab1 in eine Aktivierung von Signalkaskaden und zytoskeletaler Neuordnung

umgesetzt wird. Trotzdem legen die bisherigen Beobachtungen eine Verbindung zwischen den beiden Signalkaskaden nahe, die die Positionierung der Zellen im cerebralen Kortex kontrolliert. Es wurde demonstriert, dass Nudel ein physiologisches Substrat von Cdk5 darstellt (Niethammer et al., 2000; Sasaki et al., 2000). Diese Tatsache indiziert, dass einige Defekte, die in der Cdk5-Mutante beobachtet wurden, vielleicht durch eine anomale Bewegung von radial migrierenden Neuronen verursacht wurden (siehe auch Abbildung 1.9)

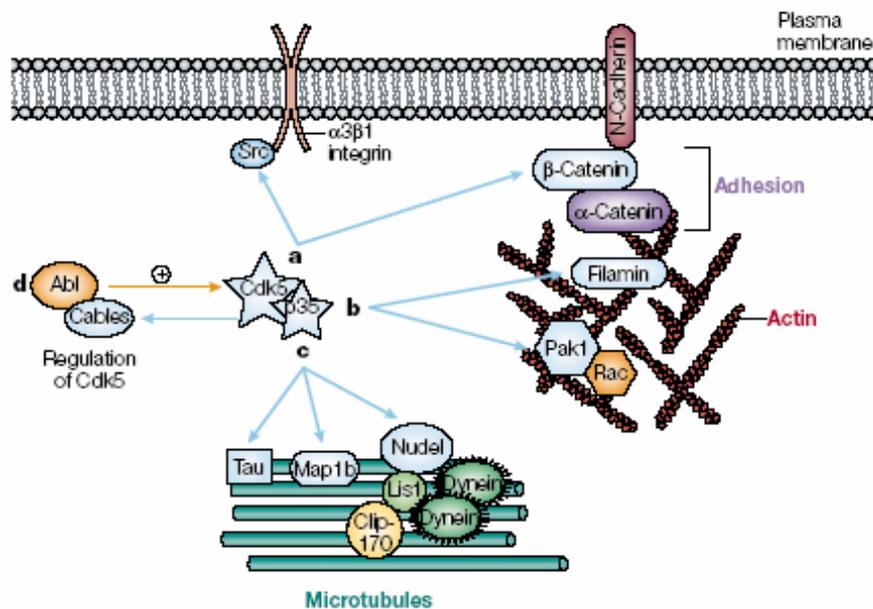


Abbildung 1.9: p35-Cdk5 Signalkaskade; p35-Cdk5 und ihre Substrate sind hellblau hervorgehoben
 a) p35-Cdk5 moduliert integrinabhängige Zellmatrix-Adhäsion durch Phosphorylierung von Src und beeinflusst N-cadherinabhängige Zell-Zell-Adhäsion. So unterbricht z.B. die Bindung von p35-Cdk5 an β-catenin die Anheftung von N-Cadherin an die Plasmamembran. b) p35-Cdk5 reguliert die Dynamik von Aktin durch Phosphorylierung von Filamin (aktinbindendes Protein) oder Pak1-Rac-Komplex. c) p35-Cdk5 beeinflusst die Dynamik von Mikrotubuli durch Phosphorylierung mikrotubuli-assoziiierter Proteine wie Map1b oder Tau, die beide Mikrotubuli stabilisieren oder durch Phosphorylierung von Nudel, dass mit dem Lis1-Dynein-Komplex interagiert d) Cdk5-Aktivität wird durch die non-receptor Tyrosinkinase Abl modifiziert, die durch das Protein Cables mit Cdk5 verbunden ist. Abl kann Cdk5 durch Phosphorylierung aktivieren (oraner Pfeil) (aus Gupta et al., 2002)

1.3.3 Die Rolle von Pax6 in der kortikalen Entwicklung

Pax6 ist ein hoch konserviertes Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren. Es enthält eine Paired- und eine Homeobox DNA-bindende Domäne (Bopp et al., 1986, Treisman et al., 1991). Mausstämmen, die eine heterozygote Mutation im Pax6-Gen tragen, haben charakteristische kleine Augen, ein Phänotyp analog zur humanen Krankheit Aniridie. Homozygote Pax6-Mutanten haben gar keine Augen (Hill et al., 1991).

Neben den Augen fehlen der Pax6-Mutante auch nasale Strukturen. Sie sterben nach der Geburt und weisen schwere Anomalitäten des zentralen Nervensystems auf. Darunter

befinden sich auch Muster- und Wachstumsdefekte im sich entwickelnden Vorderhirn (Hogan et al., 1986; Schmahl et al., 1993; Quinn et al., 1996; Stoykova et al., 1996; Caric et al., 1997; Mastick et al., 1997; Warren und Price, 1997; Götz et al. 1998; Vitalis et al., 2000; Pratt et al., 2000).

Die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors geht also weit über die Regulation der Augenentwicklung hinaus und ist für Zellproliferation, Migration und Differenzierung in diversen neuronalen und nicht neuronalen Geweben essenziell (Simpson und Price, 2002).

Pax6 wird hauptsächlich im dorsalen Telenzephalon des Vorderhirns exprimiert. Der Verlust von Pax6 in dieser Region führt zu veränderten Expressionsmustern bestimmter Transkriptionsfaktoren (bHLH- und homedomänen-enthaltende Transkriptionsfaktoren) (Heins et al., 2002). So wird z.B. Neurogenin (Ngn) in der germinalen Schicht des Neokortex von Pax6-Mutanten nicht mehr exprimiert, während Mash1, Gsh2 und Dlx ektopisch im dorsalen Telenzephalon exprimiert werden (Toresson et al., 2000).

Die neokortikale Regionalisierung wird von intrinsischen und extrinsischen Mechanismen reguliert (Rakic, 1988; O'Leary, 1989; s.o). Der Expressionsgradient von Pax6 in Kombination mit dem komplementären Expressionsgradienten von Emx2 ist für die neokortikale Arealisierung verantwortlich (Bishop et al., 2000; s.o). Diese Art der Expression kontrolliert wahrscheinlich die lokale Identität, Proliferation und/oder die radiale Migration von Zellen der proliferativen Region zum Neokortex und kontrolliert auf diesem Wege die kortikale Regionalisierung.

Der Verlust von Pax6 beeinflusst die Wanderung neuronaler Vorläuferzellen zwischen subventrikulärer Schicht und intermediärer Schicht (Talamillo et al., 2003).

Viele Pax6-defiziente Zellen in E16.5-Chimären drängen sich an der Grenze zwischen subventrikulärer Schicht und intermediärer Schicht zusammen. Die Zelldichte in der subventrikulären Schicht ist in der rostral-lateralen Region am höchsten und in der medio-caudalen Region am niedrigsten. Das Fehlen von Pax6 verhindert offensichtlich die effiziente Migration von Neuroblasten, weil diese die subventrikuläre Schicht nicht verlassen und nicht in die intermediäre Schicht eintreten können. Für diese Theorie spricht auch, dass die Zellen alle relevanten Marker, die sie bis zu ihrer Differenzierung in der kortikalen Platte exprimieren würden, weiterhin exprimieren (Talamillo et al., 2003). Welche Art der Wanderung die Zellen auf ihrem Weg zur subventrikulären Schicht benutzen ist nicht klar. Altman und Bayer (1990 b) nehmen an, dass die Neurone ihre radiale Migration in der subventrikulären Schicht unterbrechen. Das indiziert eine Übergangsphase an dieser Grenze. Talamillo und Kollegen (2003) schlagen vor, dass die radiale Migration an diesem Punkt zusätzliche genetische Informationen benötigt und das

Pax6 diesen Schritt reguliert. Pax6 beeinflusst die radiale und die tangentielle Migration von neuronalen Vorläuferzellen, indem es zelluläre Interaktionen beeinflusst, die für diese Migrationen benötigt werden (Talamillo et al., 2003).

Pax6 reguliert also zelluläre Interaktion (Edelman und Jones, 1998; Meech et al., 1999; Stoykova et al., 1997) und neuronale Migration. Diese Vorgänge sind von der Beschaffenheit der Zelloberfläche abhängig. Deshalb wird die primäre Rolle von Pax6 in der Entwicklung des Vorderhirns in der Regulierung der Eigenschaften der Zelloberfläche vermutet (Talamillo et al., 2003).

Pax6 wird in radialen Gliazellen im Wildtyp-Neokortex detektiert. In der homozygoten Pax6-Mutante zeigen sie eine veränderte Morphologie, veränderte Tenascinexpression (Tenascin C markiert Vorläuferzellen von Astrozyten) und einen veränderten Zellzyklus (Caric et al., 1997; Götz et al., 1998; Heins et al., 2002). Die neurogenetischen Nachfahren der radialen Gliazellen sind im Kortex der Pax6-Mutante reduziert, während Überexpression von Pax6 die Anzahl der Neuronen steigert und sogar Astrozyten zur Neurogenese führt. Pax6 führt zudem multipotente Vorläuferzellen zur Neurogenese. In seiner Abwesenheit kommt es zu einem Anstieg an multipotenten Vorläuferzellen (Heins et al., 2002). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass Pax6 die bHLH-Transkriptionsfaktoren beeinflusst (s.o. Heins et al., 2002).

Pax6 scheint daher ein notwendiger intrinsischer Faktor für ein neurogenetisches Schicksal von kortikalen radialen glialen Vorläuferzellen zu sein (Heins et al., 2002.)

Um die Funktion von Pax6 in dieser Region zu verstehen ist es notwendig die nachgeschalteten Gene zu identifizieren.

1.4 Entwicklung des Hippokampus im Archikortex

Eine zentrale Frage der Entwicklungsneurobiologie befasst sich mit der Entstehung der kortikalen Areale. Der Gyrus Dentatus des Telenzephalons ist ein bewährtes Modell für dieses Problem: ein präzise definierter Bereich, dessen Struktur und Funktion sehr gut untersucht sind.

Wie andere Regionen im Kortex wird der Gyrus Dentatus anfänglich von Cajal-Retzius Zellen bevölkert. Radiale Gliazellen helfen, die Morphogenese zu steuern (Rickmann et al., 1987; Del Rio et al., 1997; Alcantara et al., 1998; Borrell et al., 1999). Die Entwicklung des Gyrus dentatus schreitet mit der Ausdehnung der radialen Gliazellen von der

ventrikulären Schicht zur pialen Oberfläche voran, um ein Netz für radial migrierende Neuronen zu produzieren (Rakic, 1972).

Die migrierenden Zellen bestehen aus einem Mix postmitotischer unreifer Körnerzellen und aus einer Gruppe mitotischer Körner- und Gliavorläuferzellen (Altman und Bayer, 1990a und b; Pleasure et al., 2000; Yuasa et al., 2002).

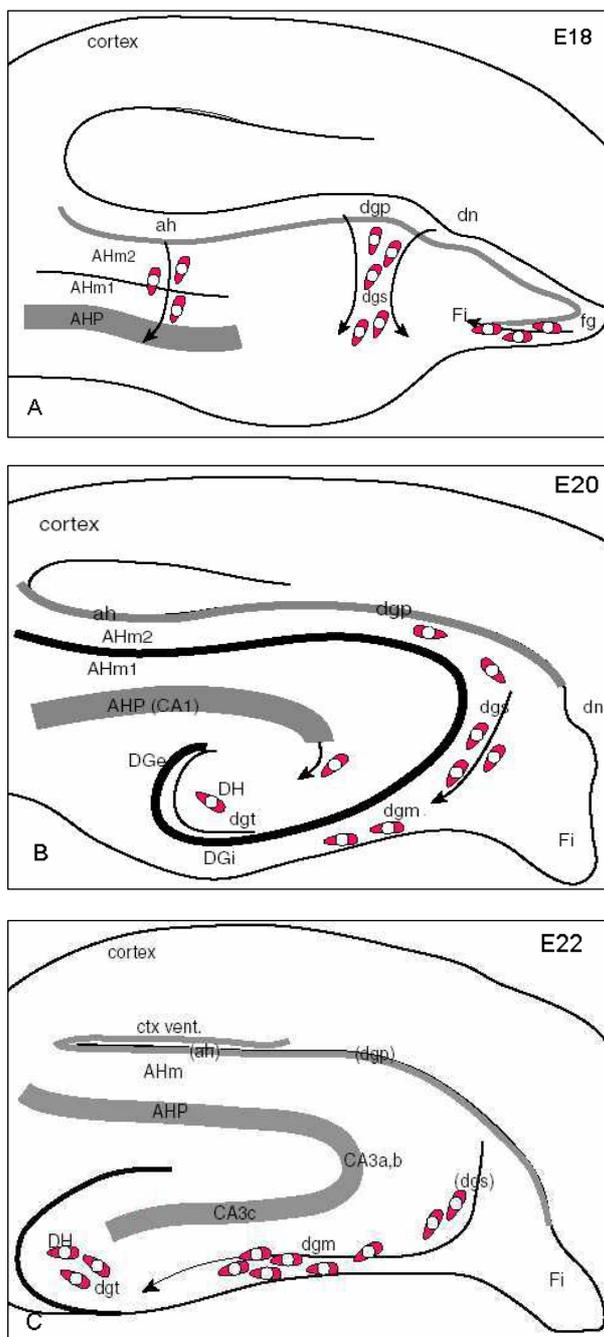


Abbildung 1.10: Entwicklung des Gyrus Dentatus bei Ratten zwischen E18 und E22 (entworfen nach Altman und Bayer, 1990a).

A) Vorläuferzellen (rot mit weißem Kern) des Gyrus Dentatus entspringen einem begrenzten Areal der ventrikulären Schicht (dgp) im medialen Pallium, benachbart zu der Region von der aus der Hippokampus proper (ah) entsteht. Diese Neuroblasten verlassen das primäre Neuroepithelium und formieren eine sekundäre proliferative Zone (dgs) (Stanfield und Cowan, 1988; Altman und Bayer 1990a). B) Schließlich verlassen Vorläufer von Körnerzellen die sekundäre proliferative Zone, wandern erst radial, dann tangential (dgm) und aggregieren in einer tertiären Matrix (dgt) werden zeitlebens Körnerzellen gebildet (Stanfield und Cowan, 1988). Die meisten Körnerzellen formieren sich jedoch in den ersten drei Wochen nach der Geburt.

Abkürzungen: ah, Ammonisches Neuroepithelium; Ahm: Ammonische Migration; AHP: Ammons Horn oder Stratum Pyramidale; CA, Cornu Ammonis; DGe, externe Molekularschicht des Gyrus Dentatus; Dgi, intere Molekularschicht des Gyrus Dentatus; dgm, dentale Migration; dgp, primäres Neuroepithelium; dgs, sekundäre Matrix (oder sekundäre proliferative Zone); dgt, tertiäre Matrix; DH, dentale Hiluszellen; dn, dentale Kerbe, fg, fimbriales Glioepithelium; Fi, Fimbria

Das Neuroepithelium des Gyrus Dentatus ist eine spezifische Subdomäne des kortikalen Neuroepitheliums mit einem eigenen Bauplan, in dem mitotische, körnerzell-generierende Vorläuferzellen aus der proliferativen Subventrikulärzone (sekundäre Matrix) des

Neuroepitheliums in die Gyrus Dentatus-Anlage einwandern. Diese Vorläuferzellen etablieren eine ektopische proliferative Zone (tertiäre Matrix) im späteren Hilus des Gyrus Dentatus (Pleasure et al., 2000; Altman und Das, 1965a, b; Altman und Bayer, 1990a, b). In der zweiten Hälfte des ersten Lebensmonats siedeln sich diese Vorläuferzellen in der subgranulären Zone (SGZ) direkt unter der neu entstandenen Körnerzellschicht an. (Altman und Das, 1965a,b; Altman und Bayer, 1990 a, b). Dort werden zeitlebens neue Körnerzellen produziert. Sie bilden mit ihren Axonen den Moosfasertrakt, eine Verbindung zu den Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippokampus und einen Dendritenbaum in der Molekularschicht.

Diese ungewöhnliche Art der Entwicklung des Gyrus Dentatus benötigt wahrscheinlich einzigartige Strategien um die proliferative Kapazität und um undifferenzierte Stadien der dentalen Vorläuferzellen aufrecht zu erhalten. (Entwicklung bis zur Geburt s. Abb. 1.10.)

1.4.1 Emx2 in der Gyrus Dentatus Entwicklung

Die Dynamik der Körnerzellbevölkerung des Gyrus Dentatus und ihre Möglichkeiten zur Regeneration betonen die Wichtigkeit der Faktoren, die diesen Prozess regulieren. Emx2 wird in diesen Zellen in allen Entwicklungsphasen exprimiert (Pellegrini et al., 1996)

Im Nervensystem wird Emx2 im frühen dorso-medialen Telenzephalon in proliferierenden Neuroblasten exprimiert. Am Embryonaltag 14.5 der Maus können starke Hybridisierungssignale im primären proliferativen Neuroepithelium, in der subventrikulären Zone und im Migrationsweg des Gyrus Dentatus nachgewiesen werden. Einen Tag später gibt es Signale vom Neuroepithel bis zur Marginalzone in der die Cajal-Retzius-Zellen liegen (Cecchi und Boncinelli, 2000). Im Stadium E18.5 sind zusätzlich die tertiäre Matrix, die Körnerzellschicht und die Marginalzone markiert (Pellegrini et al., 1996). Am fünften Tag nach der Geburt (P5) beschränkt sich die Expression auf vereinzelte Zellen in der Körnerzellschicht und der subgranulären Schicht (Cecchi und Boncinelli, 2000).

In der Emx2-Mutante sind zwar das Neuroepithelium des Gyrus Dentatus, die subventrikuläre Zone und der Migrationsweg angelegt, es fehlt aber ein morphologisch erkennbarer Gyrus Dentatus (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997) (Abb.1.11). Um einen Einblick vom histologischen Charakter der hippokampalen Formation im Wildtyp und in der Emx2-Mutante zu bekommen, wurden Gewebeschnitte beider Genotypen des Stadiums E18.5 einer Nissl-Färbung unterzogen (Abb. 1.11).

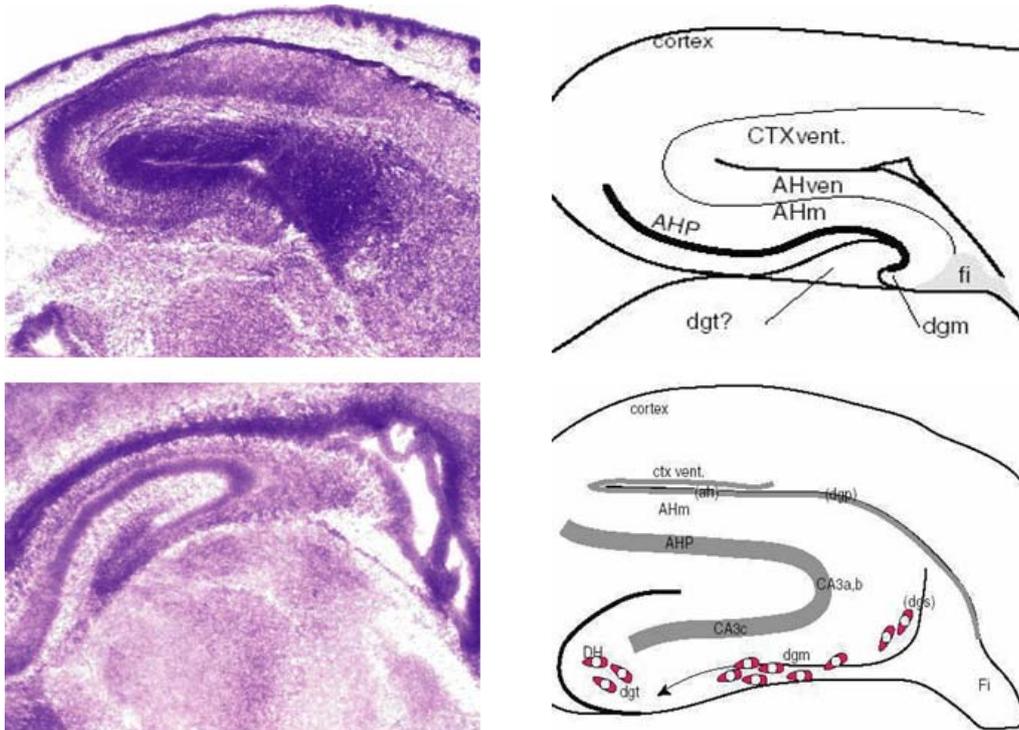


Abbildung 1.11: Nissl-Färbung und Diagramm der hippocampalen Formation im Wildtyp und in der Emx2-Mutante am Embryonaltag 18.5.

In den oberen Abbildungen ist die Mutante dargestellt, in den unteren Abbildungen der Wildtyp.

Oben: Die Hippokampus-Region der Emx2-Mutante. Der Gyrus Dentatus entwickelt sich bis zum Anfang der Migrationsstraße (dgm). Eine tertiäre Matrix (dgt?) wird nicht mehr gebildet. Das Neuroepithelium (Ahven) ist dicker als im Wildtyp. Der eigentliche Hippokampus (Hippokampus proper) ist vorhanden (AHm und AHP).

Unten: Die Hippokampus-Region im Wildtyp. Der Gyrus Dentatus ist deutlich zu erkennen. Alle Subregionen sind angelegt.

Abkürzungen: CTXvent., ventrikuläre Schicht im Neokortex; AHven, ventrikuläre Schicht der hippocampalen Formation; AHm, Migrationsweg zu Ammons Horn; AHP, Ammons Horn oder Cornu Ammonis; fi, Fimbria; dgm, Migrationsstraße; dgt?, morphologisch nicht vorhandene tertiäre Matrix; dgs, sekundäre Matrix, CA, Cornu Ammonis; dgt, tertiäre Matrix; DH, Hilusregion

Emx2 ist für ein normales Wachstum und die Reifung des Hippokampus und des angrenzenden medialen Neokortex, aber nicht für die Spezifizierung von Zellen der verschiedenen hippocampalen Segmente verantwortlich. Dies betrifft auch die Region des Gyrus Dentatus. Die Gyrus Dentatus-Zellen sind entsprechend ihrer anatomischen Lage in der Mutante vorhanden, formen aber keinen Gyrus Dentatus (Tole et al., 1997, 2000).

Da im frühen Embryo der Bereich, der zum Gyrus Dentatus wird, schon bestimmt ist, ist der Transkriptionsfaktor Emx2 für das Wachstum und die Reifung dieses Bereiches essenziell. Emx2 wirkt in einer Art Schaltung zwischen zwei verschiedenen Zuständen des Gyrus Dentatus: Bestimmung (Determination) und Differenzierung. Emx2 ist zwar für die Determination, aber nicht für die Differenzierung entbehrlich.

Bisher ist wenig über Interaktionspartner von Emx2 bekannt. Gli3 ist der einzige direkte, stromaufwärts gelegene positive Regulator von Emx2, der durch Bindung an regulatorische

Sequenzen an der Kontrolle der dorsalen Telenzephalonenentwicklung beteiligt ist (Theil et al., 1999). Gene, die stromabwärts von Emx2 liegen, werden vermutlich durch die Homeodomäne von Emx2 in ihrer Transkription reguliert. In *Drosophila* sind *wingless* und *engrailed* Ziele von *ems*. *Ems* ist das *Drosophila*-Homologe von Emx2 (Royet und Finkelstein, 1995). In der Maus ist das einzige *in vitro* identifizierte Zielgen Wnt-1 (Iler et al., 1995), eines der frühesten Signalgene, die mit der Bildung des Nervensystems assoziiert sind, und das für die Formierung des Mittelhirns benötigt wird. Wnt-1 ist ein direktes Zielgen von Emx2, dessen Transkription durch die negative Kontrolle von Emx2 unterdrückt wird (Cecchi, 2002).

Emx2 verfügt in der Entwicklung über eine Doppelrolle, eine generelle Funktion in der Arealisierung der Vorderhirnregionen und eine spezifischere Rolle in der Proliferation und/oder der Spezifizierung der Gyrus Dentatus-Vorläuferzellen im Archikortex (Pellegrini et al., 1996) (siehe auch Kapitel „Arealisierung“ und „Pax6 und Emx2“).

1.4.2 Rolle der bHLH-Transkriptionsfaktoren

Der Neokortex wird aus neuronalen Stammzellen gebildet. Diese haben das Potential, verschiedene Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu generieren. Neuroepitheliale Stammzellen produzieren intermediäre Vorläufer, die einem neuronalen oder glialen Schicksal folgen. Wenn eine dieser Vorläuferzellen die letzte Zellteilung durchläuft, beginnt sie sich zu differenzieren und wandert von der ventrikulären Schicht zu ihrem Bestimmungsort. Viele Vorläuferzellen in der ventrikulären Schicht des Telenzephalons sind schon aufgrund ihrer Position vor ihrer endgültigen Differenzierung determiniert. Das limitiert ihr Entwicklungs- und Proliferationspotential (Temple, 2001). Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass multipotente Vorläuferzellen, die an verschiedenen Positionen lokalisiert sind, verschiedene neuronale und gliale Zellarten generieren.

Die aufgrund ihres Geburtsortes schon vorspezifizierten migrierenden Neuronen nutzen einen bestimmten Migrationsmechanismus.

So werden z.B. pyramidale Neuronen des Kortex in der dorsalen ventrikulären Schicht geboren und migrieren entlang radialer Gliazellen. Gleichzeitig werden neokortikale Astrozyten in der germinalen Schicht des Neokortex geboren und migrieren lokal innerhalb dieser Struktur. Im Gegensatz dazu werden zwei andere neokortikale Zelltypen, GABAerge Interneurone und Oligodendrozyten in der germinalen Schicht des ventralen Telenzephalons geboren und machen eine lange Reise entlang tangentialer Migrationsstraßen, um ihre finale Position im Neokortex zu erreichen (Corbin et al., 2001;

Parnavelas, 2000; Tekki-Kessarlis et al., 2001, Abb.1.12). Auf molekularer Ebene werden diese Spezifizierungen durch bHLH-Transkriptionsfaktoren gesteuert.

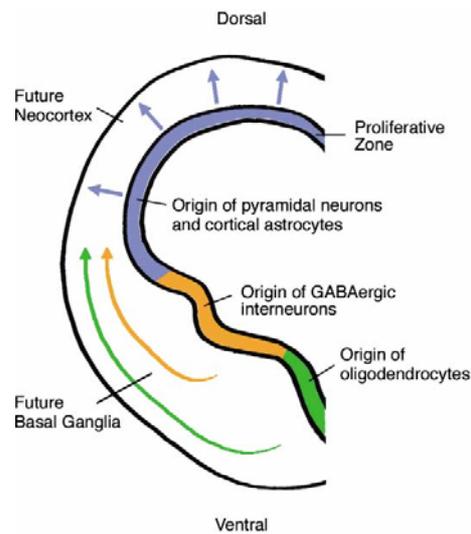


Abbildung 1.12: Diagramm des sich entwickelnden Telenzephalons. Dargestellt ist Ursprung verschiedener neuronaler Zellarten, die den Neokortex bilden. Pyramidale glutamaterge Neuronen und kortikale Astrozyten entstehen in der proliferativen Schicht des dorsalen Telenzephalons (blau). GABerge inhibitorische Interneurone werden in der proliferativen Schicht der ganglionischen Eminenzen geboren (orange). Oligodendrozyten entstehen aus Vorläuferzellen in der ventralsten Region des Telenzephalons (grün) (aus Ross et al., 2003).

Die Produktion neuronaler Vorläuferzellen durch das Neuroepithelium wird durch die Expression von Notch und seinem Liganden Delta initiiert. Die Expression dieser Gene setzt eine genetische Kaskade proneuraler (*Mash1*, *Ngn1*, *Ngn2*) und antineuraler (*Hes* und *Id*) Transkriptionsfaktoren, sowie neuronaler Differenzierungsgene (*NeuroD1*, *NeuroD2*) in Gang. Diese Gene gehören alle zu der *basic Helix-loop-Helix*-Familie (bHLH-Familie) (Cau et al., 1997, 2000; Perron et al., 1999; Torii et al., 1999; Cai et al., 2000; Bertrand et al., 2002; Schuurmans und Guillemot, 2002). Sie kontrollieren den zeitlichen Ablauf der Neurogenese.

Die HLH-Domäne besteht aus zwei amphipatischen α -Helizes mit einer dazwischenliegenden variablen Loop-Region. Hydrophobe Wechselwirkungen vermitteln die Dimerisierung zweier HLH-Domänen, wobei entweder Homo- oder Heterodimere gebildet werden (Ferre-D'Amare et al., 1993). Die 5' zur HLH-Domäne gelegene basische Region sorgt für die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen.

bHLH-Transkriptionsfaktoren sind immer als Dimer aktiv. Bildet ein proneuraler Faktor mit einem antineuralen Faktor ein Dimer, wird das Zielgen nicht transkribiert, da dem antineuralen Faktor z.B. die basische Region fehlt und so der gesamte Komplex nicht an die DNA binden kann. Wird die hohe Anzahl an reprimierenden und aktivierenden bHLH-

Transkriptionsfaktoren und die möglichen Kombinationen durch Heterodimerisierungen berücksichtigt, dann ergeben sich vielfältige Möglichkeiten einer Genregulation.

So werden z.B. Hes-Gene im Anschluß an eine Notchaktivierung hochreguliert und blockieren die Differenzierung der Vorläuferzellen in ein neuronales Stadium (Pleasure et al., 2000). Die proneurogenetischen bHLH-Gene werden in zwei Gruppen geteilt. Die Mitglieder der ersten Gruppe werden als neuronale Determinierungsgene bezeichnet und sind an der Einleitung des neuronalen Determinierungsprozesses beteiligt (z.B. Ngn1 und 2). Die zweite Gruppe umfasst neuronale Differenzierungsgene wie NeuroD1 und 2, Math2 und 3. Diese Gruppe reguliert spätere Ereignisse in der neuronalen Differenzierung. Pleasure und Kollegen (2000) stellten ein Modell einer sequentiellen Expression von Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des Gyrus Dentatus auf (Abb. 1.13).

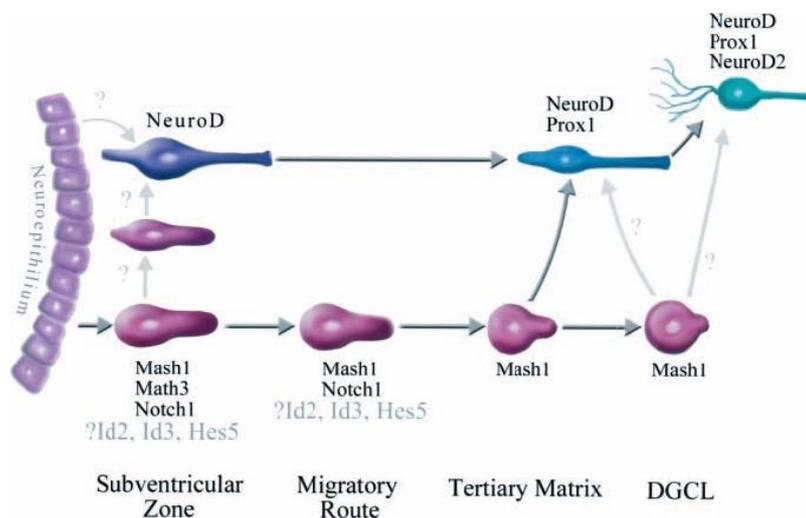


Abbildung 1.13: Model über die Abstammung der Gyrus Dentatus-Zellen. Mitotische Vorläuferzellen in der subventrikulären Zone exprimierten Mash1, Id3, Hes5 und Math3. Es ist bekannt, dass postmitotische Körnerzellen, die NeuroD1 exprimieren, ebenfalls in der subventrikulären Zone geboren werden (Miyata et al.,1999). Unreife NeuroD1-exprimierende Körnerzellen und mitotische Vorläuferzellen migrieren zur tertiären Matrix, wo die Vorläuferzellen auch weiterhin Mash1 exprimieren. Die unreifen Körnerzellen benötigen eine hohe Expression von Prox1. Im letzten Stadium, wenn sich Körnerzellschicht formiert (DGCL), ordnen sich Mash1 exprimierende Vorläuferzellen in der subgranulären Schicht und generieren Körnerzellen, die zur inneren Molekularschicht der Körnerzellschicht wandern (Pleasure et al., 200

2 Material und Methoden

2.1 Behandlung und Haltung der Versuchstiere

Sämtliche Arbeiten mit Tieren wurden entsprechend den Vorschriften des Bundes-Tierschutzgesetzes durchgeführt (BGB1 S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) and 8 (§119)). Zur Analyse von Expressionsmustern wurden $Sey^{-/-}$ - und $Emx2^{-/-}$ -Mutanten (Hill et al., 1991; Pellegrini et al. 1996) und Wildtypen der Stämme NRMI, Black6 und Agouti verwendet.

Die weiblichen heterozygoten Mäuse wurden über Nacht mit männlichen heterozygoten Mäusen verpaart. Am folgenden Tag wurde um 9.00 Uhr überprüft ob sich ein vaginaler Verschluss („Plug“) gebildet hatte. 12.00 Uhr des gleichen Tages wurde als Embryonaltag 0,5 (E0,5) angenommen. Am gewünschten Embryonaltag wurden die schwangeren Weibchen mit Isofuran (Baxter) anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Den Embryonen wurden Gewebeproben zur Genotypisierung (s.u) entnommen und in Tissue-TecTM OCT eingebettet.

2.2 Genotypisierung

Den $Emx2$ -Mäusen wurden ca. drei Wochen nach der Geburt bzw. direkt nach der Entnahme aus dem Uterus die Schwanzspitzen abgeschnitten. Die drei Wochen alten Mäuse wurden am Ohr markiert und entsprechend nummeriert. Jede Schwanzspitze wurde in ein gekennzeichnetes Eppendorfgesäß gegeben und mit 500 μ l Lysispuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl; nach dem Autoklavieren wurde 0,2% SDS zugegeben) versetzt. Vor der Inkubation ü.N bei 500 rpm und 56°C wurden 100 μ g/ml Proteinase K in den Lysispuffer pipettiert.

Nach Zugabe von 500 μ l Phenol/Chloroform wurden die Proben vorsichtig gemischt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 350 μ l des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Gesäß überführt und mit 500 μ l Isopropanol versetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 μ l 70%igem EtOH gewaschen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet 30 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in

200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH8,0) ü.N bei 500 rpm und 37°C gelöst.

Mit der so isolierten DNA wurde eine PCR durchgeführt. Es wurde das PCR-Kit der Firma GeneCraft mit Taq-Polymerase verwendet und jeweils ein Volumen für ca. 20 Proben ($V_T = 400 \mu\text{l}$) pipettiert:

MgCl ₂	16 µl
Puffer	40 µl
dNTP	8 µl
Primer	je 1 µl (es wurden drei Primer eingesetzt, um ko-Bande und wt-Bande gleichzeitig darzustellen)
Taq-Polymerase	2 µl
H ₂ O	331 µl

Zu je 20 µl wurde 1 µl Template DNA pipettiert.

Primer-Sequenzen: P1: 5' CAC GAG ACT AGT GAG ACG TGC TAC 3'
P2: 5' GAA CGA CAC AAG TCC CGA GAG TTT C 3'
P3: 5' CTC ATA TTG CCC TAA CAA AGC TGA GC 3'

PCR-Programm:

1. 94°C 4 min
2. 94°C 40 sec
3. 61°C 40 sec
4. 72°C 40 sec 30 Zyklen von Schritt 2-4
5. 72°C 10 min
6. 4°C ∞

Das PCR-Produkt wurde mit 2 µl 10 x Laufpuffer versetzt und auf einem Agarosegel aufgetragen. Die ko-Bande hat eine Größe von 450 bp und die wt-Bande erscheint bei 350 bp.

Die Pax6-Mäuse wurden nicht mittels PCR genotypisiert, da der Genotyp aufgrund des Phänotyps eindeutig nachgewiesen werden konnte. Homozygote Mäuse haben keine

Augen, während bei heterozygoten Mäusen Augenansätze zu erkennen sind, die sich aber deutlich vom Wildtyp abgrenzen lassen.

2.3 GST Pull Down

Der GST Pull Down wurde durchgeführt, um eine Interaktion zwischen Lis1 und RanBPM nachzuweisen.

2.3.1 Herstellung des Glutathion-Agarose-Konstrukts

Um ein Protein an Glutathion-Agarose zu binden und aufreinigen zu können, muss es an Glutathion-S-Transferase gebunden sein. Das wurde erreicht, indem das Protein in den Vektor pGex-5x-1 kloniert (siehe Klonierungen) und anschließend exprimiert wurde.

Für die Expression wurde eine Öse (\varnothing 2 mm) des entsprechenden Glycerolstocks in 600 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und ü.N. bei 200 rpm und 27°C geschüttelt. Nach der Zugabe von 0,1 mM IPTG wurde 2 h bei 200 rpm geschüttelt und 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 10 ml Lysispuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 300 mM NaCl; 4 mM Pefabloc; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,5% Tween 20; 100 mM Leupeptin; 100 mM Aprotinin) gelöst und mittels Ultraschall lysiert. Die Lösung wurde 10 min bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand mit der äquilibrierten Glutathion-Agarose versetzt und ü.N. bei 4°C rotiert.

Zur Äquilibration wurde die Glutathion-Agarose in 3M NaCl gelöst, so dass ein 50%iges Gemisch entstand. 500 μ l dieses Gemisches wurden anzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Glutathion-Agarose wurde 1 x mit ddH₂O und 3 x mit Lysispuffer (s.o) gewaschen.

Die ü.N. rotierten Proben wurden 2 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde 3 x mit 10 ml Lysispuffer gewaschen. Dazwischen erfolgte jedesmal eine Zentrifugation für 2 min bei 2000 x g und 4°C. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Niederschlag in 500 μ l Lysispuffer gelöst und bei 4°C gelagert.

Die Reinheit des entstandenen Proteins wurde anhand einer SDS-Gelelektrophorese überprüft. Das Gel lief bei 100 V, wurde 3 x 5 min in ddH₂O geschwenkt und 1/2 h mit *Coomassie Stain* (300 mg Coomassie G-250, 22,5 ml Perchlorsäure, 900 ml ddH₂O) gefärbt. Danach wurde solange mit Wasser gewaschen, bis der blaue Hintergrund herausgewaschen war.

2.3.1 Transkription und Translation

Die *in vitro*-transkription/Translation wurde mit Hilfe des *TNT Quick Coupled Transkription/Translation*-Systems von Promega durchgeführt. Mit Hilfe dieses Kits wurde Lis1 mit ^{35}S -Methionin markiert. Folgende Substanzen wurden zusammenpipettiert:

	mLis	mLis neg.	mLis pos.
TNT-Quick	23	23	23
S^{35} -Met	1,2	1,2	1,2
KCl (2,5 M)	0,3	0,3	0,3
DNA (400 ng)	1,1	1,1	1,1
H ₂ O	4,4	4,4	4,4

Tabelle 2.1: Pipettierschema der TNT-Quick-Reaktion. Alle Angaben in μl .

1,2 μl ^{35}S -Methionin entsprechen einem Wert von 0,555 mBq. Die Proben wurden 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit 130 μl Puffer A (67 mM HEPES, pH 7,5; 167 mM KCl; 8,3 mM MgCl_2 ; 0,3 mM EDTA; 1,67 mM DTT; 0,83% NP40; 7,5 ml H₂O; steril filtrieren; 83 μl 83 mM PMSF; 20 μl 100 mM Aprotinin; 20 μl 100mM Leupeptin) versetzt. Es wurden 20 μl Aliquots abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die äquilibrierte Gluthation-Agarose wurde mit Puffer A umgepuffert.

Die Produkte der TNT-Reaktion wurden mit 54 μl GST-RanBPM-Gluthation-Agarose bzw. 54 μl GST-Nudel-Gluthation-Agarose (Positivkontrolle) versetzt, während zu der Negativkontrolle 4 μl GST und 40 μl Gluthation-Agarose gegeben wurden. Die Proben rotierten ü.N. bei 4°C und wurden 1 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es wurden 30 μl vom Überstand abgenommen. Das Pellet wurde 3 x mit 500 μl Puffer A gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde 1 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der restliche Puffer mit einer G25-Kanüle abgezogen.

Das Pellet wurde in 30 μl Puffer A aufgenommen und mit 15 μl 3 x SB-Ladepuffer (20% Glycerin; 3% SDS; 10 mM EDTA; 0,05% Bromphenolblau; 13% β -Mercaptoethanol) versetzt. Die oben abgenommenen Überstände wurden ebenfalls mit 15 μl 3 x SB versetzt. Die Proben wurden 3 min bei 100°C denaturiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Marker diente *Benchmark™ Prestained Protein Ladder*-Marker. Die Gele liefen bei 100 V. Nach dem Lauf wurden die 30 min in Fixer Solution (10% MeOH; 10% Essigsäure) und 30 min in Amplifylösung (Amersham) geschwenkt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

2.4 Yeast two Hybrid-Assay

2.4.1 Herstellung von kompetenten Hefezellen

Der PJ69-4A-Glycerolstock wurde auf einer YPDA-Platte (20 g Peptone; 10 g Hefe; 20 g Agar; 100 mg Adenin; ad ddH₂O auf 1 L; pH 5.8, autoklavieren, 2% Glucose) ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Es wurden sechs PJ69-4A Kolonien in 1 ml YPDA-Medium/20% Glucose (wie YPDA-Platte ohne Agar) gelöst. Die gelösten Kolonien wurden in 50 ml YPDA-Medium/20% Glucose gegeben und ü.N. bei 30°C mit 250 rpm im Schüttler inkubiert. 5 ml der Übernachtskultur wurden in 300 ml YPDA-Medium gelöst. Gemessen wurde die OD bei 600 nm. Die folgende Inkubation wurde bei 30°C mit 250 rpm durchgeführt, bis die OD bei $0,5 \pm 0,1$ lag. Das Zellmedium wurde in 50 ml *Falcons* überführt und 5 min bei RT mit 1200 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in je 5 ml Wasser resuspendiert, gevortext und in ein gemeinsames *Falcon* gebracht. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei RT mit 1200 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und in der Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in 1,5 ml frischen, sterilen 1 x TE/LiAc-Puffer(1 ml 10 x TE; 1 ml 1 M LiAc; 8 ml ddH₂O; steril filtrieren mit Sartorius Minisart-plus 0,45 µm) aufgenommen.

2.4.2 Herstellung der Platten aus Minimalmedium

6,7 g *Yeast nitrogenbase w/o aminoacids*; 20 g Agar; 800 ml ddH₂O; 100 ml 10 x *dropout solution*, der ausgewählte Aminosäuren fehlen (enthält einen Grundstock an Aminosäuren, dem noch die Aminosäuren in 10 x Konzentration zugefügt werden, die für das Wachstum gebraucht werden. Aminosäuren, die von den verwendeten Plasmiden hergestellt werden sollen, wurden nicht zugefügt): Medium 1: Platten ohne Leucin und Tryptophan

Medium 2: Platten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin

Medium 3: Platten ohne Leucin, Tryptophan und Adenin

Zu den Medien 1 und 2 wurden je 100 mg Adenin zugegeben. Zu jedem der drei Medien wurden 2% Glucose zugegeben und der pH-Wert auf 5,8 eingestellt. Die Lösungen wurden mit ddH₂O auf 1000 ml aufgefüllt und 20 min bei 121°C autoklaviert.

2.4.3 Transformation der Vektoren in die Hefezellen

	Proben	
Ansatz 1	RanBPM in pAS 2.1	1µg
	LIS 1 in pACT 2	1µg
Ansatz 2	RanBPM in pAS 2.1	1µg
	pACT 2	1µg
Ansatz 3	LIS 1 in pACT 2	1µg
	pAS 2.1	1µg

Tabelle 2.2: Pipettierschema für die Ansätze des *Yeast-Two-Hybrid-Assays*

Alle 6 Ansätze wurden mit 9,2 µl Heringssperma-DNA versetzt und zu jedem Ansatz wurden 0,1 ml der kompetenten Hefezellen gegeben. Es wurden 0,6 ml einer sterilen PEG/LiAc-Lösung (8 ml 50% PEG 4000; 1 ml 10x TE; 1 ml 10x LiAc) zupipettiert und gevortext. Anschließend wurden die Ansätze 30 min bei 30°C mit 250 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von 70 µl DMSO wurden die Proben vorsichtig gemischt. Zur Hitzeinkubation wurden die Ansätze 15 min bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert und dann 2 min auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation für 5 sec bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in je 0,5 ml sterilem 1 x TE-Puffer (10x: 0,1 M Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 7,5, autoklaviert) resuspendiert. Je 160 µl wurden ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tage bei 30°C inkubiert.

2.5 Zellbiologie

2.5.1 Zellen passagieren und zählen

Die Zellen wurden passagiert, indem altes Medium abgenommen und der Zellteppich mit 10 ml warmem PBS (Gibco) gewaschen wurde. Es wurden 2,5 ml Trypsin/EDTA (Gibco) auf die Zellen gegeben und einige Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vollständig vom Boden der Flasche gelöst hatten. Zur Inaktivierung des Zellgiftes Trypsin wurden 10 ml warmes DMEM-Glutamax auf die Zellen gegeben.

Um die Zellen zu zählen, wurde 1 ml der Zellsuspension entnommen und ein Aliquot auf eine Neubauerkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen im Gitter der Neubauerkammer gezählt. Verwendete Zelllinien:

Cos-7 Zellen: Nierenzelllinie des *Cercopithecus aethiops* (grüner, afrikanischer Affe)

U-2 OS: humane Tumorzelllinie aus Knochen (Osteosarcoma)

Die Zelllinien wurden im Brutschrank in wasserbefeuchteter 5% CO₂-Atmosphäre und bei 37°C kultiviert. Beide Zelllinien wurde von ATCC (*American Type Culture Collection*) bezogen.

2.5.2 Transfektion und Kotransfektion

Transfektionen wurden mit dem Lipofektamin-Kit von *Life Technologies* durchgeführt. Die zu transfizierenden Proteine wurden mittels der Vektoren pCMV (Stratagene) oder pEGFP (Clontech) in die Zellen eingeführt und exprimiert, d.h. die Proteine verfügten entweder über einen Anhang, der einige Aminosäuren lang ist (ein sogenanntes *Flag Tag*) oder über GFP (Grün fluoreszierendes Protein).

1. Transfektion für Immunopräzipitationen

24 h vor einer Transfektion wurden die Zellen so gesplittet, dass sie am nächsten Tag zu 80% konfluent waren. Dazu wurden $1,8 \times 10^6$ Zellen in 10 ml DMEM Glutamax (Gibco; zu 500 ml wurden 10 ml 1M HEPES und 50 ml FBS zugegeben) in einer 100 mm² Platte ausplattiert. Gemäß der Angaben von *Life Technologies* wurden folgende Mengen für die Transfektion auf einer 100 mm² Platte kalkuliert:

11,2 µg DNA, 50 µl Plus-Reagenz und 42 µl Lipofektamin

Folgende Transfektionslösung wurde pipettiert:

je 11,2 µg Protein

2100 µl DMEM Glutamax ohne FBS

50 µl Plus-Reagenz

15 min Inkubation bei RT

+ 42 µl Lipofektamine in 1000 µl DMEM Glutamax ohne FBS

15 min Inkubation bei RT

Während der Inkubation wurde den ü.N. gewachsenen Zellen das Medium abgenommen. Sie wurden mit 10 ml PBS gewaschen. Die Transfektionslösung wurde mit DMEM Glutamax (ohne FBS) auf ein Volumen von 6,5 ml gebracht und auf die Zellen gegeben. Nach 4-5 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgezogen, frisches DMEM Glutamax mit 10% FBS auf die Zellen gegeben und 24 h bei 37°C inkubiert.

2. Transfektion für Immunofluoreszenzversuche

Zellen für Immunofluoreszenzversuche wurden nach der gleichen Methode transfiziert wie die Zellen für Immunopräzipitationen. Es wurden aber andere Konzentrationen und Volumina eingesetzt, weil mit kleineren Platten und auf runden Deckgläschen (\varnothing 10 mm) gearbeitet wurden. 24 h vor der Transfektion wurden 5×10^4 Zellen in 500 μ l DMEM Glutamax (s.o) ausplattiert. Gemäß der Angaben von *Life Technologies* wurden folgende Mengen für die Transfektion kalkuliert:

0,4 μ g DNA, 4 μ l Plus-Reagenz und 1 μ l Lipofektamin

Folgende Transfektionslösung wurde pipettiert:

je 0,4 μ g Protein

25 μ l DMEM Glutamax ohne FBS

4 μ l *PlusReagent*

15 min Inkubation bei RT

1 μ l Lipofektamine in 25 μ l DMEM Glutamax ohne FBS

15 min Inkubation bei RT

Während der Inkubation wurde den ü.N. gewachsenen Zellen das Medium abgenommen. Sie wurden mit 500 μ l PBS gewaschen. Die Transfektionslösung wurde mit DMEM Glutamax (ohne FBS) auf ein Volumen von 500 μ l gebracht und auf die Zellen gegeben. Nach 4-5 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgezogen, frisches DMEM Glutamax mit 10% FBS auf die Zellen gegeben und 24 h bei 37°C inkubiert.

2.5.3 Ernten der Zellen

Die Zellen wurden geerntet, um anschließend eine Immunopräzipitation durchzuführen. Das Medium wurde abgenommen und in ein 50 ml *Falcon* überführt. Der Zelleppich wurde dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Das PBS mit abgelösten Zellen wurden ebenfalls in das *Falcon* überführt. Während des Waschvorgangs standen die Platten auf Eis.

Das Medium und das PBS wurden 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 10 ml kaltem PBS resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Die Platten wurden mit 200 μ l Lysispuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 150mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 0,1% Tween 20; 10% Glycerol; 10 mM β -Glycerophosphat; 1 mM Natriumorthovanadat; Vor Gebrauch dazugeben: 100 mM Aprotinin; 100 mM Leupeptin; 100 mM PMSF) versetzt. Mit Hilfe eines weichen Spatels wurden die Zellen von der Plattenoberfläche gelöst.

Der Lysispuffer mit den Zellen wurde verwendet um das Zellpellet aus den Waschschritten zu resuspendieren. Zur Zellyse wurden die Proben 1 h auf Eis inkubiert und alle 10 min gevortext. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde für in der Immunopräzipitation eingesetzt.

2.5.4 Fixieren von Zellen

Für Immunofluoreszenzversuche wurden die Zellen nicht geerntet, sondern fixiert. Das Medium wurde abgenommen und 3 x 5 min mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 300 µl eiskaltem Methanol auf den Deckgläschen fixiert und 10 min bei -20°C inkubiert.

2.6 Immunopräzipitation

Bei der Immunopräzipitation wurde der in der Zellkultur gewonnene Überstand mit einem Antikörper versetzt. Vorher wurden für Kontrollen 30 µl des Überstandes entnommen, mit 15 µl 3 x SB Lade-Puffer versetzt, 3 min bei 100°C aufgeköcht und bei -20°C eingefroren. Als Antikörper für die Präzipitation wurden eingesetzt:

Maus α-GFP monoklonaler Antikörper (Boehringer)

Kanninchen α-Flag polyklonaler Antikörper (Sigma)

Kanninchen α-GFP polyklonaler Antikörper (Sigma)

Maus α-Flag monoklonal Antikörper (Sigma)

Alle in der Transfektion eingesetzten Proteine verfügten über einen Anhang (*Flag Tag* oder GFP, s. 3.5.2), an den diese Antikörper spezifisch binden konnten.

Der Überstand rotierte mit dem Antikörper ü.N. bei 4°C. Der Protein-Antikörper-Komplex (Immunokomplex) wurde mittels Protein-G-Agarose präzipitiert. Die G-Agarose wurde vorher durch viermaliges Waschen mit 500 µl Lysispuffer (s.o) umgepuffert. Es entstand ein 50%iges Gemisch (Puffer:G-Agarose 50:50). Davon wurden 40 µl zu dem Überstand gegeben und 1 h bei 4°C rotiert. Nach der Kopplung der G-Agarose an den Immunokomplex wurde 1 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Von dem Überstand wurden wie oben 30 µl abgenommen, mit Puffer versetzt und aufgeköcht, der restliche Überstand wurde verworfen. Das Immunpräzipitat wurde viermal mit 500 µl Lysiypuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurde der restliche Puffer mit Hilfe einer G25-Kanüle abgezogen, das trockene Immunopräzipitat in 40 µl 1 x SB-Lade Puffer aufgenommen (3 x SB-Lade-Puffer wurde 1:3 mit Lysispuffer verdünnt) und 3 min

gekocht. Anschließend wurde das Immunpräzipitat und die beiden Überstände (s.o) auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.6.1 SDS-PAGE

Das SDS-Gel besteht aus einem 10%igem Trenngel und einem 4%igem Sammelgel hergestellt. Das Sammelgel besteht aus folgenden Komponenten:

H ₂ O	6,3 ml
0,5 M Tris, pH6,8; 0,4% SDS	2,5 ml
40% Bis-/Acrylamid	1,3 ml
APS 10 %	100 µl
TEMED	16 µl

Das Trenngel wurde aus folgenden Komponenten hergestellt:

H ₂ O	6,13 ml
50% Glycerol	260 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS	3,25 ml
40% Bis-/Acrylamid	3,25 ml
APS 10 %	100 µl
TEMED	10 µl

Die Gele liefen bei 100 V in Laufpuffer (0,025 M Tris-Glycin, pH 8,9; 0,1% SDS).

2.6.2 Western Blot

Im Western Blot wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) geblottet. Die Membran wurde 5 sec in Methanol und anschließend 5 min in Transferpuffer (10 x: 105 g Glycine; 33.5 g Tris; 1 x: 100 ml 10 x Transferpuffer; 200 ml Methanol, auf 1 l aufgefüllt) geschwenkt. Geblottet wurde 1 h bei 100 V in Transferpuffer. Während des Blottens wurde der Puffer gerührt und mit Eis gekühlt.

2.6.3 Immunoblotting

Nach dem Western Blot wurde die Membran 1 h in Block-Lösung (5% Milchpulver in TBS/Tween) geschwenkt, 2 x 10 min mit TBS/Tween (100 ml 10 x TBS; 1 ml Tween 20) gewaschen und mit einem Primärantikörper für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Nachdem sie 6 x 5 min mit TBS/Tween gewaschen wurde, wurde die Membran für 1 h mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten sekundären Antikörper inkubiert.

In der folgenden Tabelle wurde zusammengestellt, mit welchem Antikörper der Immunkomplex präzipitiert wurde und welche Antikörper dann als Primär- und Sekundärantikörper verwendet wurden.

IPP	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Maus α -GFP	Kaninchen α -Flag (1:250 in TBS/BSA-Lösung)	α -KaninchenIgG-HRP
Kaninchen α -Flag	Maus α -GFP (1:1000 in TBS/BSA-Lösung)	α -MausIgG-HRP
Maus α -Flag	Kaninchen α -GFP (1:1000 in TBS/BSA-Lösung)	α -KaninchenIgG-HRP
Kaninchen α -GFP	Maus α -Flag (1:500 in TBS/BSA-Lösung)	α -MausIgG-HRP

Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper nach den verschiedenen Immunoprecipitationen. Beim Sekundärantikörper handelt es sich um ein Antikörper-Enzym-Konjugat von Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG). Es wurde 1:20000 in Block-Lösung verdünnt. Alle anderen Antikörper stammen von Sigma.

Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran 6 x 5 min mit TBS/Tween gewaschen und mit 2 ml des Lumineszenz-Kits von Pierce 5 min inkubiert. Anschließend wurde mit der Membran ein Film exponiert.

2.7 Immunofluoreszenz

Die fixierten Zellen wurden 3 x 5 min in PBS/1%NGS gewaschen und mit einem Primärantikörper 1 h bei RT inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte von 3 x 5 min in PBS/1%NGS und eine Inkubation der Zellen mit einem Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Die Zellen wurden 4 x 5 min in PBS gewaschen, 2 min mit Bisbenzimid (Chromatin-Färbung 1:5000) inkubiert, 3 x in PBS gewaschen und 1 x in Wasser. Anschließend wurden die Zellen mit Vectashield H-1000 (Vector-Laboratories, Inc.) eingedeckelt.

Transfizierte Proteine	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Flag-DCX	α -Flag Kaninchen (1:170)	Texas Rot Kaninchen (1:100)
Flag-NeuII	α -Flag Kaninchen	Texas Rot Kaninchen
Flag-R303X	α -Flag Kaninchen	Texas Rot Kaninchen
GFP-DCX	-	-
GFP-NeuII	-	-
Flag-NeuII GFP-DCX	α -Flag Kaninchen -	Texas Rot Kaninchen -
Flag-R303X GFP-NeuII	α -Flag Kaninchen -	Texas Rot Kaninchen -
Flag-DCX GFP-NeuII	α -Flag Kaninchen -	Texas Rot Kaninchen -
Flag-NeuII	α -Flag Kaninchen α -Aktin Maus (1:200)	Fitc Kaninchen (1:100) Texas Rot Maus (1:100)
GFP-NeuII	- α -Aktin Maus	- Texas Rot Maus
GFP-DCX	- α -Aktin Maus	- Texas Rot Maus
Flag-DCX	α -Flag Kaninchen α -Aktin Maus	Fitc Kaninchen Texas Rot Maus

Tabelle 2.4: Durchgeführte Transfektionen und verwendete Antikörper (alle Sigma) mit Verdünnungen.

2.8 Klonierungen

Folgende Klonierungen wurden während der Doktorarbeit durchgeführt:

Konstrukt	Primer für RT-PCR Immer 5' - 3'	Restriktions- enzyme
NeurabinII/p CMV	F: CCC CCA CAT ATG ATG AAG ACG GAG CCT CGG R: GGT AGG GTC GAC GTG AGG ATT GAG GAC AGG	SalI/HindIII
NeurabinII /pEGFP	F: CCC CCA CAT ATG ATG AAG ACG GAG CCT CGG R: GGT AGG GTC GAC GTG AGG ATT GAG GAC AGG	SalI/HindIII
DCX/ pCMV	Umklonierung s.3.8.1.	s.3.8.1

DCX/ pEGFP	Umklonierung s.3.8.1.	s.3.8.1
RanBPM/ pGex-5x-1	F: AGGTGGAAGCTTATGTCCGGGCAGCCGCCG R: TCCACCGTCGACCTAATGTAGGTAGTCTTCGACTGTGGC	SalI/XhoI
RanBPM /pAS2.1	F: AGGTGGAAGCTTATGTCCGGGCAGCCGCCG R: TCCACCGTCGACCTAATGTAGGTAGTCTTCGACTGTGGC	SalI/HindIII
RanBPM/ pCMV	F: AGGTGGAAGCTTATGTCCGGGCAGCCGCCG R: TCCACCGTCGACCTAATGTAGGTAGTCTTCGACTGTGGC	SalI/HindIII
Lis1/pACT2	F: CTTGCACATCAAAGCAGACAATA R: CTGGCTTCCTGTTTCAGCAGATA	XmaI
Lis1/ pEGFP	F: CTTGCACATCAAAGCAGACAATA R: CTGGCTTCCTGTTTCAGCAGATA	SalI/BamHI
Nudel/ pCMV	F: GCATCCCGCAAATCTTATGTTCC R: CACTGAAGATGCTTGGCAGAA	EcoRI/NotI

Tabelle 2.5: Konstrukte, die während der Doktorarbeit hergestellt wurden. Dargestellt sind die Primersequenzen mit denen die RT-PCR durchgeführt wurde und die Restriktionsenzyme (NEB), die benutzt wurden um den Zielvektor zu schneiden.

2.8.1 Restriktionsverdau

Für Umklonierungen wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert (20µl Ansatz):

Je 1 µl der entsprechenden Restriktionsenzyme

2 µl des dazugehörigen Puffers,

x µl DNA in verschiedenen Konzentrationen,

2 µl 10 x BSA, wenn es von NEB empfohlen wurde und

y µl ddH₂O, mit dem auf 20 µl Volumen aufgefüllt wurde.

Herausschneiden des Fragments aus altem Vektor	Restriktionsenzyme	Puffer	BSA 10 x
DC aus pBS	Pst 1, Hind 3	P 2	-
DC aus pBS	Pst 1, Kpn 1	P 1	ja

Tabelle 2.6: Pipettierschema für das Herausschneiden der Fragmente aus den Vektoren

Schneiden des Zielvektors	Restriktionsenzyme	Puffer	BSA 10 x
DC in pCMV	Pst 1, Hind 3	P 2	-
DC in pEGFP	Pst 1, Kpn 1	P 1	ja

Tabelle 2.7: Pipettierschemata für das Schneiden der Zielvektoren

Die Proben wurden 2 h bei 37°C verdaut.

Dephosphorylierung des Vektors : Zu dem 20 µl-Verdau wurden 0,5 µl CIP, 5 µl Puffer 3 und 25 µl H₂O zugegeben, ½ h bei 37°C inkubiert, nochmals 0,5 µl CIP zupipettiert und ½ h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels aufgereinigt.

2.8.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarosegele gegossen. Die Agarose wurde durch kurzes Aufkochen in 1 x TAE-Puffer (50 x (1L): 242 g Tris base; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0), welcher auch als Laufpuffer diente, gelöst. In die noch flüssige Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid gegeben (1% Stocklösung: verdünnt 1:40000). Das Gel polymerisierte bei RT. Die Proben für die Auftragung wurden mit 6 x Lade-Puffer (25% (w/v) Bromphenolblau; 25% (w/v) Xylen Cyanol; 30% (w/v) Glycerin versetzt. Als Marker diente ein 1 kb DNA *Ladder* Marker von NEB. Die Gele liefen bei 100 V.

2.8.3 Gelextraktion

Mit dem *QiaQuick Gel Extraction Kit* (Qiagen) kann DNA in der Größe von 70 bp bis 10 kb aus Agarosegelen extrahiert werden. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben.

2.8.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Absorption der aufgereinigten DNA in Wasser wurde über ein Spektrum von 220-320 nm gemessen. Dabei tritt der höchste Wert beim Absorptions-Maximum der DNA bei 260 nm auf. Bei einer Absorption bei 260 nm ist der Wert 1 gleichzusetzen mit 50 µg/ml (bei doppelsträngiger DNA). Daher muss der gemessene Wert mit 50 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Bei RNA wurde der Wert 1 gleichgesetzt mit 40 µg/ml.

2.8.5 Ligationskalkulation

Bei den Ligationen wurden 50 ng Vektor eingesetzt. Um die entsprechende Menge Insert zu ermitteln, die bei einem Verhältnis von Insert zu Vektor von 3: 1 benötigt wird, wurde

die Menge des Vektors (50 ng) mit der Größe des Inserts (bp) multipliziert und durch die Größe des Vektors (bp) dividiert. Das Ergebnis wurde dann mit drei multipliziert.

$$X \text{ ng}_{\text{insert}} = 50 \text{ ng}_{\text{vektor}} \times \text{Größe Insert (bp)} / \text{Größe Vektor (bp)}$$

$X \text{ ng} \times 3 = \text{Menge Insert, die eingesetzt werden muss}$

2.8.6 Ligation

Die Ligationen wurden mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* von Roche durchgeführt oder ü.N. bei 16°C.

1. Ligation mit *Rapid DNA Ligation Kit* von Roche: Diese Ligation wurde laut Herstellerangaben durchgeführt
2. Ligation ü.N. bei 16°C: Es wurden folgende Ansätze pipettiert:

Reagenz	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
Vektor	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Insert	-	2 µl	3 µl	5 µl
10 x DNA Ligasepuffer	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
T4 DNA-Ligase	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
ddH ₂ O	6,5 µl	4,5 µl	3,5 µl	1,5 µl

Tabelle 2.8: Pipettierschema der ü.N.Ligation

Die Proben wurden gevortext und anzentrifugiert. Die Inkubation erfolgte 1 ½ h bei RT und anschließend ü.N. bei 16°C. 3 µl der Ligation wurden in der Transformation eingesetzt.

2.8.7 Transformation

Ultrakompetente Zellen (*XL2-Blue Strain/Stratagene*) wurden auf Eis aufgetaut und leicht gemixt. Pro Probe/Negativ-Kontrolle wurden 50 µl der Bakterienzellen verwendet und in 15 ml *Falcons* pipettiert. Es wurde 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Die Proben wurden 10 min auf Eis inkubiert. Während der 10 min wurden die Proben alle 2 min geschüttelt. 3 µl des Ligationansatzes wurden in die *Falcons* pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 30 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Dann wurden 450 µl des auf 37°C vorgewärmten SOC-Mediums (SOC-Medium (100 ml): 98 ml SOB-Medium; 2 ml 20% Glucose, steril filtrieren; SOB-Medium (1 L): 20 g

Trypton; 5 g Hefe; 0,5 g NaCl, autoklavieren; 10 ml 1 M MgCl₂; 10 ml 1 M MgSO₄; steril filtrieren) dazugegeben. Die Proben wurden zur Regeneration 1 h bei 37°C mit 230 rpm im Schüttler inkubiert. 200 µl der Bakterien wurden auf LB-Platten mit Kanamycin (30 µg/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Von den Platten wurden Kolonien gepickt und in 4 ml LB-Medium mit Kanamycin-Resistenz (10 µg/ml) gegeben. Es wurde ü.N. bei 37°C und 230 rpm im Schüttler inkubiert.

2.8.8 DNA-Minipräparation

Die DNA-Minipräparationen wurden mit einem Kit der Firma Macherey & Nagel durchgeführt. Die Präparationen wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.9 Analytischer Restriktionsverdau

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden folgende Komponenten pipettiert:

- 2 µl aus den Minipräparationen
- je 1 µl der Restriktionsenzyme
- 1 µl des entsprechenden Puffers (10x)
- 1 µl BSA (abhängig von den verwendeten Restriktionsenzymen)

Die Ansätze wurden mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt und 1-1 ½ h bei 37°C verdaut. Danach wurden die Ansätze mit 2 µl 6 x Ladepuffer (s.o) versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel lief bei 100 V. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und konnten dokumentiert werden.

2.8.10 Sequenzierung

Bei der DNA-Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977) gearbeitet. Dabei wurde ein *cycle sequencing* durchgeführt, so dass geringe DNA-Mengen für die Analyse ausreichten.

Die Sequenzierungen wurden mit dem *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix* für ABI PRISM™-Systeme durchgeführt. Um die Nukleotidsequenz zu ermitteln, mussten die DNA-Fragmente erst mittels PCR amplifiziert werden. Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet:

- 4 µl *Premix (Terminator Ready Reaction Mix)*
- 500 ng dsDNA
- 1,5 µl Primer (≈ 7,5 pmol)
- x µl H₂O ad 10 µl

PCR-Programm:

- | | | |
|------------|--------|---|
| 1. 96°C | 2 min | |
| 2. 96°C | 10 sec | |
| 3. 50-58°C | 5 sec | |
| 4. 60°C | 4 min | Die Schritte 2-4 werden 30 x wiederholt |
| 5. 4°C | ∞ | |

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in 80 µl ddH₂O aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, in denen 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) vorgelegt waren. Es wurden 250 µl 100%iges Ethanol (RT) dazupipettiert und 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden 250 µl 70%iges Ethanol (RT) zugegeben und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wurde wieder vorsichtig abgenommen und die Niederschläge 5 min unter Vakuum getrocknet. Die Niederschläge wurden in einem Gemisch aus 2,5 µl Formamid und 0,5 µl EDTA, pH 8,0 aufgenommen, gevortext und 2 min bei 90°C denaturiert. Dann konnten die Proben auf das Gel des Sequenzers aufgetragen werden.

2.8.11 Endotoxinfreie Maxipräparation

Um endotoxinfreie Maxipräparationen durchzuführen, wurde das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* von Qiagen verwendet. Alle Konstrukte, die in der Zellkultur eingesetzt wurden, wurden einer endotoxinfreien Maxipräparation unterzogen, um mögliche toxische Wirkungen auf die Zellen zu vermeiden. Die Maxipräparationen wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.9 Sondenherstellung

2.9.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der gesamten RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit durchgeführt. Die RNA wurde aus Mausgehirn (P0, P7) oder aus dem gesamten Embryo (E10.5, E14.5) isoliert. Für die anschließende DNA-Synthese wurde die RNA 1:1 (auf Basis der Masse) gemischt.

2.9.2 Reverse Transkription

Die cDNA wurde mit ThermoScript™ RT-PCR System von Invitrogen synthetisiert. Als Ansatz 1 wurde folgenden Chemikalien zusammenpipettiert:

Ansatz 1:

Oligo(dT)-Primer	1 µl
RNA	2 µl (1 µg/µl)
DEPC-H ₂ O	7 µl

Die Denaturierung der RNA und das Anlagern (Annealing) der Primer wurde durch Inkubation bei 65°C für 5 min durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Gefäß auf Eis gestellt und Ansatz 2 pipettiert:

Ansatz 2:

5x cDNA Synthese Puffer (vortex)	4 µl
0,1 M DTT	1 µl
RNase Out™ (40 U/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	1 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
ThermoScript™ RT (15 U/µl)	1 µl

Ansatz 2 wurde vorsichtig gevortext, mit Ansatz 1 gemischt und 60 min bei 50°C im Thermocycler inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurde sie für 5 min auf 85°C erhitzt. Es wurde 1 µl RnaseH pipettiert und 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA bei -80°C eingefroren und bei Bedarf weiter verwendet.

2.9.3 Primer Design

Ein Primer sollte einen GC-Gehalt zwischen 40% und 60% haben und am Ende, an dem sich die Polymerase anlagert, sollte ein GC oder ein CG vorhanden sein. In der Sequenz sollten sich keine Wiederholungen finden und keine Homologien zu anderen Genen im Genom, sowie keine Haarnadelstrukturen oder dimere Strukturen. Die Primer hatten eine durchschnittliche Länge von 24 bp. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55-60°C liegen. Die Schmelztemperatur wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_m = 69,3 + (0,41 \times \text{GC } \%) - 650/n$$

$$n = \text{Länge des Oligonukleotids}$$

An die spezifischen Primersequenzen (Vorwärts- und des Rückwärts-Primers) wurden jeweils am 5'-Ende RNA-Polymerase-Promotor Sequenzen angehängt. Dabei handelte es sich um die Sequenzen des T7- und des SP6-Promotors. An diese Sequenzen wurden

jeweils 3 zusätzliche Basen (unterstrichen) angehängt, damit die RNA-Polymerase besser binden konnte. Die Primer wurden von MWG Biotech synthetisiert.

T7: GCGTAATACGACTCACTATAGGG; SP6: GCGATTTAGGTGACACTATAG

2.9.4 PCR I

Die Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) hing von der spezifischen Sequenz des Primers ab, da die T7- und SP6-Sequenzen nicht an die cDNA binden. Um die optimale Anlagerungstemperatur festzulegen, wurde nur der spezifische Teil berücksichtigt und eine analytische Gradienten-PCR durchgeführt. Dafür wurden sechs verschiedene Temperaturen verwendet, die meistens zwischen 40°C und 60°C lagen.

Folgende Chemikalien wurden zusammenpipettiert.

H ₂ O	6,9-7,9 µl
10x Puffer	2 µl
Q (Enhancer)	4 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl
Primer for (5 pmol/µl)	2 µl
Primer rev (5 pmol/µl)	2 µl
Template (RT-product)	1-2 µl
Enzyme	0,1 µl

Taq-Polymerase: Qiagen (+ Puffer and Q als Enhancer), dNTPs: Roche (2 mM)

PCR Programm:

1. 94°C 2 min
2. 94°C 20 sec
3. 47-67°C 20 sec
4. 72°C 1,10 min Die Schritte 2-4 werden 34 x wiederholt
5. 72°C 9,00 min
6. 4°C ∞

Die so gewonnene cDNA wurde als Vorlage in der folgenden zweiten PCR (*Large Scale PCR*) verwendet.

2.9.5 PCR II (*Large Scale PCR*)

Das PCR-Produkt aus der ersten PCR wurde in der *Large Scale PCR* als Template eingesetzt. Das Volumen dieser präparativen PCR betrug 100 µl. Es wurden die gleichen Primer benutzt wie bei der Herstellung der cDNA, 5 µl auf einem Agarosegel analysiert und der Rest mit Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt. Eluiert wurde mit 25 µl Puffer

(10 mM Tris, pH 8,5). 3 µl wurden abgenommen, um die Konzentration und Reinheit der DNA zu bestimmen.

H ₂ O	37,5 µl
10x Puffer	10 µl
Q (Enhancer)	20 µl
dNTPs (2 mM)	10 µl
Primer for (5 pmol/µl)	10 µl
Primer rev (5 pmol/µl)	10 µl
Template (RT-product)	2 µl (20-50 ng)
Enzyme	0,5 µl

Die PCR lief mit dem gleichen Programm wie die erste PCR mit dem Unterschied, das diesmal natürlich kein Gradient verwendet wurde, sondern die Temperatur als Anlagerungstemperatur genommen wurde, die das beste Ergebnis geliefert hatte.

2.9.6 RNA-Transkription

Es wurde das RNA Transcription Kit von Stratagene benutzt. Als Templat diente 1 µg DNA, die auf die oben beschriebene Weise hergestellt wurde.

H ₂ O (depc)	Add to 20 µl
5 x transcription buffer	4 µl
10 mM rATP	2 µl
10 mM rCTP	2 µl
10 mM rGTP	2 µl
10 mM rUTP	1,3 µl
250 nmol DIG-UTP	0,7 µl
0,75 M DTT	2 µl
40 U/µl RNasin	1 µl
50 U/µl RNA Polymerase (T7 or SP6)	0,5 µl
Template	1 µg

Der Reaktions-Ansatz wurde bei 37°C für 150 min inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und die restliche DNA zu entfernen wurde 1 µl des folgenden Gemisches zugegeben.

H ₂ O (depc)	16,4 µl
MgCl ₂ (0,3 M)	1,6 µl
DNase (10 U/µl)	2,0 µl

Die Reaktion wurde für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit 72 µl NH₄Ac (4 M, autoklaviert) und 470 µl 100 %igem EtOH präzipitiert. Nach 30 min bei -80°C wurde 20 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde durch erneute Zentrifugation mit 640 µl 70%igem EtOH gewaschen. Anschließend wurde das Pellet 6 min im Vakuum getrocknet. Die präzipitierte RNA wurde unter 20-minütigem Schütteln bei 1150 rpm (RT) in 25 µl DEPC-H₂O gelöst. 2 µl RNA wurden auf einem Agarosegel analysiert und 2 µl wurden für die Konzentrationmessung im Photometer verwendet.

2.10 Kryo-Schnitte

Die Embryonen bzw. die Köpfe/Gehirne der Embryonen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, in OCT (Tissue TecTM) eingebettet und bei -80°C eingefroren und gelagert. Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die Blöcke einige Stunden vor dem Schneiden bei -20°C gelagert. Die Schichtdicke der Schnitte betrug 20-25 µm. Geschnitten wurde in einem Kryostaten der Fa. Leica bei einer durchschnittlichen Temperatur von ca. -17°C. Die Schnitte wurden mit Objektträger (Superfrost[®] Plus, Menzel-Gläser) aufgenommen und sofort fixiert.

Fixierung: Die Schnitte wurden 20 min in 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend 2 x 2 min mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Zur Acetylierung wurden die Schnitte 2 x 5 min in Triethanolamin mit 0,1 % Essigsäure getaucht. Die Essigsäure war zuvor unter Schutzgas (N₂) aliquotiert worden. Nach erneutem Waschen in PBS und 0,9%iger NaCl-Lösung wurden die Schnitte mit Hilfe einer Ethanolreihe in aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 2x 100% Ethanollösung, je 2 min) entwässert. Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet und bis zur Hybridisierung bei -80°C gelagert.

2.11 *In Situ* Hybridisierungen

Die *In Situ* Hybridisierungen wurden mit einem an unserem Institut entwickelten Roboter durchgeführt (Herzig et al., 2001). Dazu wurden die Gewebeschnitte in Durchflußkammern eingebaut, die in den Roboter gestellt wurden. So konnten bis zu 95 Objektträger pro Lauf hybridisiert werden.

2.11.1 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die in der Durchflußkammer eingespannten Gewebeschnitte wurden 7 x 6 min mit 0,6% Wasserstoffperoxid in Methanol behandelt. Anschließend wurden die Schnitte 8 x mit PBT (0,05% Tween-20 in PBS) gespült. Nach einer Behandlung von 2 x 4 min mit 0,05% Tween-20 in 0,2 N HCl-Lösung wurden die Schnitte 8 x mit PBT gewaschen und 2 x 7,5 min mit Proteinase K-Puffer behandelt. Die Proteinase K-Konzentration richtete sich nach der Beschaffenheit des behandelten Gewebes, bei embryonalem Gewebe z.B. 2 µg/ml; Proteinase K-Puffer: 0,05% Tween-20, 50 mM TRIS, 5 mM EDTA, pH 8.0.

Es folgte eine weitere Spülung 8 x mit PBT. Das Gewebe wurde 2 x 10 min mit 4%igem PFA in PBT fixiert und 8 x in PBT gewaschen. Nach der Präinkubation in Hybridisierungspuffer (Ambion, USA) für 50 min bei 60°C wurden die Schnitte 5 h bei 62°C in Hybridisierungspuffer inkubiert, der die RNA-Sonde in einer Konzentration von 150 ng/ml enthielt.

2.11.2 Posthybridisierung und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurde unspezifisch gebundene Sonde durch jeweils 5 Inkubationen für 6 min bei 65°C mit Waschlösungen steigender Stringenz entfernt:

1. 5 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat, pH 7),
2. 1 x SSC,
3. 0.5 x SSC und

4. 0.1 x SSC, jeweils in 50% Formamid. Danach wurden die Schnitte mit 250 µl NTE gewaschen (0,05% Tween 20, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,6), gefolgt von 2 Inkubationsschritten in 20 mM Iodoacetamid in NTE für je 5 min bei RT. Die Kammern wurden dreimal mit NTE gespült. Die Gewebeschnitte wurden dann 2 x 30 min in Hitze-inaktiviertem Schafserum in TNT-Puffer (0,05% Tween 20 in 100 mM Tris/150mM NaCl, pH 7,6) inkubiert. Anschließend wurden die Kammern 8 x mit NTE gespült. Nach zwei Inkubationen für 30 min in TNB Blocking-Puffer (0,05% Tween 20 in 100mM Tris/150mM NaCl, 0.5% Blocking-Reagenz, pH 7,6 (PerkinElmer Lifesciences, USA) wurden die Kammern 2 x 45 min mit Roche Anti-Dig-POD (verdünnt in TNB Blocking-Puffer; 1:500) versetzt. Anschließend wurden die Schnitte 8 x 5 min mit TNT-Lösung gewaschen. Die Kammern wurden 2 x 30 min bei RT mit Tyramid-Biotin in Tyramide Puffer versetzt (PerkinElmer Lifesciences). Nach 8 Waschschrinen in Maleat-Waschpuffer (MWB; 100 mM Maleat, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,5) wurden

die Schnitte 2 x 30 min mit Neutravidin-AP-Konjugat (Pierce) inkubiert (1:600 Verdünnung in MWB mit 1% Blocking-Reagenz (Roche)).

2.11.3 Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation und Färbereaktion

Ungebundener Antikörper wurde durch 8 Waschschritte mit MWB entfernt. Anschließend wurden die Schnitte durch zwei Inkubationen mit TNT und eine Inkubation mit TMN und 0,3 µg/ml Levamisol äquilibriert. Zur Färbung wurden die Kammern 3 mal 20 min lang mit Färbelösung versehen (BCIP, 1:250; NBT, 1:200 (beide Roche), 0.6 µg/ml Levamisol in TMN). Bei Bedarf wurde die Färbereaktion verlängert. Anschließend wurden sie 4 x mit 0.05% Tween-20 gespült, gefolgt von zwei Inkubationen in TNT. Die gefärbten Schnitte wurden mit 4%PFA/0.5%Glutardialdehyd in PBT für 20 min fixiert. Nach jeweils vier Waschschritten in PBT und Wasser wurden die Objektträger aus den Durchflusskammern entfernt und über Nacht getrocknet. Zur Analyse und Lagerung wurden sie mit wasserbasierendem Eindeckmedium eingedeckelt.

2.12 Nissl-Färbung

Mit Nissl-Färbungen wurden mit dem Kryostat angefertigte Gewebeschnitte gefärbt. Diese mussten 2 x 5 min in Xylol entfettet werden. Die Schnitte wurden der Reihe nach in folgenden Lösungen inkubiert:

2 x 5 min 100% Ethanol

2 x 5 min 95% Ethanol

5 min 70% Ethanol

5 min ddH₂O

10 min Färbelösung: 5 g Cresylechtviolett (Chroma1A396), 1 l Azetatpuffer (200 ml 2,7% Natriumazetat, 800 ml 1,2% Essigsäure, pH 4,0), ü.N rühren, anschließend filtrieren (113V Whatman Filter), bei 4°C aufbewahren

25 sec 70% Isopropanol/0,1% Essigsäure

5 min 70% Isopropanol

5 min 95% Isopropanol

5 min 100% Isopropanol

2 x 5 min Xylol

Die Schnitte wurden sofort mit Pertex eingedeckelt.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktion zwischen Neurabin II und Doublecortin

Diese Untersuchungen wurden ergänzend zu den in Tsukada et al. (2003) beschriebenen Interaktionstests durchgeführt. In der *In Situ*-Hybridisierung sollte gezeigt werden, dass Doublecortin und Neurabin II im Gewebe des gleichen Stadiums exprimiert werden, also potenziell interagieren könnten. Die Immunfluoreszenz sollte Aufschluß über eine zelluläre Kolokalisierung geben. Da es sich bei Neurabin II um ein aktinbindendes Protein und bei Doublecortin um ein mit Mikrotubuli assoziiertes Protein handelt, stellte sich die Frage nach der zellulären Lokalisation bei einer Interaktion.

3.1.1 Immunfluoreszenz

In diesen Experimenten wurden Neurabin II und Doublecortin sowohl einzeln als auch zusammen (Kotransfektion) transfiziert. Dabei zeigte Neurabin II ein typisches Aktinmuster (Abb. 3.1 B und D) und Doublecortin das für dieses Protein typische Mikrotubulimuster (Abb. 3.1 A und C).

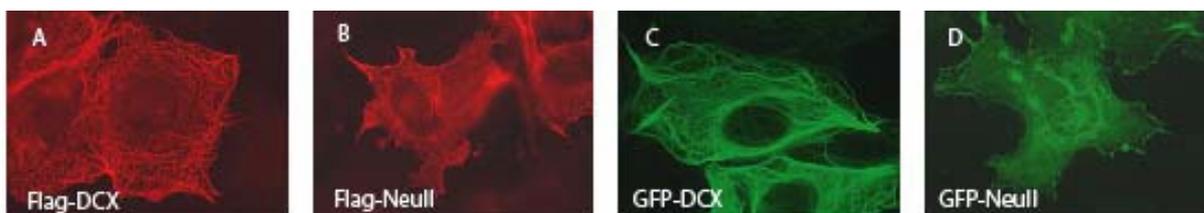


Abbildung 3.1: Einzeltransfektionen von Neurabin II und Doublecortin.

Da es sich bei dem Muster von Neurabin II tatsächlich um Aktinmuster handelt, wurde durch gleichzeitiges Anfärben von Aktin bestätigt (Abb. 3.2 A-F) und so eine Kolokalisierung nachgewiesen. Immunfluoreszenzversuche, in denen Doublecortin und Aktin mit Antikörpern sichtbar gemacht wurden, ergaben, dass diese beiden Proteine nicht kolokalisiert sind (Abb. 3.2 H-M).

Die Kotransfektionen von Doublecortin und Neurabin II zeigt Abb. 3.3. Die Abbildungen belegen, dass die beiden Proteine kolokalisiert sind. Die Vermutung, dass bei einer Kolokalisierung eher das Muster von Aktin statt des Mikrotubulimusters zu erkennen sei, konnte nicht bestätigt werden.

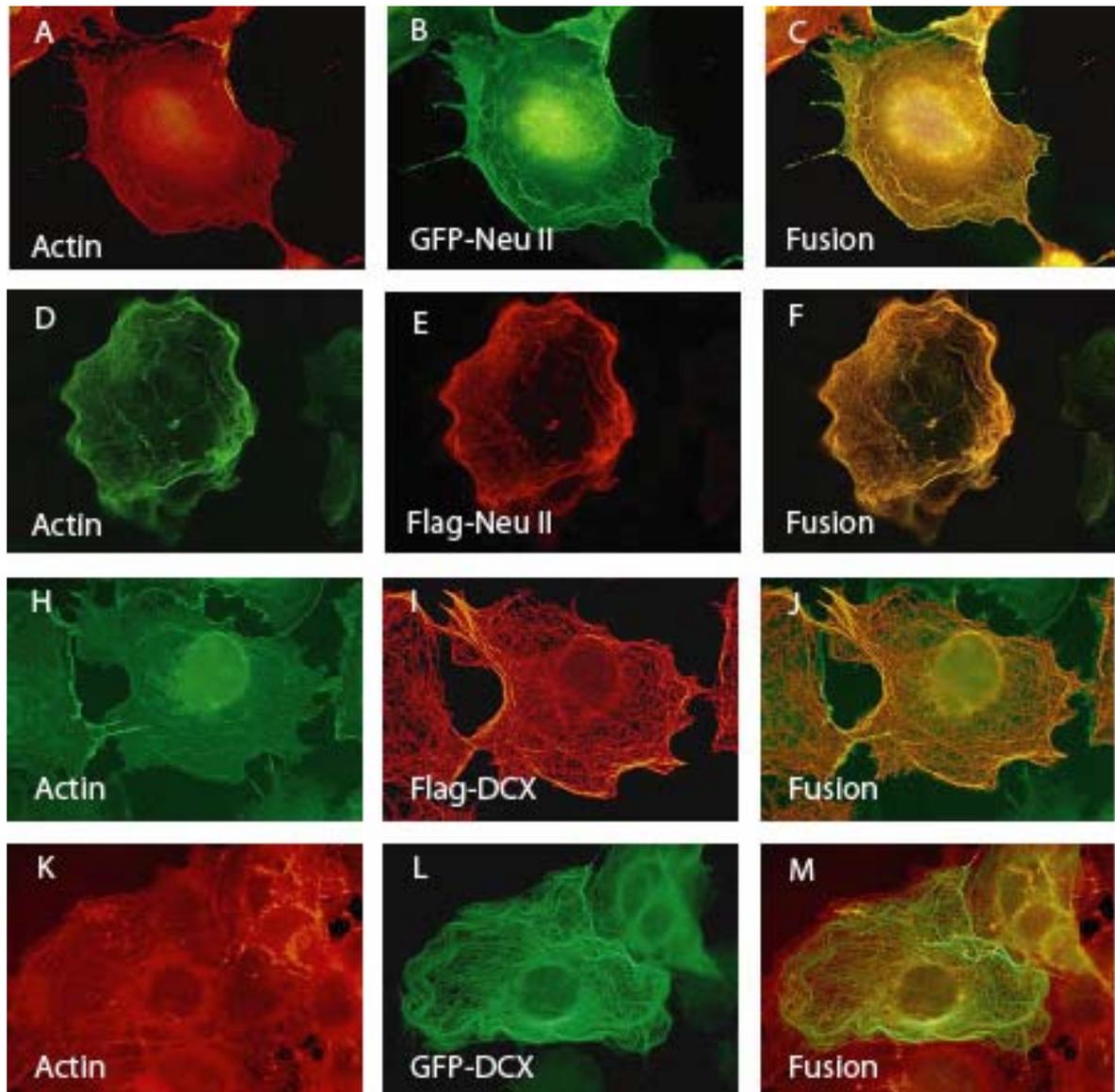


Abbildung 3.2: Transfektion von Neurabin II oder Doublecortin und gleichzeitiges Färben von Aktin. In den Abbildungen A-C und D-E wurde Aktin in Zellen angefärbt, in die Neurabin II transfiziert worden war. Dabei handelte es sich um mit GFP fusioniertes Neurabin II (B), und um Neurabin II versehen mit einem *Flag-Tag* (D). Die Bilder A und B, sowie D und E wurden übereinander gelegt. Die resultierende gelbe Färbung in C und F deutet auf eine Kolokalisierung hin. Ebenso wurde mit Doublecortin verfahren. Die Ergebnisse für Flag-Doublecortin zeigen die Bilder H-J und für GFP-Doublecortin die Bilder K-M. Die Fusionen dieser Bilder (J und M) zeigen keine gelbe Färbung.

Die Bindungsstelle von Doublecortin für Neurabin II wurde im C-Terminus von Doublecortin vermutet. Um dies zu bestätigen wurde eine um den C-terminus verkürzte Sequenz von Doublecortin DCXR303X mit Neurabin II kotransfiziert (Abb.3.3 G-I). Die gefundenen Muster und ihre Fusion belegen, dass keine Lokalisierung mehr stattfindet. Die Bindungsstelle von Doublecortin für Neurabin II befindet sich also im Bereich des abgetrennten C-Terminus.

Zusammenfassend besagen diese Ergebnisse, dass sowohl Neurabin II und Doublecortin als auch Neurabin II und Aktin kolokalisiert sind. Nicht kolokalisiert sind dagegen Doublecortin und Aktin, sowie Neurabin II und DC R303X.

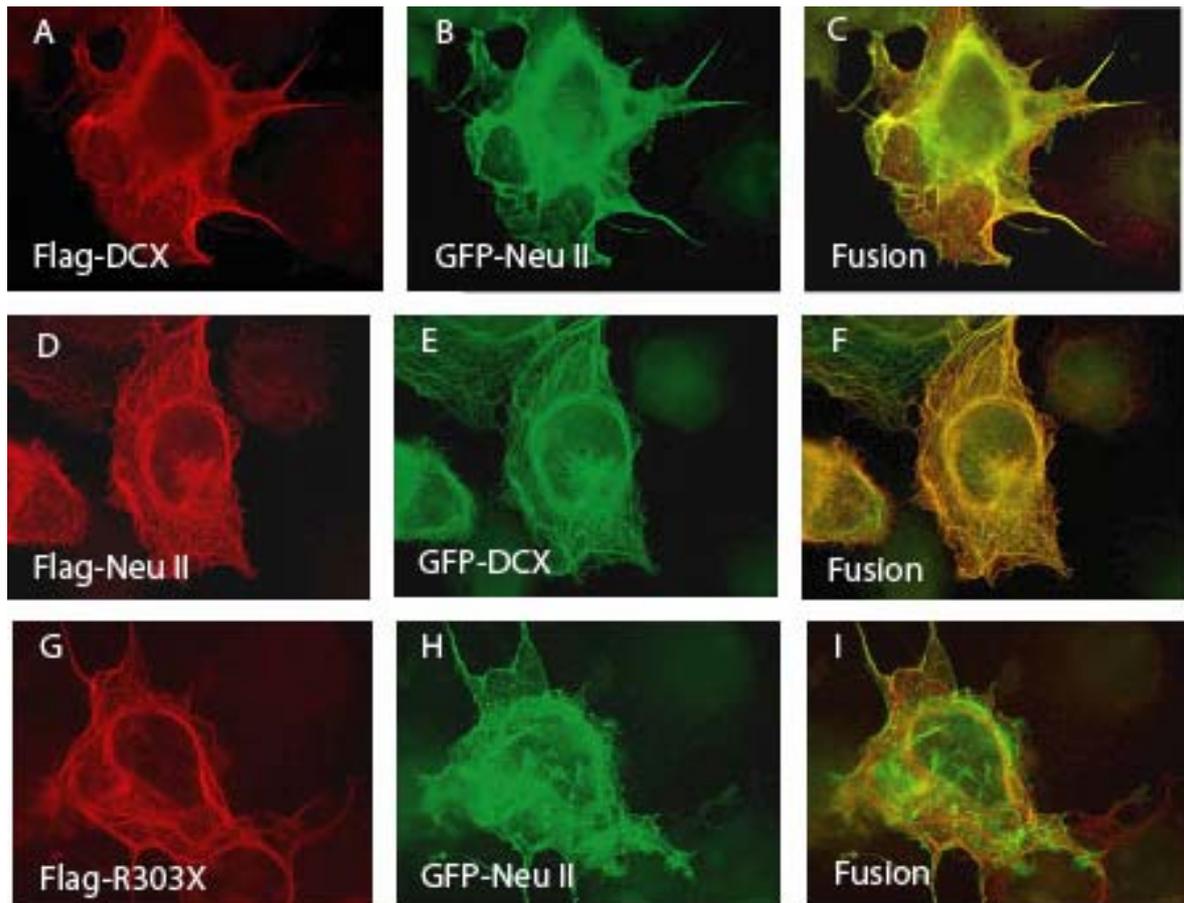


Abb.3.3: Kotretransfektionen von Neurabin II und Doublecortin. Es wurde Flag-Doublecortin mit GFP-Neurabin II kotransfiziert (A und B) sowie Flag-Neurabin II mit GFP-Doublecortin (D und E). Die fusionierten Abbildungen dieser Transfektionen (C und F) zeigen gelbe Färbungen und weisen auf eine Kolokalisierung hin.

G-I) Die Doublecortin-Variante DCXR303X war an ein *Flag-Tag* gekoppelt, während Neurabin II mit GFP fusioniert war (G und H). Die fusionierten Abbildungen (I) zeigen keine gelbe Färbung, d.h. es liegt keine Kolokalisierung vor.

3.1.2 *In Situ*-Hybridisierung

Falls Doublecortin und Neurabin II im Gehirn interagieren, sollten sie teilweise Überlappung im Expressionsmuster zeigen.

Im Stadium E14.5 wurde Neurabin II-Expression am äußeren Rand der kortikalen Platte, im sich entwickelnden Hippokampus und in niedrigeren Konzentrationen in der ventrikulären Schicht detektiert (Abb. 3.4 A). Abbildung 3.4 B zeigt die Kontrolle mit einer *Sense*-Probe.

Im postnatalem P7-Gehirn wurde eine ausgedehnte starke Expression von Neurabin II beobachtet (Abb. 3.4 C, D). Am stärksten ist die Expression in den Schichten 2 und 3 des Neokortex, im piriformen Kortex (Abb. 3.4 C, D) und in den olfaktorischen Tuberkeln (Abb. 3.4 C).

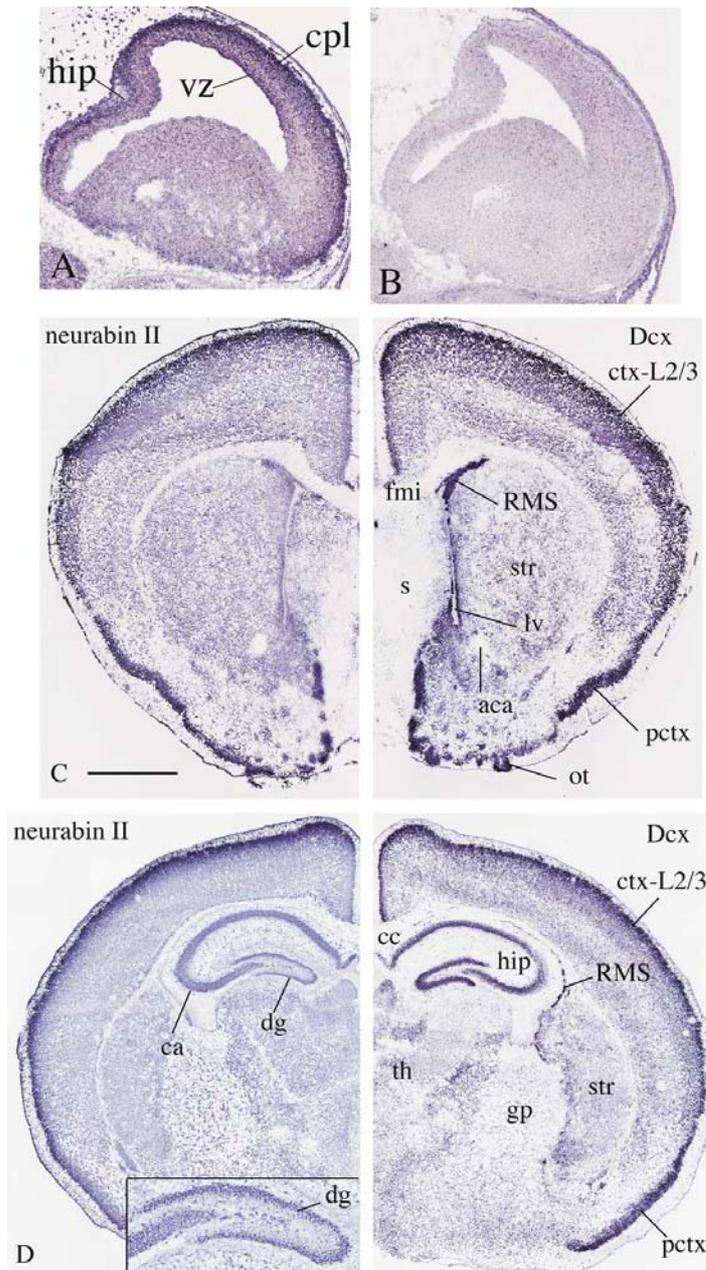


Abbildung 3.4: Expressionsmuster von Neurabin II und Doublecortin im sich entwickelnden Vorderhirn

A) Im Stadium E14.5 wird Neurabin II in der kortikalen Platte, im Hippokampus und weniger stark in der ventrikulären Schicht exprimiert. B) Kontrolle mit einer Sense-Probe. C) Expression von Neurabin II und Doublecortin in koronalen Schnitten des Stadiums P7. Beide Gene zeigen eine ausgedehnte Expression. Erhöhte Expression wurde in den Schichten 2 und 3 des Neokortex, im piriformen Kortex, in den olfaktorischen Tuberkeln (Knötchen) und im Fall von Doublecortin in der rostralen Migrationsstraße festgestellt. D) Dieser Schnitt liegt caudaler als der Schnitt in C) und führt direkt durch den Hippokampus. Neurabin II und Doublecortin werden beide deutlich exprimiert. Im Gyrus Dentatus wird nur Doublecortin und nicht Neurabin II exprimiert.

Abkürzungen: aca, anteriore Kommissur-Anterior; ca, Cornu Ammonis; cc, Corpus Callosum; ctx-L2/3, Neokortexschichten 2 und 3; dg, Gyrus Dentatus; gp, Globus Pallidus; hip, Hippokampus; fmi, Forceps Minor (kleine Zangen) des Corpus Callosum; lv, linker Ventrikel; ot, olfaktorische Tuberkel; pctx, piriformer Kortex; RMS, rostrale Migrationsstraße; s, Septum; str, Striatum; th, Thalamus, vZ, ventrikuläre Schicht. Skalierung in (C): 1000 μm , alle Bilder zeigen die gleiche Vergrößerung.

Die Neurabinexpression im adultem Gehirn ist ebenfalls in den Schichten 2 und 3 des Neokortex am stärksten. Ausserdem wurden ausgeprägte Expressionen in der subventrikulären Zone, der Cornu Ammonis und im Gyrus Dentatus, im Septum und in der Amygdala (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Viele der Neurabin II positiven Strukturen exprimieren auch Doublecortin. Im Stadium E15 wurde mRNA von DCX in der kortikalen Platte beobachtet (Gleason et al., 1999). Im Stadium P 7 wurden Doublecortin und Neurabin II im Neokortex, im piriformen Kortex und im Hippokampus exprimiert (Abb. 3.4 C, D). Ein Unterschied im Expressionsmuster von Neurabin II und Doublecortin zeigte sich im Gyrus Dentatus (Abb. 3.4 D). Während RNA von Doublecortin überall in der Körnerschicht der Cornu Ammonis und im Gyrus Dentatus gefunden wurde, sind Neurabin II-Transskripte abwesend (Abb. 3.4 D, Einschub). Ein weiterer Unterschied in der

Expression ist die Abwesenheit von Neurabintranskripten in der rostralen Migrationsstraße (Abb. 3.4 C, D), die aus Neuronen besteht, die in den olfaktorischen Bulbus migrieren. Trotz der Ausnahmen findet sich eine signifikante Übereinstimmung der Expression von Neurabin II und Doublecortin im Telenzephalon.

Diese beiden Gene haben also die Möglichkeit, während der Entwicklung und im adultem Vorderhirn *in vivo* miteinander zu interagieren.

3.2 Interaktion zwischen RanBPM und Lis1

RanBPM wurde als Kandidat für eine mögliche Interaktion mit Lis1 aus einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* isoliert (Durchgeführt von Dr. Kimberley Sweeney). Lis1 fungierte in diesem Screen als Köderprotein. Um eine Interaktion zu validieren, wurden *GST Pull Downs*, *YTH-Assays* und Immunopräzipitationen durchgeführt.

3.2.1 GST Pull Down

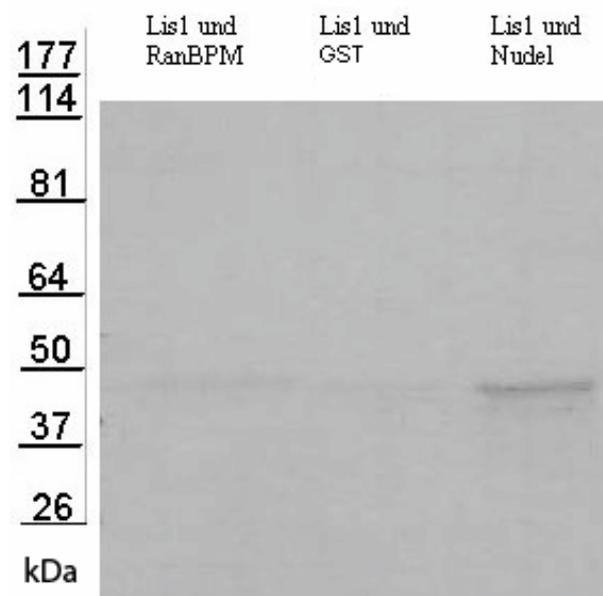


Abb. 3.5: Ergebnis des *GST Pull Downs*

Lis1 wurde mit ^{35}S -Methionin *in vitro* transkribiert/translatiert, während RanBPM und Nudel im pGex-Vektor mit Glutathion-S-Transferase fusioniert und über Glutathion-Agarose aufgereinigt wurden. Die kaum zu erkennende Bande in der linken Spur ist genauso schwach, wie die kaum zu erkennende Bande der Negativkontrolle (mittlere Spur). Für die Negativkontrolle wurde Lis1 mit Glutathion-S-Transferase und Glutathion-Agarose versetzt. Die Positivkontrolle, erkennbar in der rechten Spur, zeigt eine Bande, die eine

Interaktion zwischen Nudel und Lis1 darstellt. Eine Überprüfung der Expression ergab, dass Lis1 jeweils ausreichend exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Da die Ergebnisse der Negativkontrolle und des eigentlichen Interaktionstests zwischen RanBPM und Lis1 gleich stark sind, kann die Aussage getroffen werden, dass im GST Pull Down eine Wechselwirkung zwischen den beiden Kandidaten nicht nachzuweisen war. Zur Validierung des Ergebnisses wurden zwei Wiederholungen mit dem gleichen Resultat durchgeführt.

3.2.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Assay (*Yeast Two Hybrid Assay, YTH*)

Der YTH Assay sollte eine Interaktion zwischen RanBPM und Lis1 nachweisen. Dafür wurden RanBPM und Lis1 in die Vektoren pACT2 und pAS2.1 kloniert und in Hefe transformiert.

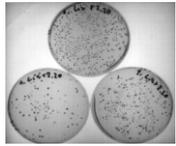
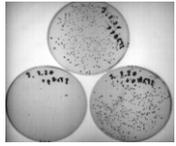
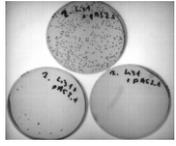
	Minimalmedium ohne Leucin und Tryptophan	Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin	Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Adenin.	
RanBPM und Lis1 (Ansatz 1)	+	+	+	
RanBPM und leerer Vektor (Ansatz 2)	+	-	+	
Lis1 und leerer Vektor (Ansatz 3)	+	-	-	

Tabelle3.1: Ergebnisse des *Yeast Two Hybrid-Assays* zwischen LIS1 und RanBPM. + : Es sind Kolonien gewachsen; - : Es sind keine Kolonien gewachsen. In der rechten Spalte sind die entsprechenden Platten dargestellt: obere Platte: Minimalmedium ohne Leucin und Tryptophan, linke Platte: Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin; rechte Plate: Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Adenin

Die Hefen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wurden auf Minimalmedien selektiert. Der Nachweis der Interaktion von RanBPM und Lis1 wurde über einen Histidin- und Adenin-Wachstums-Test geführt.

Im Ansatz 1 wurden RanBPM im pAS2.1-Vektor und Lis1 im pACT-Vektor in Hefezellen transformiert und auf den verschiedenen Minimalmedien ausgesät. Da auf allen Medien

Kolonienwachstum zu sehen ist, ist der Nachweis der Interaktion eigentlich erbracht. Aufgrund des Wachstums von Kolonien auf einer Kontrollplatte (Ansatz 2; Platte ohne Adenin) muss allerdings von einer unspezifischen Aktivierung des leeren pACT2-Vektors bzw. des Reporters durch RanBPM ausgegangen werden. Ein umgekehrter Ansatz (RanBPM in pACT2 und Lis1 in pAS2.1, Daten nicht gezeigt) zeigte ebenfalls Kolonienwachstum auf der Kontrollplatte ohne Adenin.

Wegen des unspezifischen Wachstums von Kolonien auf einer Kontrollplatte, das mehrfach validiert wurde, ist der YTH-Assay nicht aussagekräftig genug, um eine Interaktion zu bestätigen. Es kann sich um einen Falsch-Positiven Kandidaten des ursprünglichen YTH-Screens handeln.

3.2.3 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation sollte einen Nachweis über die Interaktion zwischen RanBPM und Lis1 bringen.

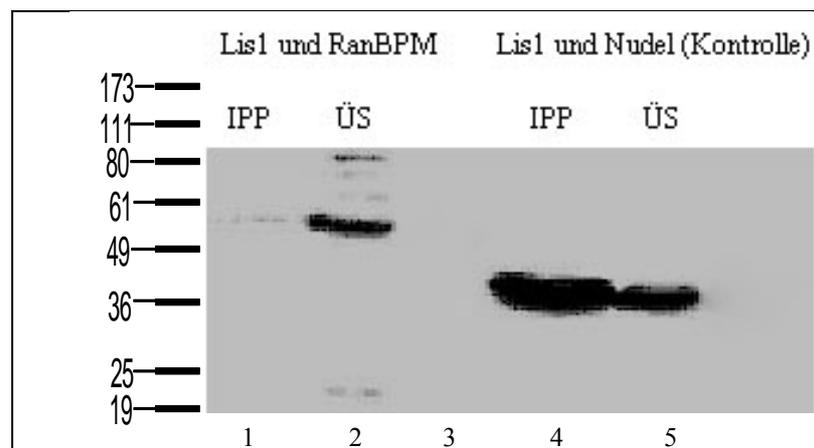


Abbildung 3.6: Ergebnis der Immunopräzipitation. Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um RanBPM in pCMV-Tag2 und Lis1 in pEGFP.

Die proteincodierende Region von RanBPM und Lis1 wurde in die Vektoren pEGFP und pCMV-Tag2 kloniert. Die Fusionsproteine GFP-Lis1 und Flag-RanBPM wurden in Cos-7 Zellen exprimiert, ebenso wie GFP-Lis und Flag-Nudel für einen Kontrollversuch. Western Blots des gesamten Zelllysats (Spur 2 und 5), präzipitiert mit anti-GFP, zeigten, dass RanBPM und Nudel exprimiert wurden. Wenn ein anti-GFP Antikörper benutzt wurde, um GFP-Lis1 zu präzipitieren und das resultierende Material mittels *Western-Blotting* zu analysieren, dann sollte ein anti-Flag Antikörper das Flag-RanBPM-Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 69 kDa detektieren. An der entsprechenden Stelle im Gel ist

nur eine sehr schwache Bande zu erkennen (Spur1). Die gleichzeitig durchgeführte Kontrolle mit Lis1 und Nudel zeigt ein positives Ergebnis (Spur4) was auf eine einwandfreie Durchführung hinweist. Das umgekehrte Experiment (Präzipitation mit anti-Flag, Detektion mit anti-GFP) führte zu dem gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Unter verschiedenen Bedingungen durchgeführte Wiederholungen führten zu dem gleichen Ergebnis. Es bleibt festzustellen, dass RanBPM unter den getesteten Bedingungen, nicht eindeutig an Lis1 bindet.

3.3 Emx2-Projekt

Ziel dieses Projektes war es, Emx2 nachgeschaltete Gene zu identifizieren. Als Gene wurden Kandidaten aus der Literatur (bekannte Gene neuraler und glialer Entwicklung), aus der Analyse von DNA Mikrochips (Hippokampus Wildtyp-RNA verglichen mit RNA aus der Emx2-Mutante, beide aus E18.5-Mäusen) und aus der Genepaint-Datenbank ausgewählt (Tabelle 3.2).

DNA Mikrochips sind eine bevorzugte Methode für sehr große (large-scale) Expressionsanalysen. Die Methode erlaubt es tausende von Genen in einem einzigen Experiment zu untersuchen. Dabei können z.B. Expressionen von Wildtyp und Mutante einer bestimmten Region miteinander verglichen werden.

Die Genepaint-Datenbank beherbergt Expressionsmuster von über tausend Genen in verschiedenen Stadien der Mausentwicklung und wurde in unserem Labor mit Hilfe automatisierter *high throughput-In Situ* Hybridisierungen (HIT-ISH) erstellt. Sie ist frei zugänglich unter www.genepaint.org.

Mittels HIT-ISH und immunohistochemischer Untersuchungen wurden die Expressionsmuster von Wildtyp und Emx2-Mutante im Hippokampus miteinander verglichen. Die Kandidatenmoleküle zeigen Emx2-abhängige Funktionsveränderungen im Neuroepithelium, in der Ausbildung der glialen Matrix, in der Migration von Vorläufern und in der Bildung der hippokampalen Fissur.

Einige ISH-Daten zeigen, dass in der Mutante spezifische und grundlegende Unterschiede der bHLH-Kaskade auftreten. Dazu gehören das Fehlen von Mash1-Expression, Unterschiede im Differenzierungsweg von Körnerzellen und die Abwesenheit von migrierenden Vorläuferzellen. Diese Ergebnisse zeigen Emx2 als einen Hauptregulator der Neurogenese des Gyrus Dentatus, der stromaufwärts der proneuralen Kaskade agiert.

Kandidat	Quelle	Kandidat	Quelle
373bp	Chip	Lim,Lhx3, Alp	Chip
Adamts-1	Genepaint	Lis1	Literatur
AldDe2	Chip	Lix1	Genepaint
ApoE	Chip	Mak-v	Genepaint
ApoER2	Literatur	Mash1	Literatur
ATFx	Chip	Minopontin	Chip
Bdnf	Chip	Mmp15	Genepaint
Calbindin	Genepaint	Nestin	Literatur
Calretinin	Chip	NeuroD1	Literatur
Cdk5	Literatur	NeuroD2	Literatur
Cxcl12	Genepaint	NeuroD6	Genepaint
Cxcr4	Literatur	Ngn1	Literatur
CyclinD2	Genepaint	Ngn2	Literatur/Genepaint
DCX	Literatur	Nkx2.1	Literatur
Decorin	Literatur	Nkx2.2	Literatur/chip
Deiodinase1+2	Chip	NNP1	Genepaint
Delta1	Literatur	Notch	Literatur
Dlx1	Literatur	Nov	Chip
Dlx2	Literatur	Ntrk2	Genepaint
Emx2	Literatur	Ntrk3	Genepaint
EphA7	Chip	Nudel	Literatur
EphB1	Literatur	Otx1	Genepaint
Ets2	Genepaint	Pax6	Literatur/Genepaint
Evi2	Chip	Pcp4	Genepaint
FoxG1	Genepaint	Pdgfr	Chip
Ftcd	Genepaint	Pknox	Genepaint
Gas5	Genepaint	Proenkeph.2	Chip
Gelsolin	Chip	Prox1	Literatur
GFAP	Chip	Reelin	Literatur/Chip/Genepaint
Hes1	Literatur	Sdf-1	Chip
Hes5	Literatur	Shh	Literatur
Hipk2	Chip	Slit2	Genepaint
Hs3	Chip	Smad1	Literatur
Id3	Literatur	Sox9	Genepaint
Integrin a 3	Literatur	Tenascin	Literatur
Krzfp	Chip	Ube2g2	Genepaint
Lhx5	Literatur	VDLR	Literatur
Lhx6	Literatur	Neogenin	Literatur

Tabelle 3.2: In der ISH getestete Kandidaten und ihre Quelle. Einige Kandidaten wurden sowohl in der Literatur als auch auf dem Chip bzw. in der Genepaint-Datenbank gefunden

3.3.1 Emx2-Expression im Gyrus Dentatus

Zuerst wurde die Expression von Emx2 im Gyrus Dentatus der Maus des Stadium E18.5 analysiert, um den zellautonomen Phänotyp (Gendefekt hat direkt Auswirkungen auf den Phänotyp der eigenen Zelle) in der Mutante zu definieren. Die ISH reproduzierte die bekannte Verteilung von Emx2 im Neokortex (Cecchi, 2002; Gulisano et al., 1996; Mallamaci et al., 1998; Simeone et al., 1992a and b; Daten nicht gezeigt). Emx2 wurde in jeder Unterregion des sich entwickelnden Gyrus Dentatus exprimiert (Abb. 3.7 A). Der distale Teil zeigt viele stark markierte Zellen, die das dorsale und ventrale Blatt bilden werden, das in diesem Stadium anfängt sich zu differenzieren. Die Emx2 exprimierenden

Zellen der dorsalen Seite stimmen mit der Region der hippocampalen Fissur überein. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei nicht um Körnerzellen handelt, weil diese in der hippocampalen Fissur nicht vorkommen. In diesem Stadium ist die dorsale Seite durch die hippocampale Fissur in Kontakt mit der kortikalen marginalen Zone, die von Emx2 und Calretinin exprimierenden Cajal-Retzius Zellen bevölkert wird (Glezer et al., 1992; Mallamaci et al., 1998). Eine Färbung mit einem Calretinin-Antikörper (Abb. 3.7 B) zeigt, dass die meisten Emx2 exprimierenden Zellen der dorsalen Seite Cajal-Retzius-Zellen in der hippocampalen Fissur sind, während die Schicht der Calretinin-positiven, differenzierten Körnerzellen direkt ventral zu der Fissur niedrigere Emx2-Konzentrationen zeigt. Nissl-Färbungen bestätigen, dass das sich differenzierende dorsale Blatt direkt an der längeren und breiteren hippocampalen Fissur anliegt, deren Zellen nicht so kompakt gepackt sind (Abb. 3.7 C).

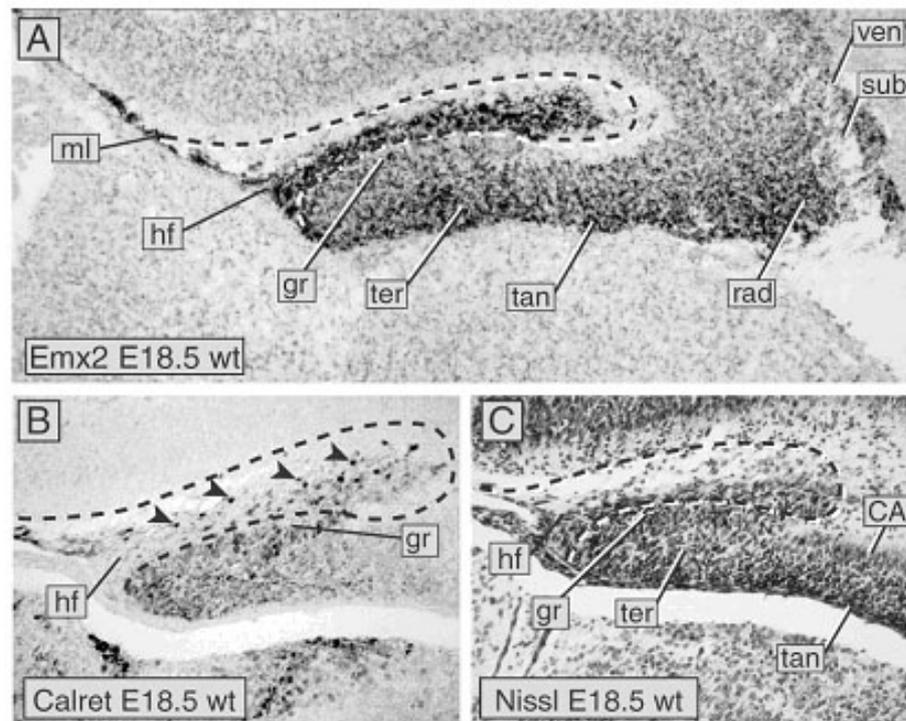


Abbildung 3.7: Emx2-Expression, Calretinin-Expression und Nissl-Färbung im Gyrus Dentatus des Stadiums E18.5. **A)** Emx2 ist in jeder Unterregion des sich entwickelnden Dentatus exprimiert. Die distalste, stark gefärbte Region ist die der beginnenden molekularen Lacunosum-Schicht und die hippocampale Fissur (hervorgehoben mit der gestrichelten Linie in A, B und C). **B)** Einzelne, versprengte Calretinin exprimierende Zellen (Pfeilspitzen) markieren die hippocampale Fissur (hf). Eine kompakte Ansammlung von Calretinin exprimierenden Zellen charakterisieren die sich differenzierende Körnerzellschicht. **C)** Nissl-Färbung von koronalen Schnitten des Wildtypen im Stadium E18.5 zeigen die hippocampale Fissur und die sich differenzierende Körnerzellschicht. Abkürzungen: CA, Ammons Horn (auch Cornu Ammonis); gr, Körnerzellschicht; hf, hippocampale Fissur; ml, marginale Schicht des Kortex; rad, radiale Migrationsstraße; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentielle Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht.

Emx2 wird in diesem Stadium in allen Unterregionen des sich entwickelnden Gyrus Dentatus exprimiert. Die stärkste Expression findet sich in der radialen und tangentialen Migrationsstraße und in der hippocampalen Fissur, während die tertiäre Matrix und sich differenzierende Körnerzellen, sowie die ventrikuläre und subventrikuläre Schicht schwächere Expressionsmuster zeigen.

3.3.2 Migrationen von proliferierenden Zellen und Neuronen sind im Emx2 mutanten Gyrus Dentatus unterschiedlich gestört

Im sich entwickelnden Gyrus Dentatus gibt es migrierende unreife, postmitotische Neuronen und migrierende proliferierende, mitotische Zellen, die die sekundäre Matrix (subventrikuläre Zone) bilden (Altman und Bayer, 1990b). Um festzustellen wie diese unterschiedlichen Zellgruppen durch die Abwesenheit von Emx2 beeinflusst werden, wurde ein Antikörper gegen das Antigen Ki-67 auf Gewebe eingesetzt. Ki-67 ist ein Marker für proliferierende Zellen. Im Stadium E18.5 erreicht die Migration von Vorläuferzellen seinen Höhepunkt im Gyrus Dentatus (Bagri et al., 2002).

Im Wildtyp wird Ki-67 von Zellen der ventrikulären Schicht (primäre Matrix), der subventrikulären Zone (sekundäre Matrix), den Migrationsstraßen, der tertiären Matrix und in der hippocampalen Fissur exprimiert (Abb. 3.8 A, B). In der Mutante ist die frühe Gyrus Dentatus-Anlage eine schmale hakenförmige Struktur, die durch eine stark verkürzte tangentiale Migrationsstraße charakterisiert ist. Diese tangentiale Migrationsstraße stößt auf einen Bereich mit geringer Zelldichte. Im Wildtyp entsteht dort die hippocampale Fissur und die molekulare Lacunosum-Schicht (Abb. 3.8 C). Proliferierende Zellen sind in der Mutante drastisch reduziert (Abb. 3.8 D). Detailliertere Untersuchungen (Abb. 3.8 E) zeigen Ki-67-Färbung hauptsächlich in der ventrikulären Schicht. In der subventrikulären Zone, der Migrationsstraße (Pfeilspitzen in Abb. 3.8 E) und der vermuteten Fissur (Pfeile in Abb. 3.8 E) sind markierte Zellen zu erkennen. Diese Zellen deuten die Existenz einer reduzierten sekundären Matrix an und stehen in Kontrast zu der Anzahl proliferierender Zellen in der gleichen Region des Wildtyps (Abb. 3.8 E).

Der Einsatz eines Antikörpers gegen Calretinin markiert Zellen mit neuronaler Differenzierung. Im Wildtyp wurden Calretinin-positive Zellen am distalen Ende der tangentialen Migrationsstraße und in der tertiären Matrix gefunden (Abb. 3.8 F). In der Mutante sind die Calretinin-positiven Zellen zwar drastisch reduziert, aber in der tangentialen Migrationsstraße noch anwesend (Pfeile in Abb. 3.8 G).

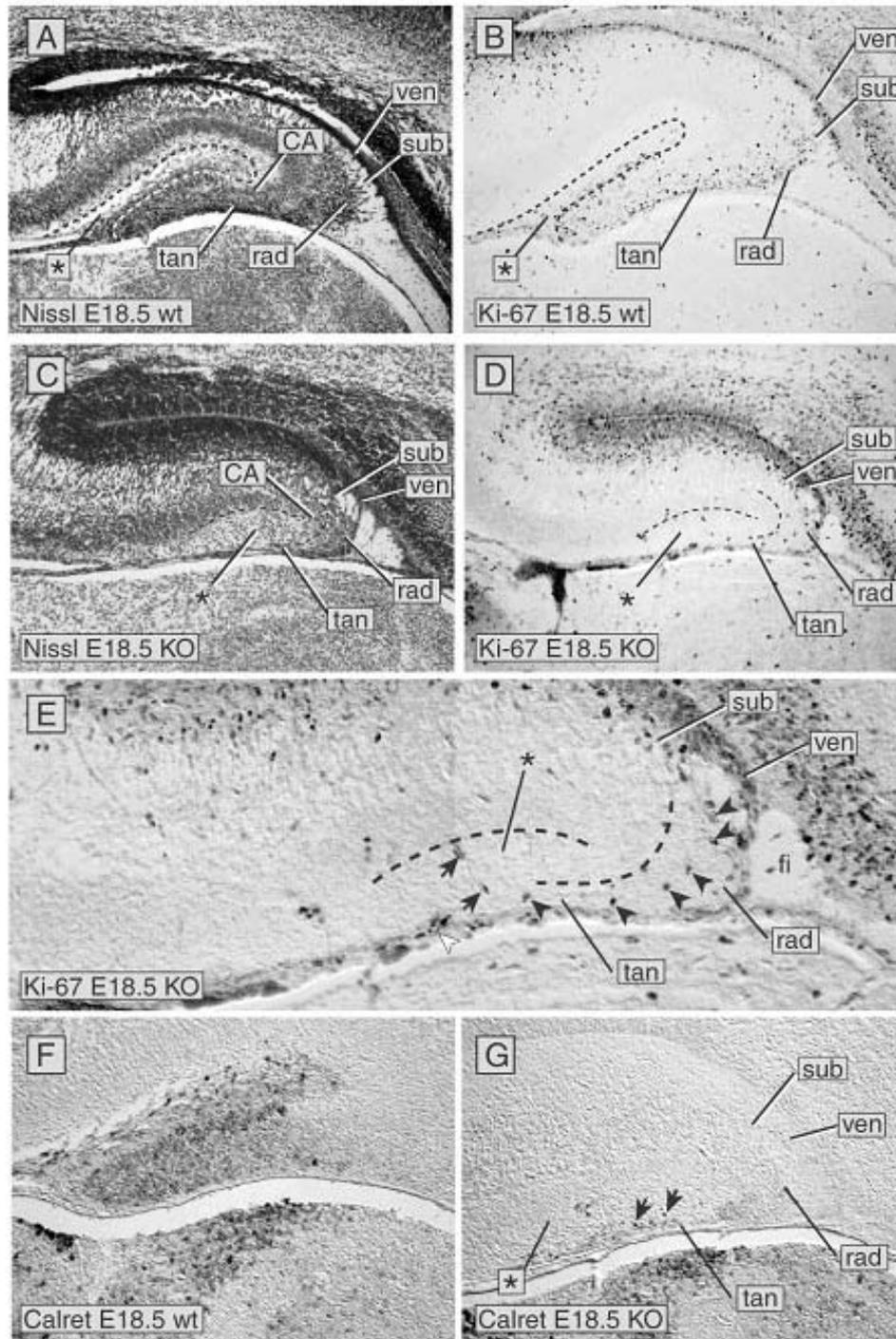


Abbildung 3.8: Proliferierende Zellen und postmitotische Neuronen werden in der EMX2-Mutante an unterschiedlichen Stellen arretiert.

A, B) Der Vergleich einer Nissl-Färbung (A) mit KI-67 markiertem Gyrus Dentatus im Wildtyp zeigt, dass proliferierende Zellen in jeder Unterregion einschließlich der hippocampalen Fissur (gestrichelte Linie und Stern) gefunden werden.

C, D) Der Nissl- und KI-67-gefärbte mutante Gyrus Dentatus. Eine Region mit geringer Zelldichte (Stern in C, D, E, G) repräsentiert die Stelle an der eigentlich die hippocampale Fissur entsteht.

E) Hochauflösende Bilder von (D) zeigen nur wenige proliferierende Zellen in der Migrationsstraße (Pfeilspitze) und in der verkümmerten Region der hippocampalen Fissur (Pfeile)

F, G) Neuronale Zellen gefärbt mit Calretinin-Antikörper in Wildtyp (F) und Emx2-Mutante (G). Abkürzungen: Stern, region der hippocampalen Fissur; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentielle Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht

Die Abwesenheit von Emx2 im Gyrus Dentatus beeinflusst die mitotischen und postmitotischen migrierenden Zellen unterschiedlich: Während mitotische Zellen in der ventrikulären Schicht oder seiner unmittelbaren Nachbarschaft arretiert werden, sind einige unreife postmitotische Neuronen in der Lage, den Weg zur der vermuteten Körnerzellschicht teilweise zurückzulegen, bevor sie in der tangentialen Migrationsstraße arretiert werden.

3.3.3 Der mutante Gyrus Dentatus exprimiert das proneurale Gen Mash1 nicht

Die migrierenden Vorläuferzellen im Gyrus Dentatus exprimieren die Transkriptionsfaktoren Mash1 und Notch1. Einige exprimieren zusätzlich Delta1, Id3 und Hes5 (Pleasure et al., 2000).

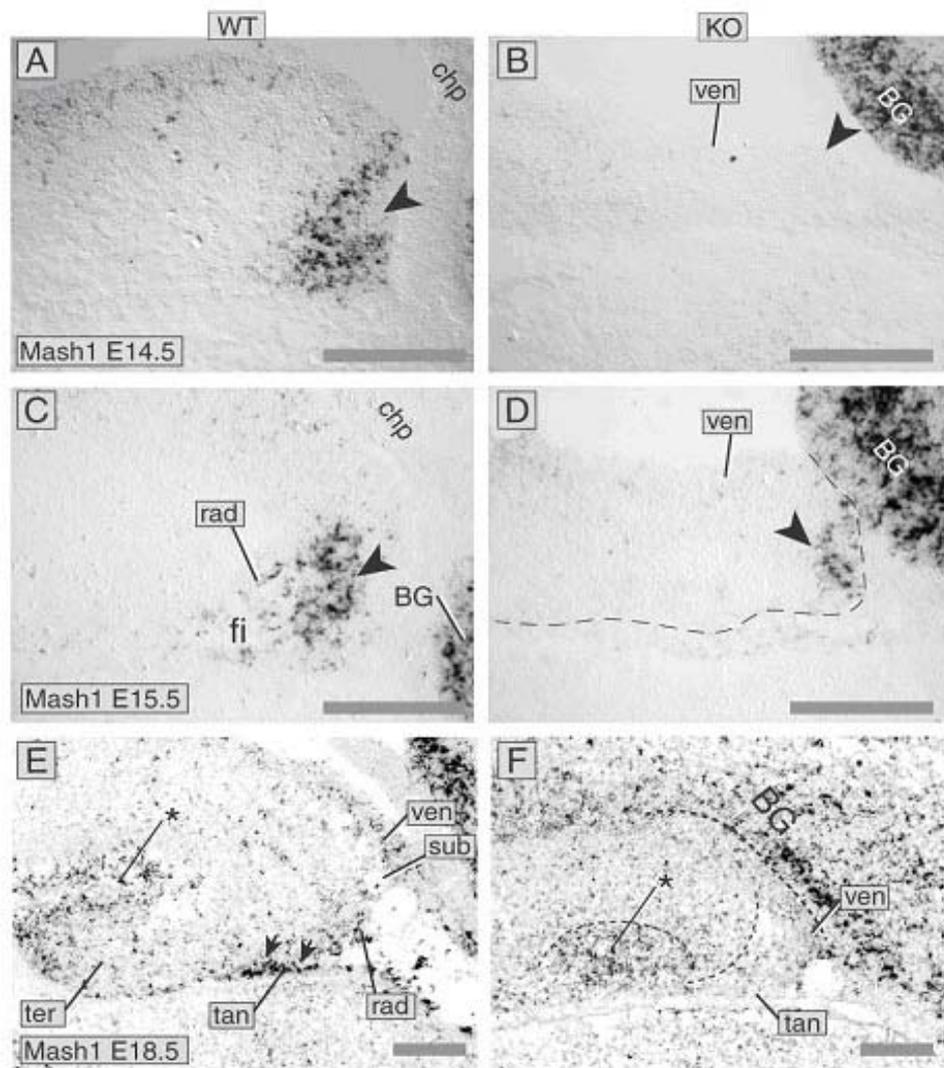


Abbildung 3.9: Expression des proneuralen Gens Mash1 verschwindet im Emx2-mutanten Gyrus Dentatus
 Abkürzungen: Stern, Region der hippocampalen Fissur; BG, Basalganglien; chp, Choroid Plexus; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; sub, subventrikuläre Zone; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Skalierung 200 µm

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass der mutierte Gyrus Dentatus keine migrierenden Vorläuferzellen besitzt. Deshalb wurde die Expression von Mash1 untersucht.

Im Stadium E14.5 wird Mash1 im Neuroepithelium exprimiert (Abb. 3.9 A), wie in der Literatur beschrieben (Pleasure et al., 2000). Im gleichen Stadium der Mutante wird Mash1 nicht exprimiert (Abb. 3.9 C). Auf den gleichen Schnitten wurde Mash1-Expression in Strukturen detektiert, die Emx2 nicht exprimieren, wie z.B. in den Basalganglien (BG in Abb. 3.9 B).

Im Stadium E15.5 ist die Mash1-Expression auf das Neuroepithelium, die benachbarte Fimbria und einige radial migrierenden Zellen, die anfangen die sekundäre Matrix zu bilden, begrenzt (Abb. 3.9 C). In der Mutante findet man Mash1-Expression am Ende des Neuroepitheliums (Pfeilspitze in Abb. 3.9 D, entspricht vermutlich dem fimbrischen Neuroepithelium im Wildtyp), es sind aber keine wandernden Zellen zu erkennen.

Im Stadium E18.5 wird Mash1 in der ventrikulären Schicht, der subventrikulären Schicht und in der Migrationsstraße detektiert (Pfeile in Abb. 3.9 E). Die Region der Fissur (Stern in Abb. 3.9 E) wurde ebenfalls markiert. Im mutanten Gyrus Dentatus ist die Expression von Mash1 aus jeder Unterregion mit Ausnahme der mutmaßlichen Region der Fissur (Stern in Abb. 3.9 F) verschwunden (Abb. 3.9 F).

3.3.4 Notch1 und Delta1 sind im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante auf die ventrikuläre Schicht begrenzt

Notch1 ist spezifisch in migrierenden Vorläuferzellen des Gyrus Dentatus exprimiert (Pleasure et al., 2000). Mit der Notch1-Expressionen im Neuroepithelium (E14.5, Abb. 3.10 A) wurden publizierte Daten bestätigt (Lindsell et al., 1996; Pleasure et al., 2000). In diesem Stadium wurde zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied festgestellt (Abb. 3.10 A, B).

Einen Tag später (E15.5) wird Notch1 in der ventrikulären Schicht des Wildtyps exprimiert. In der Nähe des Ventrikels zeigt sich ein starkes Signal, das zur subventrikulären Zone hin schwächer wird (Abb. 3.10 C). Die radiale und tangential Migrationsstraßen zeigen ebenfalls Notch1-Expression, sowie einige verteilte Zellen zwischen dem Neuroepithelium des Gyrus Dentatus und dem Neuroepithelium der Cornu Ammonis (Pfeilspitzen in Abb. 3.10 C). Die Emx2-Mutante zeigt Notch1-Expression im Neuroepithelium der Cornu Ammonis und schwache Signale im Neuroepithelium des Gyrus Dentatus (Pfeilspitze in Abb. 3.10 D).

ventrikuläre Schicht und in der Fimbria exprimiert (Abb. 3.10 G). Dieselbe Region in der Emx2-Mutante zeigt nur wenige markierte Zellen (Abb. 3.10 H).

Einen Tag später (E15.5) wird Delta1 wie im E14.5-Wildtyp in der ventrikulären Schicht und in der Fimbria exprimiert. Die in diesem Alter migrierenden Zellen zeigen keine Delta1-Expression (Abb. 3.10 I). Der mutierte Gyrus Dentatus (E15.5) zeigt nur sehr schwache bis gar keine Delta1 exprimierenden Zellen (Abb. 3.10 J).

Im Stadium E18.5 des Wildtyps wurden Signale in der radialen und tangentialen Migrationsstraße und in der tertiären Matrix detektiert (Abb. 3.10 K), die nahelegen, dass Delta1 eine Untergruppe von migrierenden Vorläuferzellen markiert. In der Mutante ist Delta1-Expression auf die ventrikuläre Schicht begrenzt (Abb. 3.10 L).

3.3.5 Id3, Hes5 und Ngn2 sind in der Emx2-Mutante auf die ventrikuläre Schicht begrenzt

Id3 wird im Wildtyp des Stadiums E14.5 nicht exprimiert (Abb. 3.11 A), obwohl die Emx2-Mutante Id3-Expression im Neuroepithelium zeigt (Abb. 3.11 B). Id3 wird im Wildtyp des Stadiums E15.5 in der ventrikulären Schicht und teilweise im fimbrialen Neuroepithelium exprimiert (Abb. 3.11 C). Einige markierte Zellen migrieren entlang der radialen Migrationsstraße (Abb. 3.11 C). In der Mutante zeigt sich eine ähnliche Id3 Expression, es wurden aber keine migrierenden Zellen detektiert (Abb. 3.11 D).

Im Wildtyp des Stadiums E18.5 wird Id3 stark in der ventrikulären Schicht und in Zellen entlang der Migrationsstraße exprimiert (Abb. 3.11 E). Die Intensität der Id3-Expression und die Anzahl der markierten Zellen erreicht ihr Maximum in der tertiären Matrix (Abb. 3.11 E). In der Emx2-Mutante sind in der Migrationsstraße keine Id3 exprimierenden Zellen zu erkennen, während die Id3-Expression der ventrikulären Schicht breiter und intensiver erscheint als im Wildtyp (Abb. 3.11 F).

Hes5 wird im Wildtyp und in der Emx2-Mutante des Stadiums E14.5 im Neuroepithelium exprimiert (Abb. 3.11 G, H). Dieses Muster wurde im Wildtyp schon beobachtet (Pleasure et al., 2000). Die markierten Zellen formieren eine breite radiale Migrationsstraße im E15.5-Wildtyp. Hes5 wird in dort in der ventrikulären Schicht und in radial migrierenden Zellen exprimiert (Abb. 3.11 I). In der Mutante des gleichen Stadiums ist die Expression auf das Neuroepithelium begrenzt und es werden keine Hes5 exprimierenden, migrierenden Zellen beobachtet (Abb. 3.11 J).

Im Stadium E18.5 wird Hes5 in der ventrikulären Schicht, in den Migrationsstraßen und in der tertiären Matrix exprimiert (Abb. 3.11 K). In der E18.5-Mutante ist Hes5 auf die ventrikuläre Schicht begrenzt (Abb. 3.11 L).

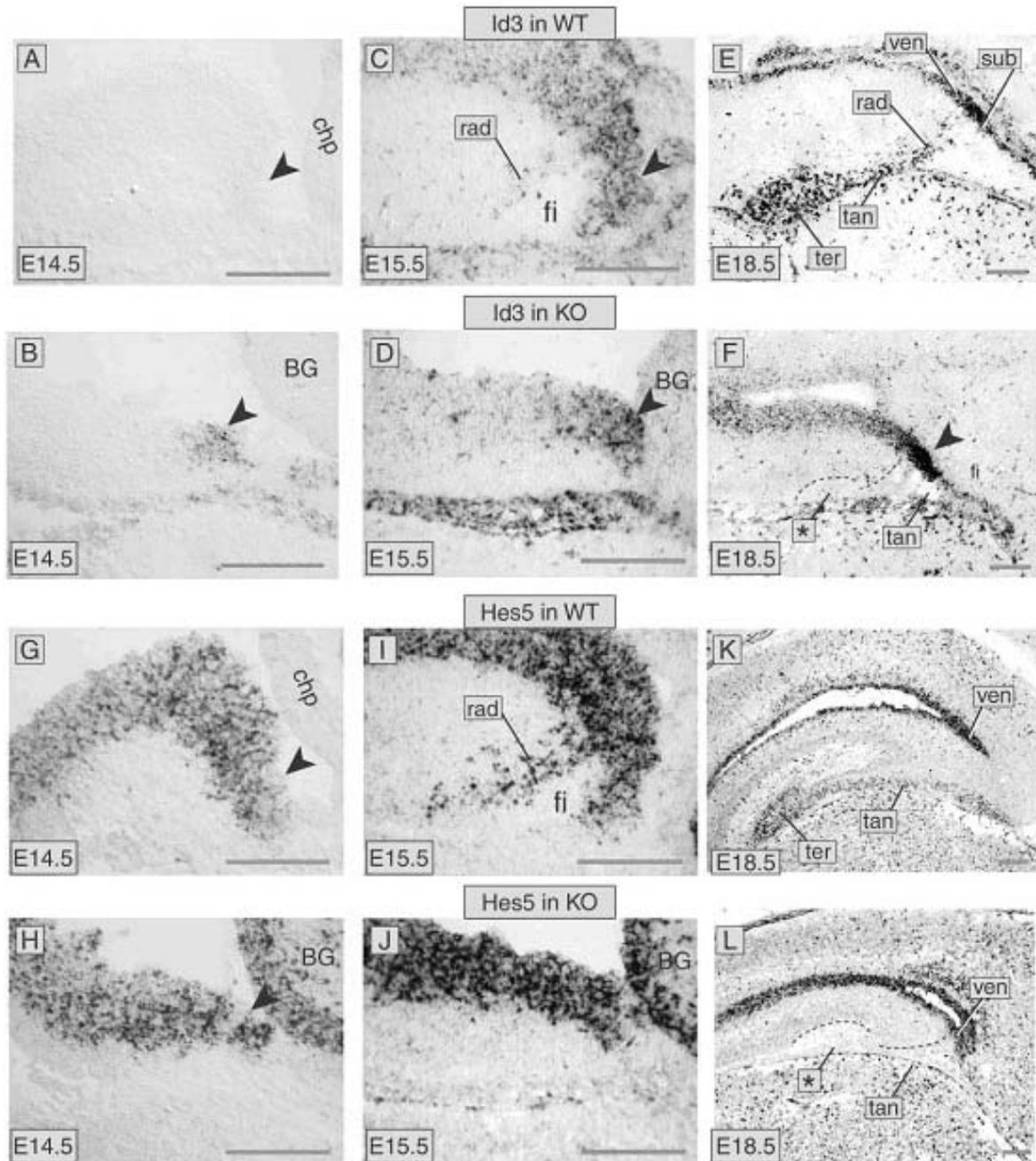


Abbildung 3.11: Id3 und Hes5 sind in der Emx2-Mutante auf das Neuroepithelium begrenzt

Abkürzungen: Stern, Region in der hippocampalen Fissur; BG, Basalganglien; chp, Choroid Plexus; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentiale Migrationsstraße; ven, ventrikuläre Schicht. Skalierung 200 µm.

Ngn2 ist ein proneurales Gen, das im Hippokampus der Maus (Sommer et al., 1996) und in der Ratte (Pleasure et al., 2000) exprimiert ist. Vergleiche der Expression in den Stadien

E14.5, E15.5 und E18.5 zwischen Wildtyp (Abb. 3.12 A, C und E) und Mutante (Abb. 3.12 B, D und F) zeigen das Ngn2 in der ventrikulären und subventrikulären Schicht der Mutante korrekt exprimiert ist. Allerdings sind die markierten wandernden Zellen, die im Wildtyp des Stadiums E15.5 erscheinen, in der E15.5- und E18.5-Mutante abwesend.

Im Stadium E15.5 wird Ngn2 im Wildtyp (Abb. 3.12 C) im fimbrialen Neuroepithelium (Pfeilspitze) und in der radialen Migrationsstraße (rad) exprimiert. Im Wildtyp des Stadiums E18.5 (Abb. 3.12 E) wird Ngn2 in der ventrikulären Schicht und in den Migrationsstraßen exprimiert. Es ist aber in der tertiären Matrix nicht zu erkennen. Die Emx2-Mutante (Abb. 3.12 F) zeigt nur Expression im Neuroepithelium

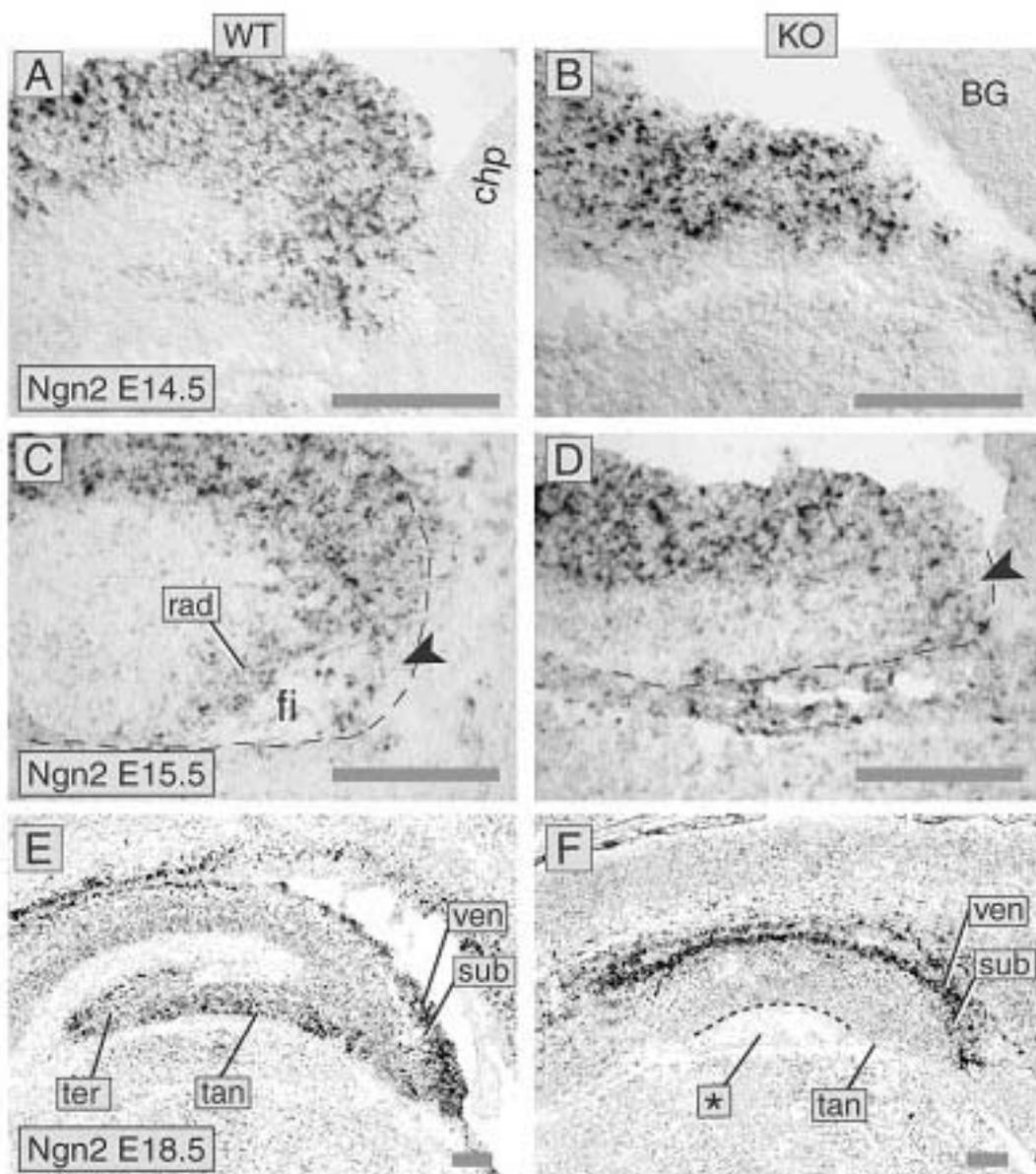


Abbildung 3.12: Expression von Ngn2 ist im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante verändert

Abkürzungen: Stern, Region der hippocampalen Fissur; BG, Basalganglien; chp, Choroid Plexus; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; ven, ventrikuläre Schicht. Skalierung 200 μ m

3.3.6 Die Expression des Markers für astrogliale Vorläuferzellen Tenascin C und die von GFAP ist in der Mutante begrenzt

Die bisherigen Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der Hauptdefekt im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante nicht durch die Möglichkeit der Vorläuferzellen bHLH-Gene zu exprimieren oder nicht zu exprimieren, verursacht wird, sondern dadurch, dass sie nicht die Fähigkeit haben zu migrieren.

Radiale Gliazellen sind Schlüsselemente in der Histogenese des Gyrus Dentatus. Sie stellen ein Gerüst für migrierende Zellen in der Entwicklung zur Verfügung. Viele dieser Zellen wandern distal, erzeugen Astrozyten und wirken an der Formation der Körnerzellschicht mit (Eckenhoff und Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987). Aus diesen Gründen wurde der Status der Astrozyten und ihrer Vorläuferzellen im Wildtyp- und in der Emx2-Mutante untersucht.

TenascinC ist ein von Gliazellen produziertes extrazelluläres Matrixprotein (Chiquet und Fambrough, 1984; Chiquet-Ehrismann et al., 1986) und ein Marker migrierender, astroglialer Vorläuferzellen des Gyrus Dentatus (Bartsch et al., 1992a und b; Yuasa, 2001a, b). TenascinC wird spezifisch im Neuroepithelium des Gyrus Dentatus (Wildtyp, E14.5; Pfeilspitze in Abb. 3.13 A), aber noch nicht in der Mutante exprimiert, in der der Anfang der Expression verzögert ist (Abb. 3.13 B). Im Wildtyp des Stadiums E18.5 (Abb. 3.13 C) wird starke Expression von TenascinC in der gesamten Gyrus Dentatus Anlage detektiert. In der Mutante wird TenascinC nur in der ventrikulären Schicht und in wenigen Zellen der radialen Migrationsstraße exprimiert (Abb. 3.13 D).

Aufgrund des Expressioschemas von TenascinC kann die Aussage getroffen werden, dass die wandernden astroglialen Vorläuferzellen in der Emx2-Mutante größtenteils auf die ventrikuläre Schicht begrenzt sind. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen für die bHLH-Gene überein.

GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) ist ein Protein, das stark von radialen Gliazellen und Astrozyten exprimiert wird (Eckenhoff und Rakic, 1984). Im Neuroepithelium und in der sekundären Matrix ist es mit TenascinC kolokalisiert (Yuasa, 2001a). Im Stadium E18.5 des Wildtyps kann GFAP in jeder Unterregion des Gyrus Dentatus detektiert werden (Abb. 3.13 E), während in der Mutante die Expression auf des Neuroepithelium beschränkt bleibt (Pfeilspitze in Abb. 3.13 F). Immunocytochemische Detektion von GFAP im Wildtyp- und im mutiertem Gyrus Dentatus des Stadiums E18.5 (Abb. 3.13 G, H) stimmt mit den Ergebnissen der *In Situ*-Hybridisierung überein. Während der Wildtyp starke GFAP-Muster zeigt (Abb. 3.13 G) ist das GFAP-Gerüst in der Mutante eindeutig defekt (Abb. 3.13 H).

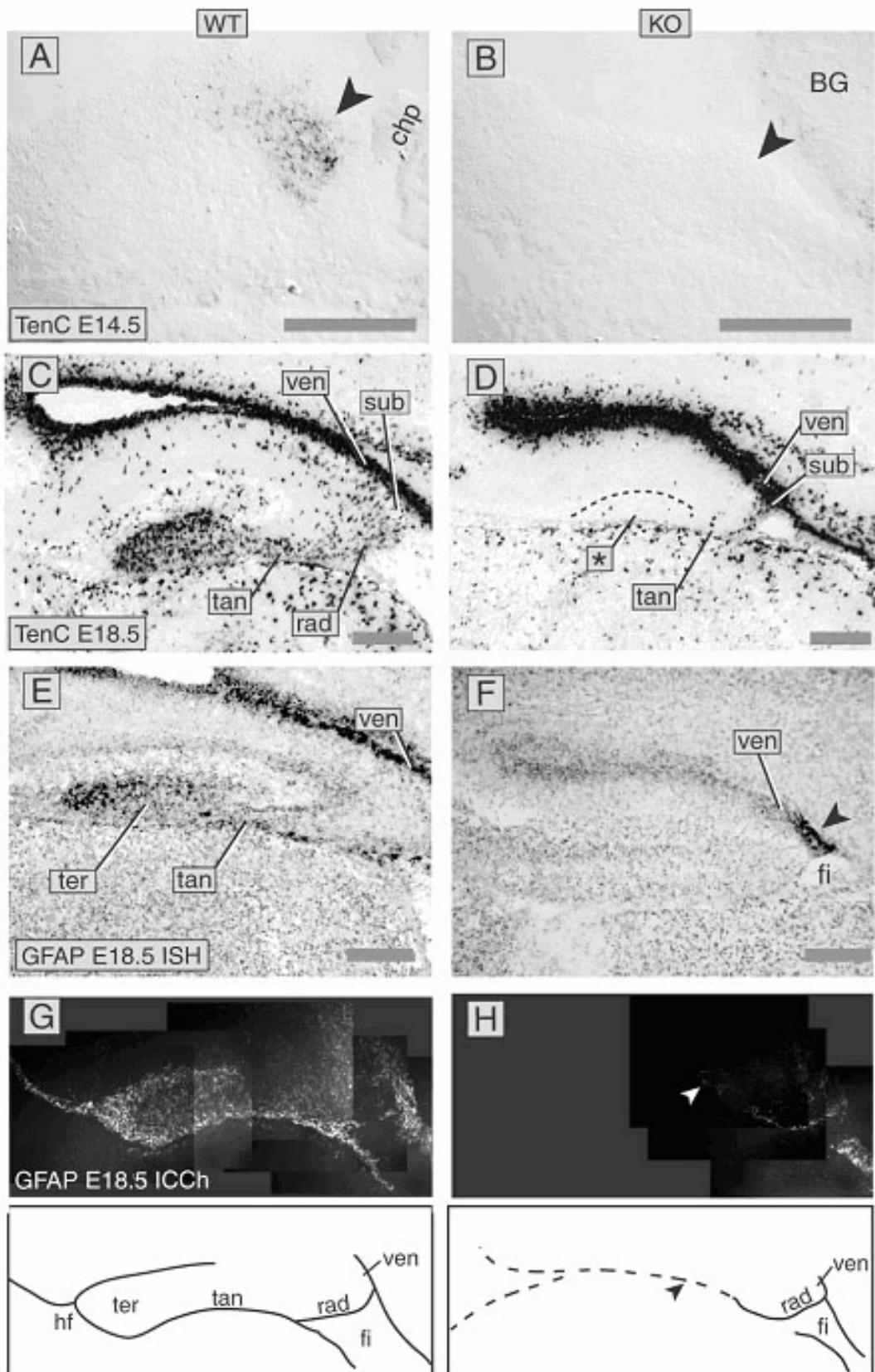


Abbildung 3.13: Astrozyten und ihre Vorläuferzellen zeigen in der *Emx2*-Mutante eine unterbrochene Migration. Abkürzungen: Stern, Region der hippocampalen Fissur; BG, Basalganglien; chp, Choroid Plexus; fi, Fimbria; hf, hippocampale Fissur; rad, radiale Migrationsstraße; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentielle Migrationsstraße; ven, ventrikuläre Schicht. Skalierung 200 μ m.

Nur wenige mit GFAP markierte Zellen wurden in der radialen Migrationsstraße der Mutante gefunden. Pfeile in Abb. 3.13 H und im Diagramm zeigen die Position der Astrozyten, die am weitesten vom Neuroepithelium entfernt detektiert wurden.

3.3.7 Körnerzellen brechen ihre Migration ab und akkumulieren in der tangentialen Migrationsstraße der Emx2-Mutante

Trotz der Abwesenheit von wandernden Vorläuferzellen zeigte die Calretininexpression (Abb. 3.7), dass Körnerzellen in der Mutante weiterhin produziert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Veröffentlichungen überein, die andere Marker benutzten (Tole et al., 2000). Die Frage war, ob diese Körnerzellen in der Mutante richtig spezifiziert bzw. ausdifferenziert sind.

Prox1 ist ein Transkriptionsfaktor, der über eine Homeobox verfügt (Oliver et al., 1993). Er wird spezifisch von Körnerzellen des Gyrus Dentatus exprimiert (Elliott et al., 2001). Im Wildtyp (E14.5) ist Prox1 schwach im hippokampalen Neuroepithelium exprimiert (Abb. 3.14 A). In der Mutante ist Prox1 nicht nachweisbar (Abb. 3.14 B).

Im Stadium E18.5 sind die ventrikuläre und subventrikuläre Schicht nicht mehr markiert, dafür zeigen die tangentiale Migrationsstraße und die tertiäre Matrix starke Prox1-Expression. In der Region der hippokampalen Fissur ist es abwesend (gestrichelte Linie in Abb. 3.14 C). Die Emx2-Mutante zeigt eine anomal starke Expression von Prox1 in der ventrikulären und subventrikulären Schicht (Abb. 3.14 D). Obwohl keine Prox1 exprimierenden Zellen in der radialen Migrationsstraße der Mutante detektiert wurden, formierte sich in der tangentialen Migrationsstraße eine anomal breite, Prox1 exprimierende Gruppe (Abb. 3.14 D).

NeuroD1 und NeuroD2 sind bHLH-Gene ohne proneurale Funktion (Bertrand et al., 2002). NeuroD1 wird in postmitotischen, unreifen Neuronen als früher Marker für neuronale Differenzierung exprimiert. Ist die Differenzierung zu Körnerzellen abgeschlossen (z.B. in der tertiären Matrix und in der frühen Körnerzellschicht), wird NeuroD2 exprimiert (Pleasure et al., 2000).

Im E18.5-Wildtyp zeigt NeuroD1 starke Expression in der subventrikulären Schicht, in den Migrationsstraßen und in der tertiären Matrix (Abb. 3.14 E), während NeuroD2 nur schwach in der tertiären Matrix exprimiert wird (Abb. 3.14 G). In der Mutante ist NeuroD1 ebenfalls stark exprimiert, aber die Expression beschränkt sich auf die subventrikuläre Schicht, die radiale Migrationsstraße und auf wenige Zellen, die bis in die tangentiale Migrationsstraße vorgedrungen sind (Abb. 3.14 F). NeuroD2, ein Marker gerade

differenzierter Zellen, ist im Gyrus Dentatus der Mutante komplett abwesend (Abb. 3.14 H). Tabelle 3.3 faßt die Expressionen im Wildtyp und in der Mutante zusammen.

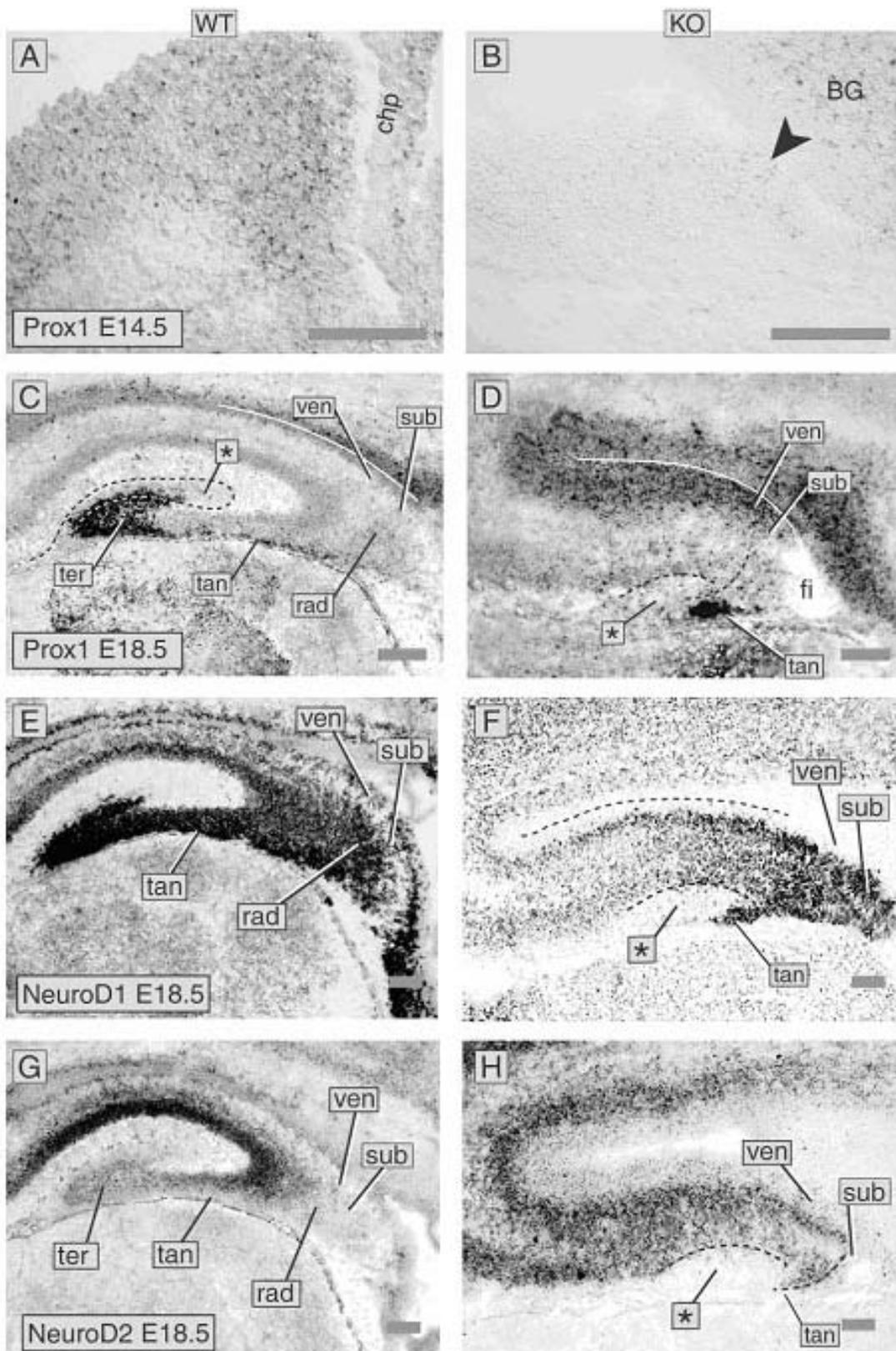


Abbildung 3.14: Expression von Prox1, NeuroD1 und NeuroD2 im Gyrus Dentatus

Abkürzungen: Stern, Region der hippocampalen Fissur; BG, Basalganglien; chp, Choroid Plexus; fi, Fimbria; rad, radiale Migrationsstraße; sub, subventrikuläre Schicht; tan, tangentielle Migrationsstraße; ven, ventrikuläre Schicht. Skalierung 200 μ m.

ter	tan	rad	subven	ven	Emx2 +/-
-	++	-	+	+	Mash1
++	++	++	++	+	Notch1
(+)	(+)	+	+	+	Delta1
-	++	+	++	++	Ngn2
++	++	++	++	++	Id3
++	+	+	+	++	Hes5
+++	+++	+++	+++	+++	Tenascin C
+++	++	-	-	-	Prox1
+++	+++	+++	++	+	NeuroD1
+	-	-	-	-	NeuroD2

tan	rad	subven	ven	Emx2 -/-
-	-	-	-	Mash1
-	-	++	++	Notch1
-	-	+	+	Delta1
-	-	++	++	Ngn2
-	-	-	+++	Id3
-	-	-	++	Hes5
	+	+++	+++	Tenascin C
+++	-	++	++	Prox1
+++	+++	+++	-	NeuroD1
-	-	-	-	NeuroD2

Tabelle 3.3: Expression der Marker im Wildtyp und in der Emx2-Mutante. Sehr niedrige, niedrige, mittlere und hohe Expressionsintensität wird durch (+), +, ++, +++ mit korrespondierenden Graustufen dargestellt. „Keine Expression“ wird durch ein Minuszeichen repräsentiert.

3.3.8 Die hippocampale Fissur fehlt im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante

Aus der Literatur ist bekannt, dass Emx2 nicht nur im Neuroepithelium, der Migrationsstraße und der tertiären Matrix, sondern auch entlang der hippocampalen Fissur exprimiert wird (Pellegrini et al., 1996). Aus diesem Grund wurde die Expression von Genen untersucht, die die hippocampale Fissur markieren, u.a. Lhx5, Reelin, Sdf1 und Cxcr4 (Abb. 3.15). Im Embryo des Stadiums E18.5 erreicht die Migration von Vorläuferzellen ihren Höhepunkt (Bagri et al., 2002), und die hippocampale Fissur entsteht. Deshalb wurde dieses Stadium für die *In Situ*-Hybridisierung gewählt.

Im Wildtyp werden Lhx5, Reelin und Sdf1(= Cxcl12) (Abb. 3.15 A, C, E) homogen in hoher Konzentration entlang der kortikalen Hirnhaut und in der hippocampalen Fissur exprimiert. In der Emx2-Mutante dagegen sind die Faktoren nur in der Hirnhaut und nicht mehr in Region der hippocampalen Fissur (Stern in Abb. 3.15 B, D, F) exprimiert. Reelin wird im Bereich der beginnenden Fissur aber noch exprimiert.

Cxcr4 wird ebenfalls in der Fissur detektiert, zeigt aber noch zusätzliche Expression in den Migrationsstraßen und der tertiären Matrix (Abb. 3.15 G). Dagegen ist es nicht in der Hirnhaut exprimiert. In der Mutante zeigt Cxcr4 Expression in den Migrationsstraßen, aber nicht im Bereich der hippocampalen Fissur (Abb. 3.15 H).

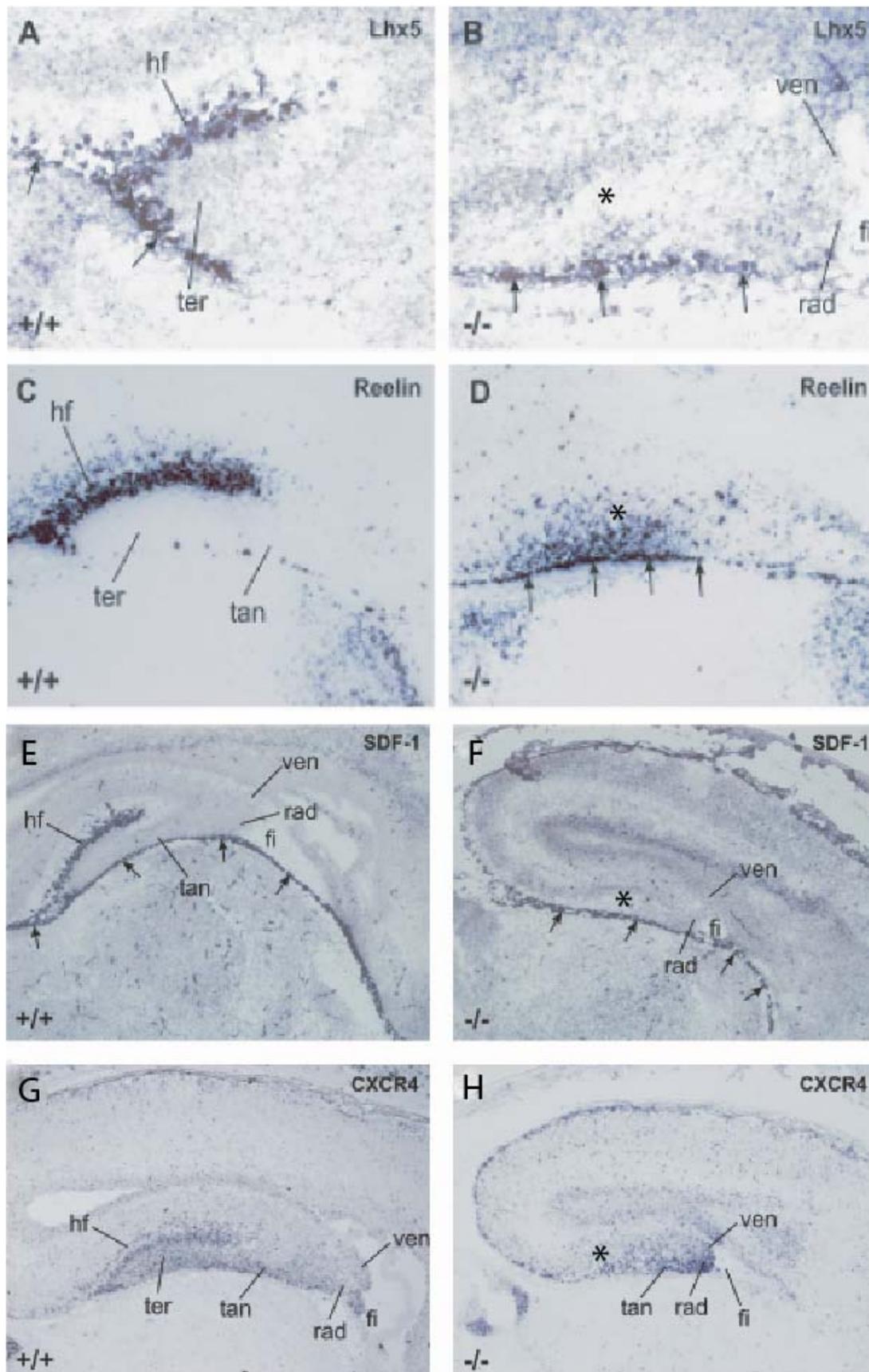


Abbildung 3.15: Faktoren der hippocampalen Fissur fehlen im Gyrus Dentatus der *Emx2*-Mutante
 Abkürzungen: Stern, Region der hippocampalen Fissur; hf, hippocampale Fissur; tan, tangential Migrationstraße; rad, radiale Migrationstraße; fi, Fimbria; ven, ventrikuläre Schicht

3.3.9 Alp, Pcp4 und Smad1 fehlen im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante

Durch das Testen verschiedener Kandidaten wurden drei Gene gefunden, die im Wildtyp, aber nicht in der Mutante exprimiert sind.

Bei dem ersten Kandidaten handelt es sich um Alp, aktinin-assoziiertes Lim-Protein. Es verfügt über eine N-terminale PDZ-Domäne und eine C-terminale LIM-Domäne. Es wird in der Skelettmuskulatur und in niedrigerer Konzentration im Herzen exprimiert. Die PDZ-Domäne von Alp interagiert mit Alpha-Actinin-2 (ACTN2) (Xia et al., 1997). Alp-Mutanten zeigen erweiterte Herzkammern und eine Dysfunktion derselben. Der Verlust der Alp-Funktion führt zur Destabilisierung der Aktin-Anheftung im kardialen Muskel (Pashmforoush et al., 2001).

Der zweite Kandidat ist Pcp4, *Purkinje Cell Protein*. Es wird im Gehirn hauptsächlich in zerebellaren Purkinje-Zellen exprimiert (Cabin et al., 1996) und zeigt spezifische Expression in Neuronen (Chen et al., 1996). Pcp4 hat die Möglichkeit Kalziumionen zu binden (Thomas et al., 2003).

Bei dem dritten Kandidaten handelt es sich um Smad1 (Name setzt sich aus Drosophila-Homologon Mad und dem C-elegans-Homologon Sma zusammen), Mitglied der Smad-Familie, die sich aus Signaltransduktions-Proteinen zusammensetzt. Die zentrale Rolle von Smad-Proteinen besteht in dem Weiterleiten von Signalen der Zelloberfläche zum Kern. Mitglieder der BMP-Familie (bone morphogenic protein) und die verwandten Mitglieder der *Transforming Growth Factor (TGF)- β* -Superfamilie leiten ihre Signale durch einen heterotetrameren Serin-Threonin-Kinaserezeptor weiter. Aktivierte BMP-Rezeptoren phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren Smad1, 5 oder 8, die wiederum mit Smad4 assoziieren. Der resultierende, heteromere Smad-Komplex transloziert in den Kern und reguliert die Transkription (Heldin et al., 1997). Ein Komplex aus Stat3 und Smad1, die mittels p300 interagieren wird durch kooperative Signale von Lf1 und BMP2 aktiviert und induziert die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Astrozyten (Nakashima et al., 1999).

Alp wird im Wildtyp des Stadiums E18.5 in der tangentialen Migrationsstraße, der tertiären Matrix und in der Körnerzellschicht exprimiert. In der Emx2-Mutante sind diese Expressionen verschwunden (Abb. 3.16 A, B).

Pcp4 wird in der hippokampalen Fissur und in der Hirnhaut exprimiert (Wildtyp, E18.5). Ausserdem sind einige markierte Zellen in der tertiären Matrix zu erkennen. Diese Expression wird ebenfalls in der Emx2-Mutante nicht mehr nachgewiesen. (Abb. 3.16 C, D).

Smad1 wird im E18.5-Wildtyp in der hippocampalen Fissur und schwach in der tertiären Matrix und in der tangentialen Migrationsstraße exprimiert. Diese Signale sind in der Emx2-Mutante komplett verschwunden (Abb. 3.16 E, F).

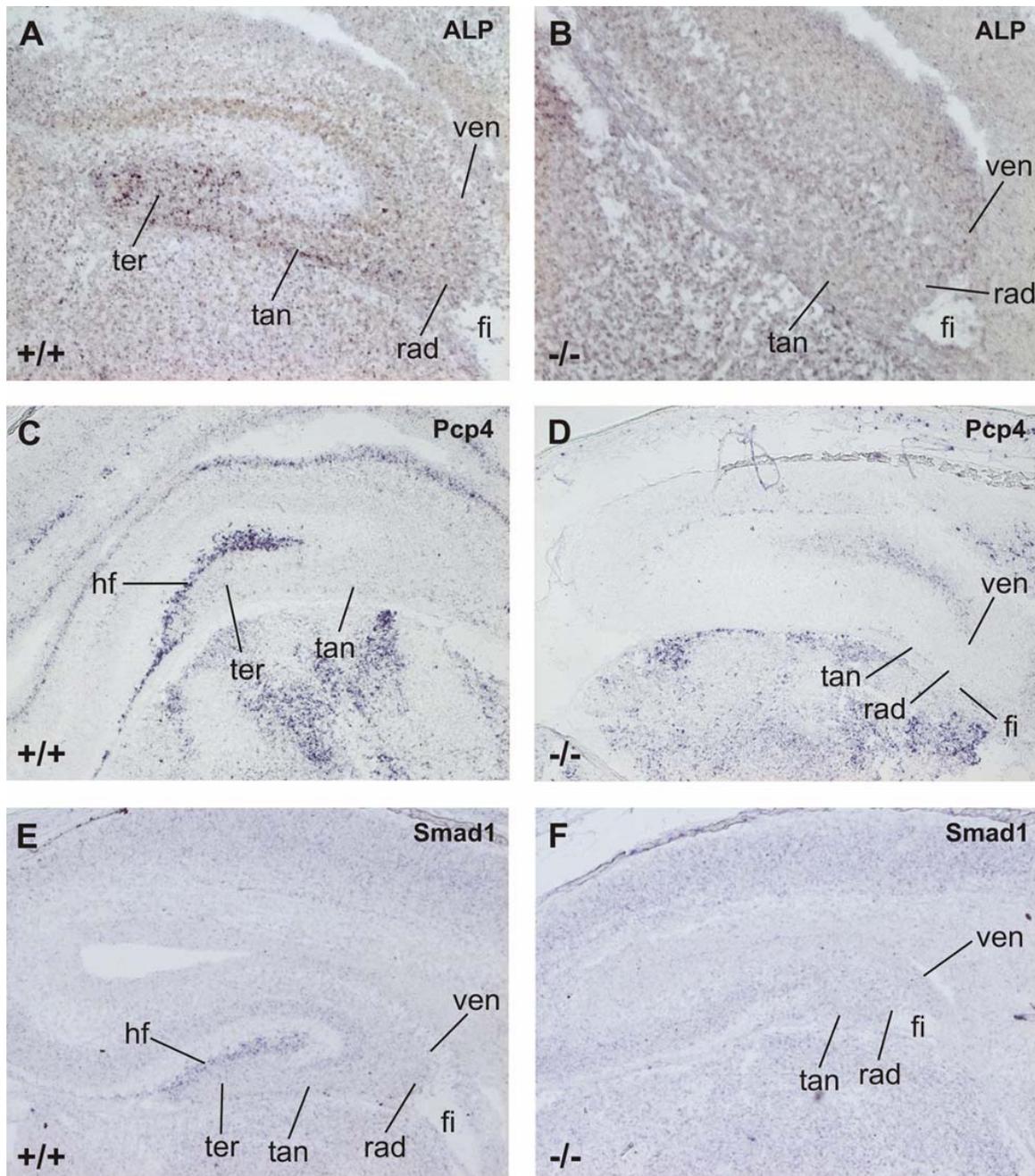


Abbildung 3.16: Alp, Pcp4 und Smad1 sind im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante nicht mehr exprimiert, unabhängig davon welches Muster sie im Wildtyp zeigen.

Abkürzungen: ven, ventrikuläre Schicht; rad, radiale Migrationsstraße; tan, tangentiale Migrationsstraße; ter, tertiäre Matrix; fi, Fimbria; hf, hippocampale Fissur

3.4 Pax6-Projekt

Die Expressionsdatenbank GenePaint (*genepaint.org*, Visel et al. 2004), Datenbank stellt viele molekulare Marker verschiedener Zelltypen und Geweben zur Verfügung. Unter den ungefähr 1000 Genen, die sich bis zum jetzigen Zeitpunkt in dieser Datenbank befinden, werden 341 regional im Neokortex der Maus (Stadium E14.5) exprimiert. Diese Kandidaten stellen ein ideales Werkzeug für die Analyse mutanter Mäuse mit anomal entwickeltem Kortex dar. Ein Beispiel ist der Kortex der *small-eye (sey)*-Maus, einem Allel des Pax6-gens. Um zur Aufklärung der Pax6-Kaskade in diesem Bereich beizutragen und den Einfluß von Pax6 auf die neuronale Migration während der Neokortexentwicklung aufzuklären, wurden sagittale Schnitte von *sey* und Wildtyp-Embryonen des Stadiums E15.5 auf die Expression dieser Markergene hin untersucht.

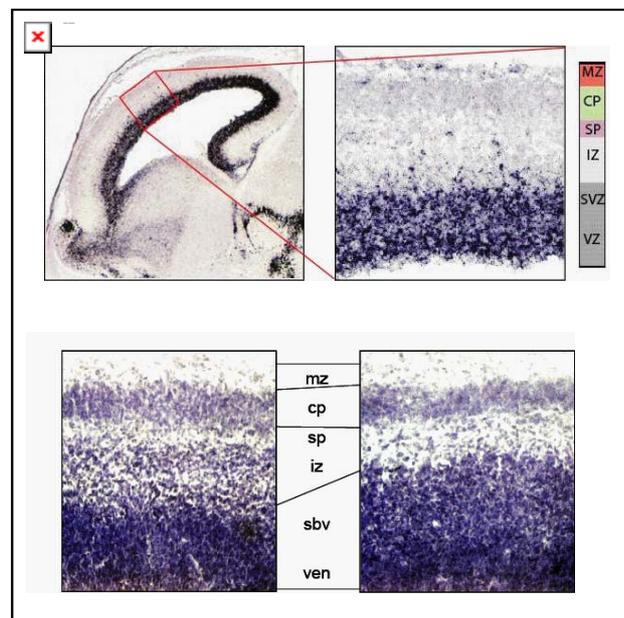


Abbildung 3.17 Pax6-Muster im Wildtyp.

A) Auf dem linken Bild ist das Telenzephalon eines E15.5-Mausembryos mit Pax6-Expression abgebildet. Pax6 wird hauptsächlich in der ventrikulären und subventrikulären Schicht des Neokortex exprimiert. Das rechte Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Neokortex. Rechts neben der Vergrößerung befindet sich ein Histologieschema B Nissl-Färbung des Neokortex eines E15.5-Wildtyps (links) und der Pax6-Mutante (rechts) Abkürzungen: mz, marginale Schicht; cp, kortikale Platte; sp, Subplatte; iz, intermediäre Schicht; svz, subventrikuläre Schicht; vz, ventrikuläre Schicht.

Von den 341 getesteten Genen zeigten 123 in der Mutante ein anderes Muster als im Wildtyp. Diese Muster lassen sich in unterschiedliche Kategorien einteilen: 1. Gene, deren Expression mit jener von Pax6 kolokalisieren, d.h. in der ventrikulären und/oder subventrikulären Schicht exprimiert werden. Diese Gene stehen potenziell direkt unter der Kontrolle von Pax6, 2. Gene, deren Muster auf histologische Veränderungen in den

anderen Schichten des Kortex zeigen, sowie 3. Gene, die keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden können.

Um die histologische Einordnung der dargestellten Ergebnisse zu erleichtern, wurde eine *In Situ*-Hybridisierung mit Pax6 auf E15.5-Wildtyp-Schnitten durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.17 A. Nach diesem Beispiel wurden alle anderen Ergebnisse dokumentiert. Zur weiteren Erleichterung der Einordnung der Expressionsmuster wurden vom Wildtyp und von der Pax6-Mutante des Stadiums E15.5 Nissl-Färbungen angefertigt. Auf diesen Färbungen sind deutliche Unterschiede in der Morphologie der beiden Genotypen erkennbar. So sind z.B die ventrikuläre und subventrikuläre Schicht auf Kosten der intermediären Schicht stark verbreitert (Abb. 3.17 B).

3.4.1 Die Expression einiger Kandidaten ist in der ventrikulären und subventrikulären Schicht verändert

Diese Gruppe umfasst insgesamt 53 Kandidaten (43%). Davon sind 33 in der ventrikulären Schicht und 20 in der subventrikulären Schicht exprimiert. Die Veränderungen im Expressionsmuster umfassen sowohl Regulierungen nach oben als auch nach unten.

So werden in der ventrikulären Schicht insgesamt 19 Kandidaten nach unten und 14 Kandidaten nach oben reguliert. In Abbildung 3.18 sind jeweils drei von ihnen dargestellt.

Zu den nach unten regulierten gezeigten Genen gehören die Transkriptionsfaktoren NeuroD4, Neurog1 und Neurog2. Sie fehlen in der ventrikulären Schicht der Pax6-Mutante. Weitere nicht dargestellte Kandidaten, die in der Pax6-Mutante nicht mehr exprimiert sind, sind Mup2, Gnai2, Catna1, Cbx1, Otx1 und Kif11. Die restlichen zu dieser Gruppe gehörenden Kandidaten sind in der ventrikulären Schicht der Mutante lediglich schwächer exprimiert als im Wildtyp. Dazu gehören: Riken-Klon 2810418N01, Arx; Atp5O, Bcan, Hip1, Itsn, Kpna4, Mif, Ndr2, Ptprd und Sema5a. Einzelheiten zu diesen wie zu allen anderen Kandidaten können der Tabelle 6.1 im Anhang entnommen werden. Zu den Genen, die in der ventrikulären Schicht der Pax6-Mutante nach oben reguliert wurden, gehören die in Abbildung 3.18 dargestellten Kifc5a, Cyln2 und CyclinD2. Sie zeigen alle eine verstärkte und diffusere Expression in der ventrikulären Schicht der Mutante als im Wildtyp. Diese Expression reicht teilweise bis in die subventrikuläre Schicht. Bei den nicht dargestellten Kandidaten handelt es sich um Atm, Chaf1, Cpsf5, Fgfr2 (s.Abb. 3.21), Fkbp3, Fzd8, Gadd45, Kif4, Odz3, Pde1b und Ptprl.

In der subventrikulären Schicht der Mutante sind 12 Kandidaten nach unten und 8 hochreguliert. Die nach unten regulierten Kandidaten zeigen eine deutliches, klar

abgegrenztes Signal im Wildtyp, welches in der Mutante nicht mehr vorhanden ist (Vgl. Abb. 3.19).

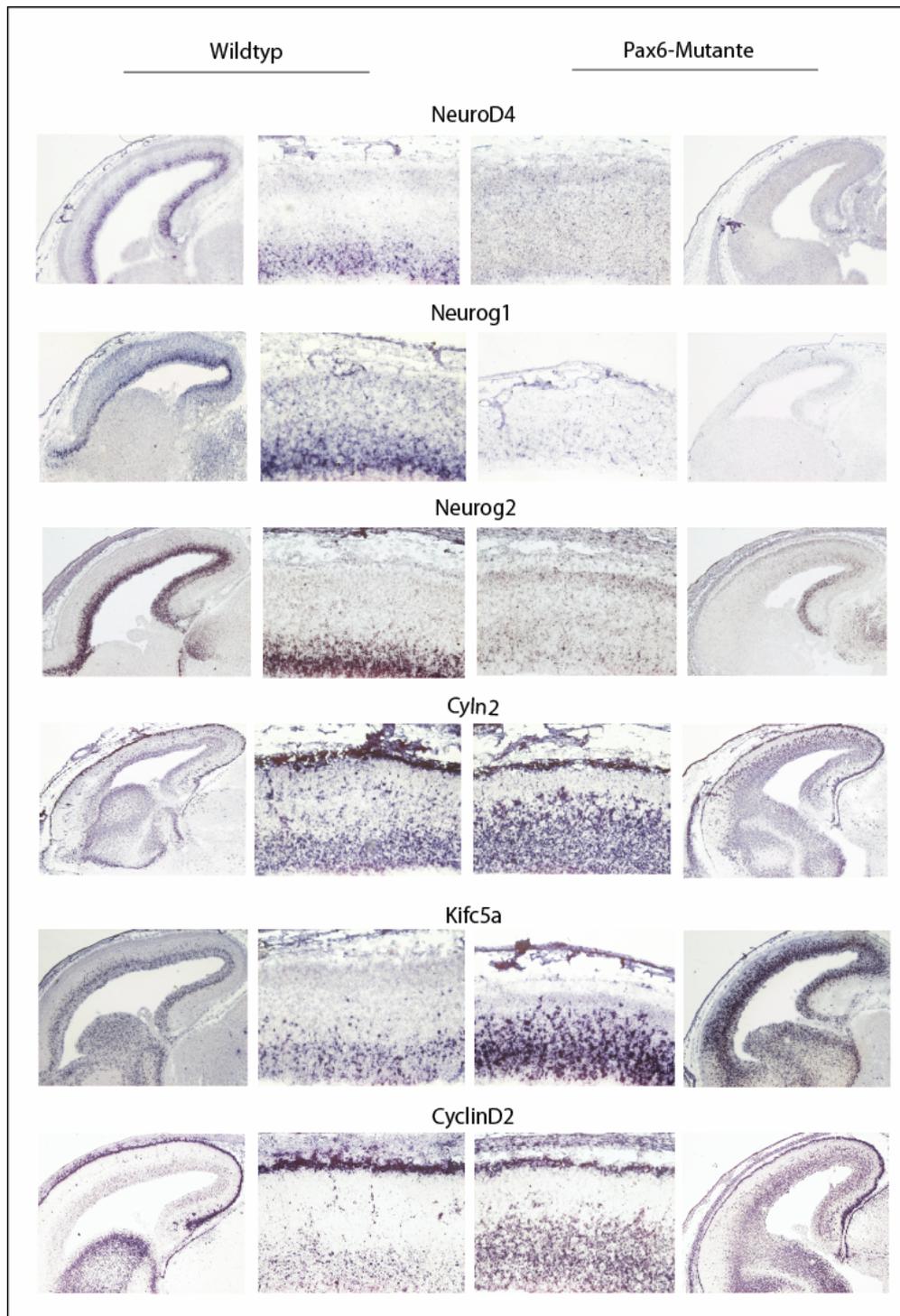


Abbildung 3.18: Kandidaten, die in der Pax6-Mutante in der ventrikulären Schicht verändert exprimiert sind. Auf der linken Seite finden sie jeweils die Bilder des Wildtyps (ganz links: gesamter Kortex; mitte links: Ausschnitt des Kortex). Auf der rechten Seite sind die Bilder der Pax6-Mutante dargestellt (mitte rechts: Ausschnitt des Kortex; ganz rechts: gesamter Kortex).

Bei den gezeigten Kandidaten handelt es sich um die Transkriptionsfaktoren NeuroD1 und NeuroD6 sowie um das Chemokin Cxcl12. Bei den nicht dargestellten Kandidaten handelt

es sich um Riken-Klone 2410004I17, Auts2, Enc1, Jmj, Lpl, Pde1c, Top2a und Trim9. Die Kandidaten, die in der subventrikulären Schicht hochreguliert werden, zeigen in der Mutante ein diffuses, weniger kompaktes Expressionsmuster als im Wildtyp. In Abb.

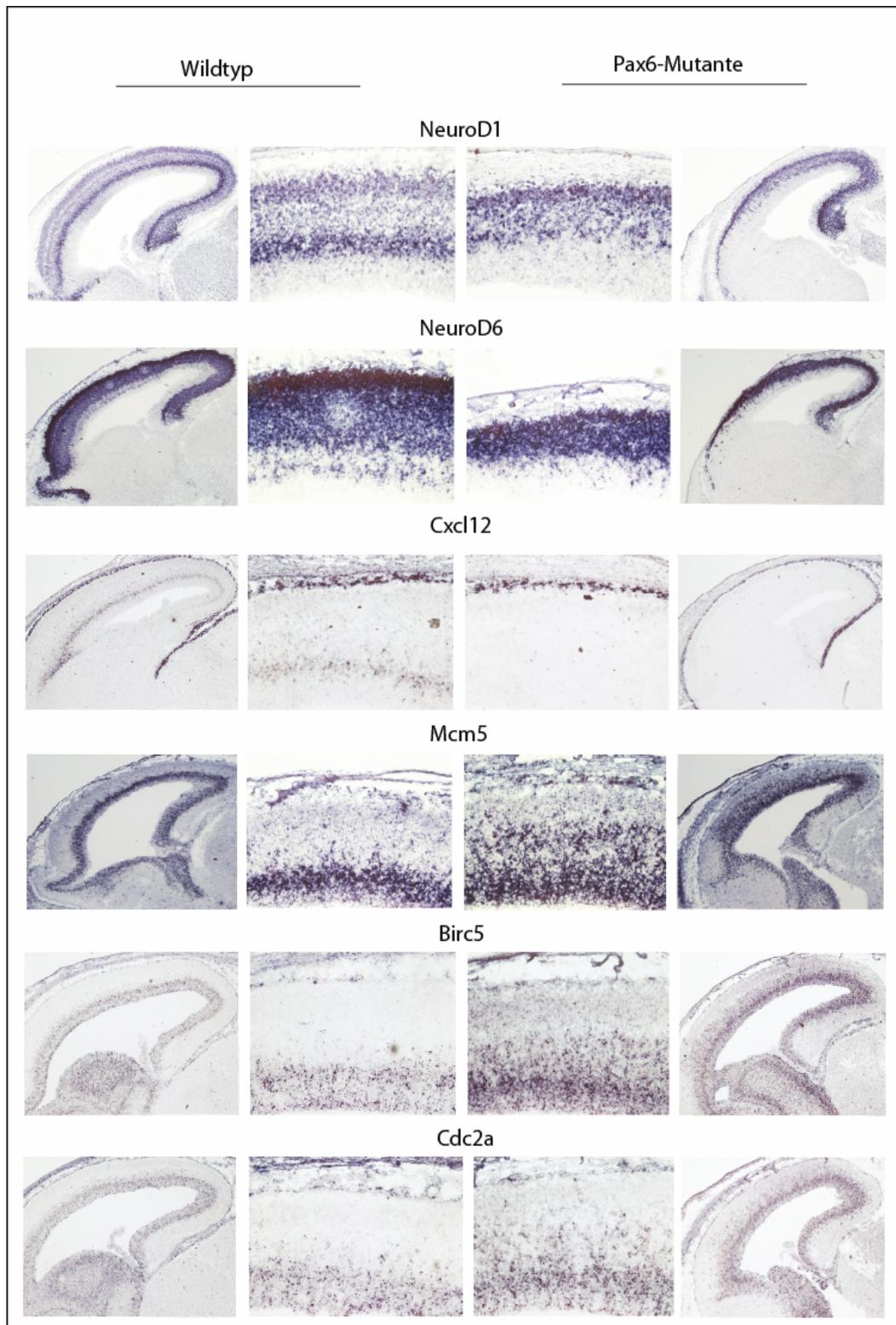


Abbildung 3.19: Kandidaten, bei denen die subventrikuläre Schicht in der Pax6-Mutante verändert ist. Auf der linken Seite finden sich jeweils die Bilder des Wildtyps (ganz links: gesamter Kortex; mitte links: Ausschnitt des Kortex) und auf der rechten Seite sind die Bilder der Pax6-Mutante dargestellt (mitte rechts: Ausschnitt des Kortex; ganz rechts: gesamter Kortex).

3.19 sind drei von Ihnen dargestellt. Dabei handelt es sich um Mcm5, Birc5 und Cdc2a. Bei den nicht dargestellten Kandidaten handelt es sich um D14Ert732e, FoxM1, NudC und Tmpo.

3.4.2 Die Expression ist in der intermediären Schicht der Pax6-Mutante hochreguliert

Unter den verschiedenen Veränderungen im Expressionsmuster zwischen Wildtyp und Mutante wurden zwei Kandidaten gefunden, die in der intermediären Schicht stark nach oben reguliert wurden (Abb.3.20). Bei diesen beiden Kandidaten handelt es sich um die Glutamatdecarboxylase Gad1 und den Transkriptionsfaktor Dlx2. Eine Regulation von Dlx2 durch Pax6 wurde bereits beschrieben (Toresson et al., 2000, Simpson und Price, 2002).

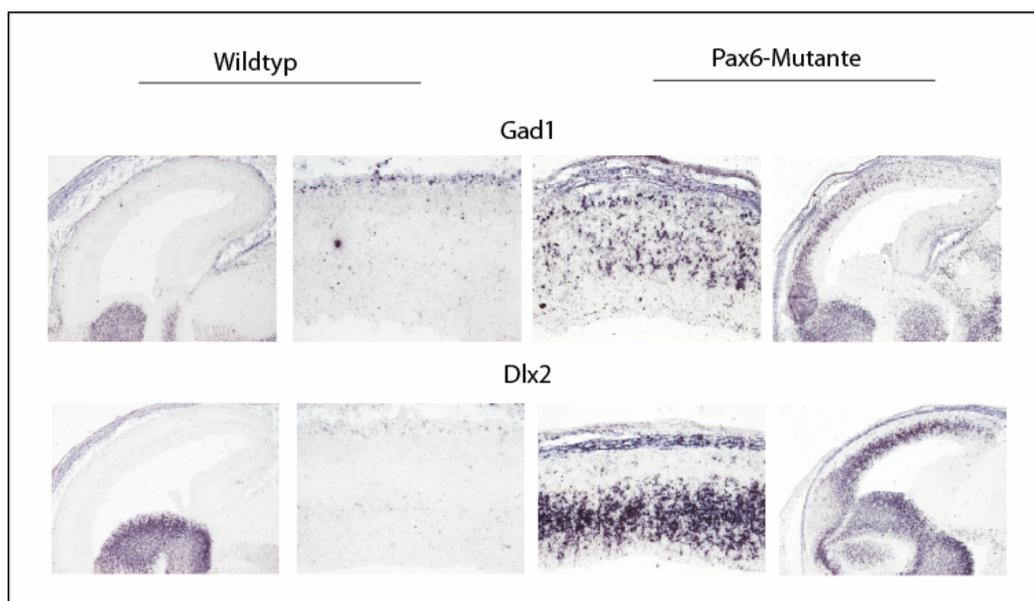


Abbildung 3.20: Gad1 und Dlx2 sind der intermediären Schicht der kortikalen Platte hochreguliert. Auf der linken Seite finden sich jeweils die Bilder des Wildtyps (ganz links: gesamter Kortex; mitte links: Ausschnitt des Kortex) und auf der rechten Seite sind die Bilder der Pax6-Mutante dargestellt (mitte rechts: Ausschnitt des Kortex; ganz rechts: gesamter Kortex).

3.4.3 Die Expression ist in der Subplatte der Pax6-Mutante verschwunden

Einige der Kandidaten zeigen im Wildtyp eine deutlich markierte Subplatte, die in der Pax6-Mutante verschwunden ist. Insgesamt wurden 17 Kandidaten gefunden bei denen die Subplatte nicht mehr zu erkennen ist. In der Abb. 3.21 sind 4 dieser Kandidaten dargestellt, die beiden Rezeptoren Fgfr1 und Fgfr2, der Transkriptionsfaktor Bhlhb5 und Lix1, dessen

Funktion noch nicht bekannt ist. Alle 4 Kandidaten zeigen eine deutliche Expression in der Subplatte unterhalb der ebenfalls markierten kortikalen Schicht. Die Expression in der Subplatte ist in der Mutante komplett verschwunden, während die anderen Schichten in ihrer Expression nicht stark verändert scheinen. Bei den nicht dargestellten Kandidaten handelt es sich um E26, Cdh9, Gabrb2, G3bp-pending, Riken-Klone 9130024F11, Cdh2, Cnil, Dab1, Nfia, Neurotrimin, Pde4a, Sema7a und Zfxlb.

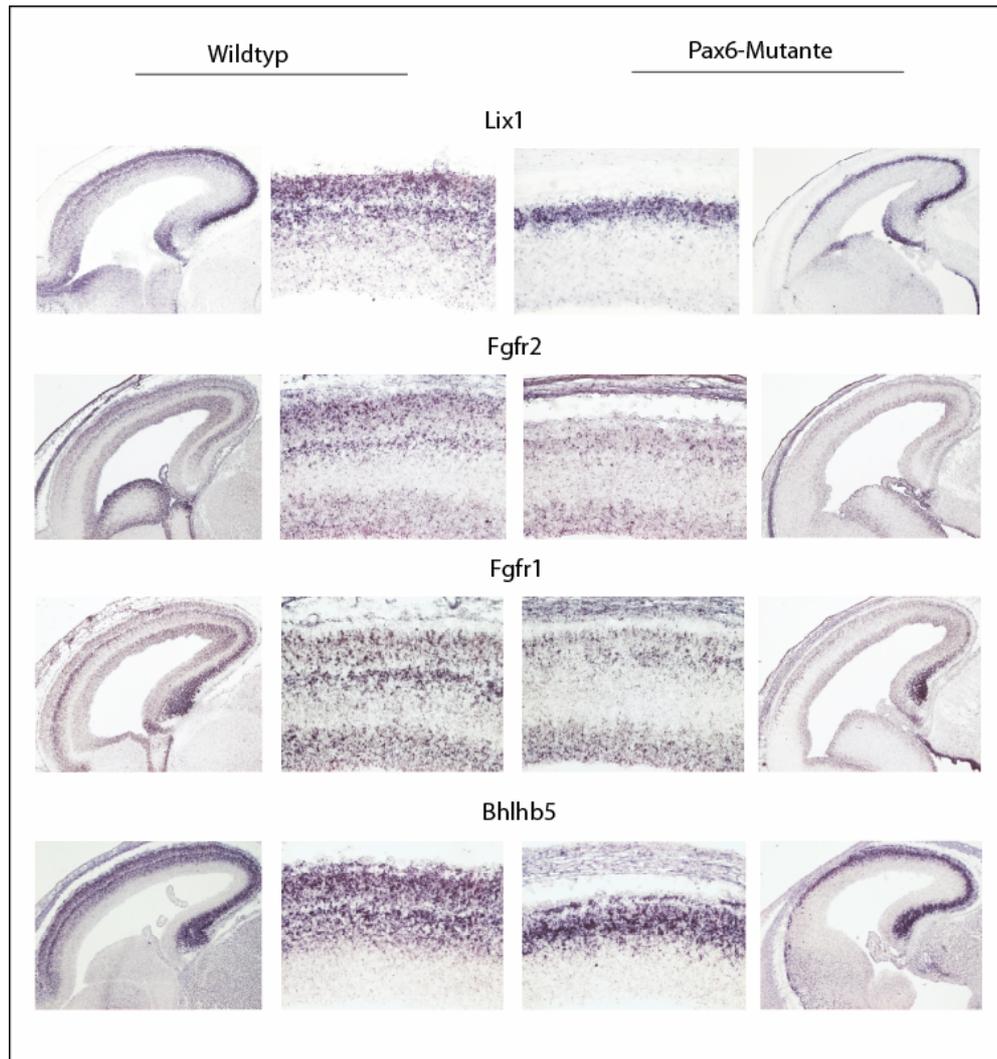


Abbildung 3.21: In der Pax6-Mutante ist die Subplatte nicht markiert.

Auf der linken Seite finden sich jeweils die Bilder des Wildtyps (ganz links: gesamter Kortex; mitte links: Ausschnitt des Kortex) und auf der rechten Seite sind die Bilder der Pax6-Mutante dargestellt (mitte rechts: Ausschnitt des Kortex; ganz rechts: gesamter Kortex).

3.4.4 Die Expression ist in der kortikalen Platte der Pax6-Mutante verändert

Die Gruppe von Kandidaten, deren Expression in der kortikalen Platte der Mutante verändert sind, umfaßt 17 Gene. 14 dieser Kandidaten werden nach unten, aber nur drei

hochreguliert. Die kortikale Platte erscheint in der Mutante dünner als im Wildtyp, unabhängig davon, wie die Expression verändert ist. Im Vergleich von Wildtyp und Mutante ist eine deutliche Reduzierung der Expression bei den dargestellten Kandidaten *Ngfr*, *Rorb* und *Sox5* in der kortikalen Platte zu erkennen (Abb 3.22). Bei den nicht dargestellten Kandidaten handelt es sich *Drd1a*, *EphA7*, *Gria1*, *Cdh11*, *Sst*, *Syt7*, *Pgrmc1*, *Sfrp2*, *Syt6* und *Ywhag*. Bei den 3 nach oben regulierten Genen handelt es sich um *Cdk5r2*, *Efnb3* und *Odz4* (Abb.3.22)

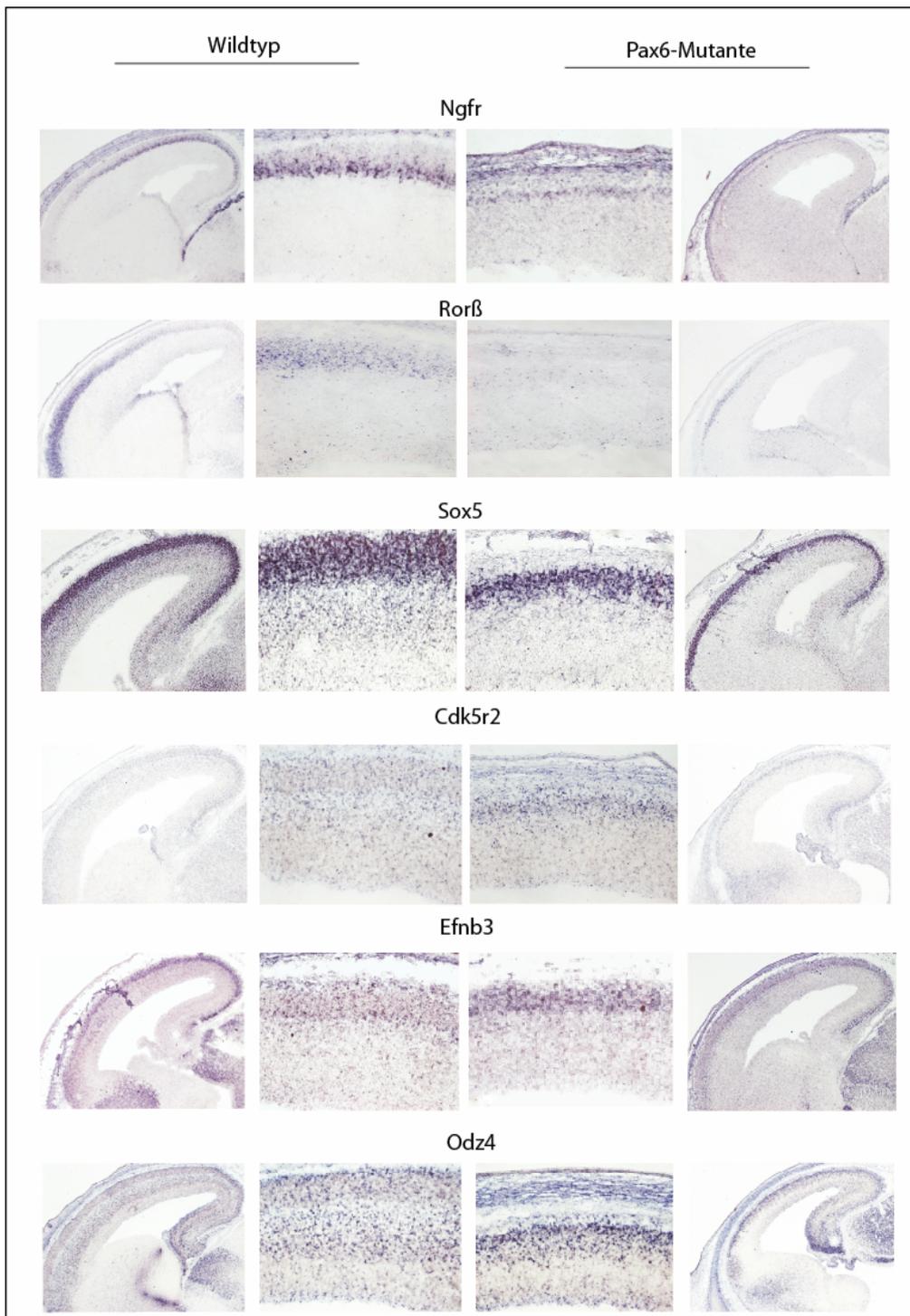


Abbildung 3.22: Kandidaten, die in der kortikalen Platte der Pax6-Mutante verändert sind

3.4.5 Die Expression nicht einzuordnender Kandidaten

Als Beispiel für Gene, die keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden konnten, werden hier *Cdh10*, *Pcp4* und *Adcy1* vorgestellt (Abb. 3.23). Die subventrikuläre Schicht zeigt bei *Cdh10* und *Pcp4* in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp eindeutig weniger Signal. Bei *Cdh10* scheint zusätzlich die Subplattenexpression reduziert zu sein. Bei *Pcp4* ist die Expression in der marginalen Schicht erhöht.

Die Expression der Adenylatzyklase (*Adcy1*) zeigt im Wildtyp eine starke, markierte Subplatte, die in der *Pax6*-Mutante keine Expression mehr zeigt. Die kortikale Platte in der Mutante erscheint schmaler, zeigt aber eine stärkere *Adcy1*-Expression als im Wildtyp.

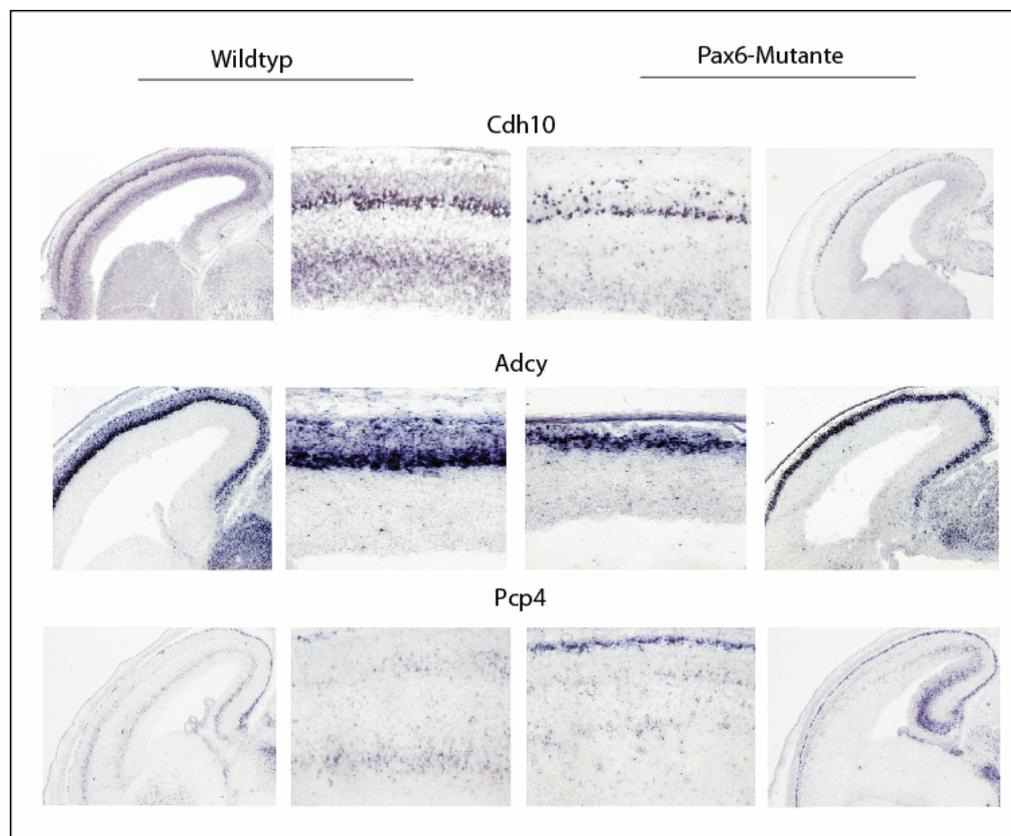


Abbildung 3.23: Kandidaten, die keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden können.

Auf der linken Seite finden sich jeweils die Bilder des Wildtyps (ganz links: gesamter Kortex; mitte links: Ausschnitt des Kortex) und auf der rechten Seite sind die Bilder der *Pax6*-Mutante dargestellt (mitte rechts: Ausschnitt des Kortex; ganz rechts: gesamter Kortex).

Zusammenfassend ergeben sich für die Histologie der *Pax6*-Mutante folgende Ergebnisse: Die germinale Schicht (ventrikuläre und subventrikuläre Schicht) zeigt den Verlust einer scharfen Grenze und Expansion des Expressionsmuster. In der Subplatte fehlen sämtliche Marker, die im Wildtyp deutlich exprimiert werden. Das legt die Vermutung nahe, dass die

Subplatte in der Mutante nicht mehr vorhanden ist. Die kortikale Platte ist dünner und verdichtet. Es fehlen viele Zellen, die spezifisch markiert sind.

Bei den mit Pax6 kolokalisierten Kandidaten handelt es sich hauptsächlich um Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsfaktoren, um Gene, die in den Zellzyklus und die Zellteilung verwickelt sind und um Faktoren des Transports. Es sind auch einige Kandidaten mit unbekannter Funktion darunter.

Es zeigt sich auch, dass der Ansatz der Kandidatensuche in *genepaint.org* in einem bisher unerreichten, effektiven Ausmaß Kandidatengene in Kaskaden indentifizieren kann.

4 Diskussion

4.1 Neurabin II als Interaktionspartner von DCX

Viele Proteine, die für die neuronale Migration benötigt werden, binden an das Zytoskelett (Gleeson und Walsh, 2000; Feng und Walsh, 2001). Beispiele dafür sind Doublecortin (Dcx), ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999) und Lis1, das Mikrotubuli stabilisiert (Sapir et al., 1997). Mutationen in Dcx und Lis1 verursachen beim Menschen schwere Defekte in der Zytoarchitektur des zerebralen Kortex. Die Ursache ist eine anomale neuronale Migration während der kortikalen Entwicklung. Neuronale Migration benötigt Mikrotubuli- und Aktinnetzwerke, aber es ist bisher nicht bekannt wie beide Komponenten miteinander interagieren, um gerichtete Zellbewegung zu produzieren (Walsh und Goffinet, 2000; Feng und Walsh, 2001).

Es konnte hier gezeigt werden, dass das mikrotubuli-assoziierte Protein Doublecortin mit Neurabin II interagiert. Neurabin II bindet durch eine N-terminale F-Aktin-Bindungs-Domäne an F-Aktin (Sato et al., 1998). Neben den in dieser Arbeit besprochenen Immunofluoreszenz- und *In Situ*-Hybridisierungsexperimenten zeigen Yeast Two-Hybrid-Assays, GST Pull Down-Assays, Immunopräzipitationsexperimente und Ko-Immunopräzipitationsexperimente in hippokampalen Neuronen des Mausgehirns (durchgeführt von Dr. Miki Tsukada und Alexander Prokscha) eine Interaktion dieser beiden Proteine (Tsukada et al., 2003). Die Arbeit deutet darauf hin, dass das Aktin- und das Tubulinzytoskelett in neuronalen Zellen durch ein Dcx-NeuII-Heterodimer miteinander verknüpft sind. Neben der Interaktion mit Neurabin II ist Doublecortin in der Lage, weitere Interaktionen einzugehen. Es bindet an Mikrotubuli, und ein C-terminal lokalisiertes Tetrapeptid dient als Bindungsstelle für die Untereinheit $\mu 1A$ des Adapter-Komplex AP-1 (Friocourt et al., 2001). Die Mikrotubuli- $\mu 1A$ -Dcx Interaktion eröffnet die Möglichkeit, dass Dcx an der Sortierung von Proteinen oder am vesikulären Transport beteiligt ist (Friocourt et al., 2001).

Ein Argument für die funktionelle Interaktion zwischen Dcx und Neurabin II wäre eine *in vivo* Interaktion und Koexpression dieser beiden Proteine. Die *In Situ*-Hybridisierung embryonaler, postnataler und adulter Gehirnschnitte zeigen die Koexpression von Dcx und Neurabin II in der Entwicklung und auch im adultem Gehirn. Obwohl die Expression von Neurabin II in den Stadien E14.5 und E18.5 niedrig ist, zeigen die *In Situ*-Hybridisierungen Expressionen dieses Gens in einer Neuronenschicht, die am äußeren

Rand der kortikalen Platte lokalisiert ist. Es ist bekannt, dass Dcx in dieser Schicht eine starke Expression zeigt (Gleeson et al., 1999).

Die Yeast-Two-Hybrid Analyse zeigte ausserdem, dass einige humane Dcx-Mutationen (Q235X und D246X) die Interaktion mit Neurabin II aufheben. Die Abwesenheit dieser Interaktion führt vielleicht zu Lissenzephalie und SCLH. Die beiden Mutationen binden auch nicht an μ 1A. Der Lissenzephalie-Phänotyp könnte daher durch eine fehlende Bindung von Neurabin II und μ 1A an Dcx entstehen.

Eine weiteres wichtiges Resultat ist die Koexpression von Dcx und Neurabin II im postnatelem und adultem Gehirn. Es gibt mehrere Hinweise, dass Dcx in migrierenden Neuronen des ZNS (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999) und der rostralen Migrationsstraße stark exprimiert wird (Gleeson et al., 1999; Nacher et al., 2001). Immunohistochemische Studien demonstrieren, dass Neurabin II stark in dendritischen Dornen (dendritic Spines) hippocampaler Neuronen exprimiert wird. Junge Mäuse denen Neurabin II fehlt, verfügen über eine erhöhte Zahl dendritischer Dornen (Allen et al., 1997; Feng et al., 2000). In diesen Mäusen ist die Größe des Hippokampus reduziert und sie zeigen einige Defekte in der hippocampalen Funktion. Dazu gehört die Reduktion der Langzeit-Abschwächung aufgrund einer Fehlregulation eines Glutamat-Rezeptors (Feng et al., 2000). Die *In Situ*-Hybridisierung zeigt eine teilweise Überlappung der Expression von Neurabin II und Dcx im Hippokampus des Stadiums P7. Diese Überlappung deutet darauf hin, dass die beiden Proteine gemeinsam im Hippokampus wirken können. Damit übereinstimmend sind Dcx und Neurabin II in hippocampalen Neuronen kolokalisiert. Im Gegensatz zu den massiven Fehlbildungen bei Menschen, denen funktionelles Dcx fehlt, zeigt die Dcx-Mutante keine Fehlbildungen außerhalb der CA3-Region des Hippokampus (Corbo et al., 2002). Ob die Fehlbildungen in der Dcx-Mutante und die Veränderungen in der Morphologie der dendritischen Dornen der NeurabinII-Mutante miteinander in Beziehung, stehen muss noch untersucht werden. Es ist möglich, dass Dcx durch die Interaktion mit Neurabin II die Ausbildung der Dendriten steuert.

Die Funktionen des Dcx-NeurabinII-Komplexes erfordern weitere Untersuchungen. Fungiert der Dcx-NeurabinII-Komplex als Zytolinker-Protein, der das Aktin- und Mikrotubuli-Netzwerk miteinander verbindet wie der *Microtubule-Actin-Cross-linking Factor* (MACF) der Plakin-Familie (Leung et al., 1999, 2002; Sun et al., 2001)? Um diese Frage zu klären, könnte z.B. ein F-Aktin *Spin Down* Assay durchgeführt werden. Der Nachweis von Mikrotubuli in der gleichen Fraktion wie Aktin, sprächen für eine Zytolinker-Funktion. Weiterhin müssen die biochemischen und zellulären Grundlagen der Dcx-NeurabinII-Interaktion genauer analysiert werden.

4.2 RanBPM als möglicher Interaktionspartner von Lis1

Eine Interaktion zwischen RanBPM und Lis1 könnte den Prozeß der neuronalen Migration in Zusammenhang mit Zellzyklus, Mikrotubulinukleation und nuklearer Translokation bringen und so die Aufklärung der Mechanismen der neuronalen Wanderung voranbringen. Wie in der Einleitung, erläutert bindet Lis1 an Tublin, Dynein, Dynaktin und scheint die Dynamik von Mikrotubuli während der neuronalen Migration durch diese Proteine zu steuern (Sapir et al., 1997; Faulkner et al., 2000; Smith et al., 2000). Bei RanBPM handelt es sich um ein zentrosomal lokalisierte Protein (Nakamura et al., 1998) Das Zentrosom ist ein aus Proteinen bestehendes Zellkörperchen, das bei der Teilung, der Formgebung und Bewegung von Zellen benötigt wird. In jeder Zelle ist es in einer bzw. kurz vor der Teilung zwei Kopien vorhanden und organisiert das Mikrotubuli-Zytoskelett und die Zellteilung. Eine Verbindung von Lis1 zum Zentrosom durch RanBPM, würde Lis1 direkt mit Mitose und Zellzyklus in Verbindung bringen, die für das Gelingen der neuronalen Migration eine wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel „Zellzyklus und Proliferation“) Eine indirekte Verbindung von Lis1 zum Zentrosom wurde bereits durch die Interaktion mit mNudE nachgewiesen, das zusätzlich spezifische Proteine des Zentrosoms bindet (Feng et al., 2000).

RanBPM wurde als Interaktionskandidat aus einem „*Yeast-Two-Hybrid library screen*“ mit Lis1 als Köderprotein selektiert. Um eine Interaktion zwischen RanBPM und Lis1 zu validieren, wurden Hefe-Zwei-Hybrid-Assays, GST Pull Downs und Immunopräzipitationen durchgeführt

Die Motivation für diese weiteren Untersuchungen stütze sich auf die Erkenntnis, dass es sich bei RanBPM um ein zentrosomal lokalisiertes Protein handelt (Nakamura et al., 1998). Als unsere Experimente weitgehend abgeschlossen waren, erschien ein Artikel der gleichen Arbeitsgruppe (Nishitani et al., 2001), der vorherige Aussagen über die Lokalisation von RanBPM korrigierte. Das ursprünglich beschriebene 55 kDa große RanBPM stelle trankiertes Protein dar. Das eigentliche Protein sei 90 kDa groß und im Nukleus, sowie in einer das Zentrosom umgebenden Zytoplasmaregion lokalisiert, aber nicht im Zentrosom selbst (Nishitani et al. 2001). Diese Aussage ändert zwar nichts an den Ergebnissen, aber es sei darauf hingewiesen, dass unsere Versuche mit der 55 kDa-Version durchgeführt wurden.

Der YTH-Assay, der das Ergebnis des *library screens* bestätigen sollte, führte zu einem uneinheitlichen Ergebnis. Der eigentliche Assay wies auf eine Interaktion zwischen RanBPM und Lis1 hin, während auf einer Kontrollplatte Kolonien wuchsen, die für eine

unspezifische Aktivierung des Reporters durch RanBPM sprachen. Direkte Interaktionen zwischen einem Kandidaten und der stromaufwärts liegenden aktivierenden Sequenz im Reporterkonstrukt finden immer wieder statt. Solche Aktivierungen weisen auf einen „falsch-positiven“ Kandidaten hin (Stephens und Banting, 2000).

Um „falsch-positiv“ Kandidaten auszuschließen, sollten auch positiv ausfallende YTH-Assays grundsätzlich durch alternative, nicht auf Hefe basierende Interaktionsassays, überprüft werden. Erst solche Tests gelten als Bestätigung für eine tatsächliche Interaktion.

Eine dieser Methoden ist der GST Pull Down. Dabei werden die beiden rekombinanten Proteine in relativ hohen Konzentrationen exprimiert, was eine mögliche Interaktion erleichtert, aber nicht immer die tatsächliche Situation in eukaryotischen Zellen widerspiegelt. Das Ergebnis des GST Pull Downs konnte eine Interaktion zwischen RanBPM und Lis1 trotz der Überexpression nicht belegen.

Eine weitere Methode, eine Interaktion zwischen zwei Proteinen zu validieren, ist die Koimmunopräzipitation der interagierenden endogenen Proteine aus der Zellkultur. Auch die Ergebnisse dieses Experiments sprechen nicht für eine Interaktion von Lis1 und RanBPM, ebenso wenig wie Immunofluoreszenzversuche, die keine Kollokalisierung zeigten (Daten nicht gezeigt). Alle hier durchgeführten Experimente wurden mehrfach wiederholt und führten immer zu den gleichen Ergebnissen.

Zusammengefasst sprechen unsere Ergebnisse deshalb dafür, dass keine Interaktion zwischen RanBPM und Lis1 vorliegt. Desweiteren scheint es sich bei RanBPM um einen „falsch-positiven“ Kandidaten im YTH-Screen zu handeln, was das positive Ergebnis des Library Screens erklären würde.

4.3 Pax6 in der neuronalen Migration des Neokortex

Bei dem Pax6-Projekt handelt es sich um ein noch nicht abgeschlossenes Projekt mit dem Ziel, die Pax6-Signalkaskade im Neokortex aufzuklären. Zum derzeitigen Standpunkt können wir aufgrund der Art der beteiligten Gene vermuten, wie der beschriebene Phänotyp der Pax6-Mutante zustande kommt. Um auf molekularer Ebene eine Kaskade zu erstellen, müssen z.B. Protein-DNA-Interaktionstests folgen. Bei den mit Pax6 kollokalisieren Kandidaten handelt es sich hauptsächlich um Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsfaktoren, um Gene, die in den Zellzyklus und die Zellteilung verwickelt sind, um Faktoren des Transports und um Oberflächenkomponenten (extrazelluläre Matrixmoleküle, Rezeptoren etc.). Es sind auch einige Kandidaten mit unbekannter Funktion darunter.

Mit Hilfe von *In Situ*-Hybridisierungen wurden Gene identifiziert, die mit Pax6 kollokalisieren und in der Pax6-Mutante eine veränderte Expression zeigen, also potenziell

direkt unter der Kontrolle von Pax6 stehen. Ausserdem wurden Gene gefunden, die in Schichten des Kortex Veränderungen zeigten in denen Pax6 selbst nicht exprimiert ist, es sich deshalb vermutlich um sekundäre Folgeerscheinungen der Mutation handelt. Die hier angewandte *In Situ*-Hybridisierung ist keine quantitative Methode. Im Fall eines kompletten Verlusts der Expression sind die Daten eindeutig, aber graduelle bzw. qualitative Veränderungen in der Expression, die bei einigen Markern gefunden wurden, müssen durch andere Methoden validiert werden. Mittels quantitativer PCR lassen sich diese Ergebnisse bestätigen.

Wenn man die Veränderungen der Expressionsmuster mit der Histologie vergleicht, beobachtet man den Verlust einer scharfen Grenze in der germinalen Schicht (ventrikuläre und subventrikuläre Schicht). Ausserdem ist die Subplatte morphologisch nicht mehr vorhanden und die kortikale Platte erscheint kondensiert.

Die Veränderungen in der germinalen Schicht lösen die primären, zellautonomen Effekte aus. Aus der Literatur ist bekannt, dass Pax6 einen zellautonomen Effekt auf die

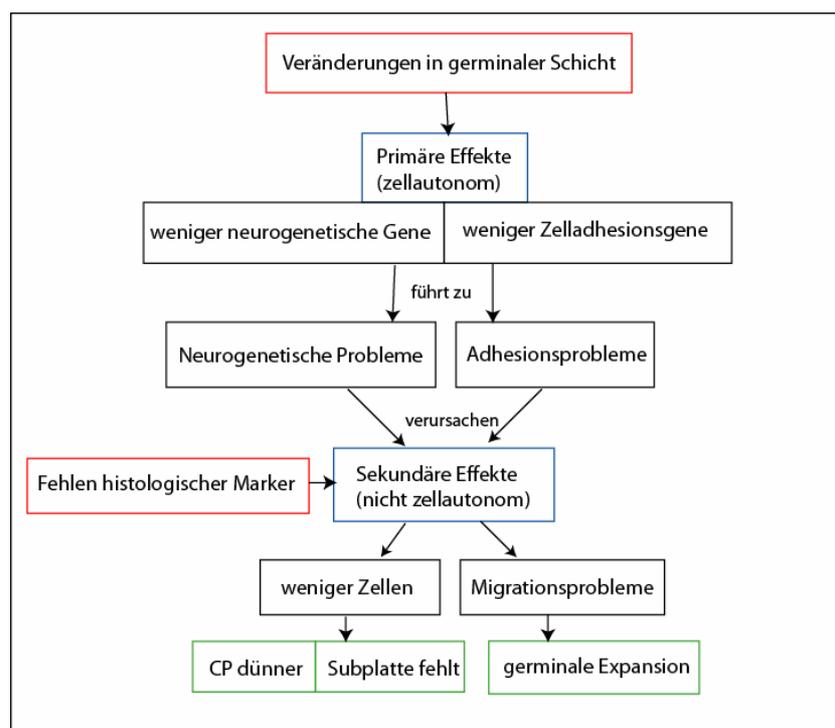


Abbildung 4.1: Vermutete von Pax6-defizienten Zellen ausgelöste Effekte auf die Entwicklung des Neokortex. Der gefundene histologische Phänotyp ist grün umrandet. Der Phänotyp wird dargestellt durch das Fehlen histologischer Marker und Veränderungen in der germinalen Schicht (rot umrandet). Diese führen zu den primären und sekundären Effekten (blau umrandet).

Adhäsionseigenschaften von kortikalen Zellen zeigt (Tyas et al., 2003). Sind diese gestört, kann es zu Migrationsproblemen kommen, die dann das diffusere, weniger kompakte Expressionsmuster gewisser Markergene in der Mutante erklären. Bei einem genaueren Blick auf die Klasse der veränderten Gene zeigt sich, dass die Expressionsmuster einiger

Adhäsionsgene in der germinalen Schicht verändert sind. Dass die Zelladhäsionsgene in der Mutante vermindert sind, ist ein primärer Effekt, der zu Migrationsproblemen führen kann.

Analysiert man die sekundären Effekte, wie das Verschwinden der Subplatte und die Kondensation der kortikalen Platte, erkennt man einen weiteren primären Effekt, der diesen sekundären erklären kann. Dabei stellt sich heraus, dass in diesen Schichten weniger Zellen vorhanden sind, d.h. es werden weniger Zellen produziert, sind beschädigt oder nicht richtig differenziert und aufgrund dessen nicht in der Lage sich zu teilen oder dementsprechende Marker zu exprimieren. Teilung und Differenzierung sind Teil der Neurogenese. Es handelt sich dementsprechend um ein neurogenetisches Phänomen. Betrachtet man die Funktion der Gene, die in der germinalen Schicht in der Mutante verändert sind, bemerkt man, dass darunter viele Gene sind, die die Neurogenese steuern. Der zweite primäre Effekt besteht also aus einer Verminderung der Expression neurogenetischer Gene. Die sekundären Effekte wurden durch das Fehlen histologischer Marker identifiziert (zur Verdeutlichung der hier beschriebenen Kaskaden siehe Abb. 4.1). Mehrere Arbeiten unterstützen die oben aufgestellten Thesen über mögliche Pax6-Kaskaden. So befürworten Talamillo und Kollegen (2003) eine fundamentale Rolle von Pax6 während der Neurogenese in der Regulation von Zelloberflächenkomponenten und damit eine Regulation der neuronalen Migration über Adhäsion. Sie zeigten auch, dass Pax6 eine zellautonome Rolle in migrierenden Neuroblasten übernimmt, indem Pax6-defiziente Zellen an der Grenze zwischen subventrikulärer und intermediärer Schicht akkumulieren und diese Zusammenlagerungen postmitotische neuronale Vorläuferzellen enthalten.

Einen weiteren Zusammenhang zwischen Pax6 und Adhäsionsgenen bzw. neurogenetischen Genen lieferten Götz und Kollegen (1998). In Pax6-defizienten Mäusen sind die kortikalen radialen Gliazellen in ihrer Morphologie, Anzahl, Tenascin-C-Expression und in Zellzyklusregulation verändert. Einige dieser Änderungen sind zellautonom (Götz et al., 1998). Daraus schließen die Autoren, dass Pax6 eine essenzielle Rolle in der Differenzierung der kortikalen radialen Gliazellen spielt. Sind diese nicht in der Lage, ihre Funktion auszuüben, kommt es zu einer fehlerhaften Migration. Radiale neuronale Migration zur kortikalen Platte involviert verschiedene Prozesse wie Neuron-Glia-Erkennung, Neuron-Glia-Adhäsion, aktive Migration ebenso wie die Beendigung derselben Migration wenn das Neuron die korrekte Lokalisation erreicht hat (Talamillo et al., 2003). Für diese Prozesse sind Adhäsion und Neurogenese also essenziell. Die oben angeführten Veränderungen lassen sich genau wie die von uns beobachteten Defekte auf

das Fehlen von Transkription bestimmter Genarten zurückführen: Adhäsionsmoleküle, neuronale Determinationsgene und neurogenetische Gene (Götz et al., 1998).

Eine weitere beobachtete Veränderung ist in der Literatur bekannt. Die ektopische Expression von *Dlx2* und *Gad1* in der intermediären Schicht wird durch Abwesenheit von *Pax6* ausgelöst. Einige tangential migrierende Vorläuferzellen werden durch die Expression von *Pax6* daran gehindert das ventrale Telenzephalon zu verlassen. Ist *Pax6* nicht vorhanden, kommt es zu einer Einwanderung der Zellen in das dorsale Telenzephalon (Toresson et al., 2000, Simpson und Price, 2002).

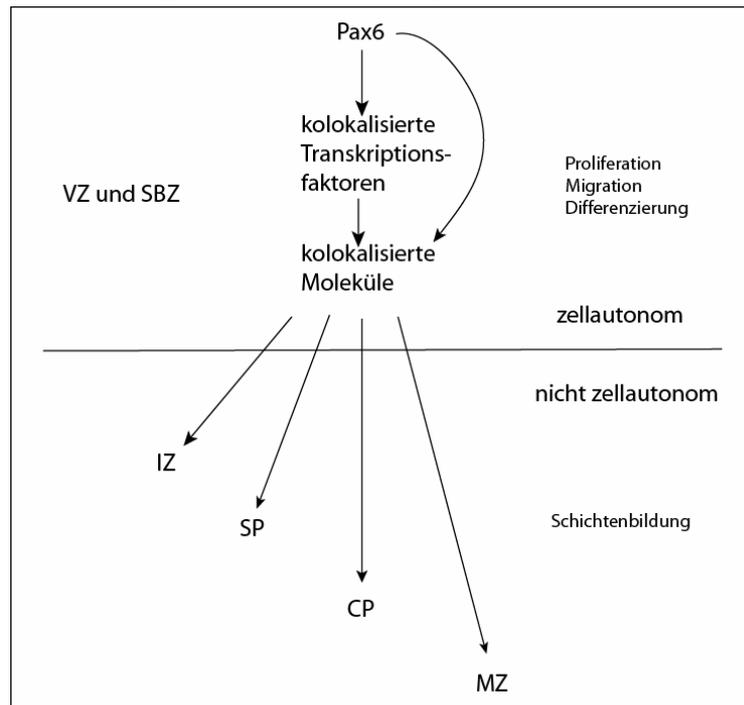


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Pax6 im Kortex

Pax6 kontrolliert kolokalisierte Transkriptionsfaktoren und kolokalisierte Signalproteine in der ventrikulären und subventrikulären Schicht. Letztere könnten auch von den anderen Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden. Es handelt sich dabei vor allem um Adhäsionsfaktoren, um Gene, die in den Zellzyklus und die Zellteilung verwickelt sind, um Faktoren des Transports und um Oberflächenkomponenten (extrazelluläre Matrixmoleküle, Rezeptoren). Als kolokalisierte Transkriptionsfaktoren mit veränderter Expression wurden folgende Gene identifiziert: *Arx*, *Atm*, *Cbx1*, *NeuroD1*, *NeuroD4*, *NeuroD6*, *Neurog1*, *Neurog2*, *Otx1*; Folgende Gene sind verändert und kolokalisiert: *Bcan*, *Birc5*, *Catna1*, *Ccnd2*, *Cdc2a*, *Chaf1a*, *Cpsf5*, *Cyln2*, *D14Ert732e*, *Dab1*, *Enc1*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Gnai2*, *Hip1*, *Kifc5a*, *Kpna4*, *Lpl*, *Mcm5*, *Mup2*, *Ndr2*, *NudC*, *Odz3*, *Pcp4*, *Pde1b*, *Prprl*, *Reelin*, *Rik2410004I17*, *Rik2810418N01*, *Sema5a*, *Sfrp2*, *Tmpo*, *Trim9*. Hier sind nur Gene der Kategorien A und B aufgeführt (siehe Tabelle 8.1).

Abkürzungen: VZ, ventrikuläre Schicht; SVZ, subventrikuläre Schicht; IZ, intermediäre Schicht; Sp, Subplatte, CP, kortikale Platte, MZ, marginale Schicht.

Für die Aufgabe von Pax6 im Wildtyp ergibt sich folgendes Bild: Pax6 kontrolliert in der germinalen Schicht untergeordnete Transkriptionsfaktoren und Effektoren, die zelluläre Abläufe steuern, die für die neuronale Migration essenziell sind. Dazu gehören so fundamentale Prozesse wie die Kontrolle der Differenzierung und Neurogenese, des Zellzyklus, der Proliferation und der Adhäsion. Falls diese Prozesse richtig orchestriert werden, bilden sich die Schichten im Kortex korrekt aus (siehe Abb. 4.2). Die ISH selbst

kann nicht zwischen mittel- und unmittelbar Pax6-regulierten Genen unterscheiden. Dazu müssen molekularbiologische und proteinchemische Experimente durchgeführt werden, die dann untersuchen welche Protein-DNA bzw. Protein-Protein Interaktionen stattfinden. Andererseits sind genetische Experimente angezeigt, in denen die einzelnen Kandidaten der Kaskade mutiert und die Expression der unter- und übergeordneten Gene analysiert werden. Es wird z.B. erwartet, dass die Entfernung übergeordneter Gene die Expression der untergeordneten Gene verändern. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier diskutierten *high throughput* ISH Analysen in einem noch nie dagewesenen Umfang ein weites Feld neuer Möglichkeiten öffnet, Pax6-gesteuerte Kaskaden zu erforschen .

4.4 Emx2 in der Entwicklung des Gyrus Dentatus

Warum der Emx2-Mutante die Körnerzellschicht fehlt, ist noch nicht bekannt (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997). Die Hypothese, dass die Funktion von Emx2 für den neokortikalen und dentalen Phänotyp verantwortlich ist, ist aufgrund des Expressionsmusters von Emx2 im Pallium die naheliegendste (Tole et al., 2000). Ziel dieser Experimente war es, die Probleme des kortikalen Reifungsprozesses mit der Abwesenheit der Körnerzellschicht in Verbindung zu bringen.

Der Expressionkaskade proneuraler Gene und anderer Marker der Emx2-Mutante folgend, wurden Änderungen in den Vorläuferzellen, in den Körnerzellen und im glialen Gerüst aufgedeckt. 1. Mutante neuroepitheliale Vorläuferzellen exprimieren Notch1, Delta1 und Gene der bHLH-Kaskade meist ohne Veränderungen. 2. Die subventrikuläre Schicht oder sekundäre Matrix ist in der Mutante drastisch reduziert 3. Die wenigen Körnerzellen, die in der Mutante gebildet werden, sind nicht korrekt differenziert (exprimieren kein NeuroD2), und sind nicht in der Lage über die tangential Migrationstraße hinaus zu migrieren. An dieser Stelle scheinen sie zu akkumulieren. 4. Das GFAP-exprimierende (GFAP ist ein Marker differenzierter Gliazellen) radiale Gliazellgerüst ist in der Mutante nahezu nicht existent. Daraus folgt, dass das Migrationsproblem ein wichtiger Teil des Phänotyps ist.

4.4.1 Expression von Markern, die im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante Vorläuferzellen markieren

Die gefundenen Daten der TenascinC- und bHLH-Genexpression im sich entwickelnden Gyrus Dentatus der Wildtyp-Maus stimmen mit veröffentlichten Daten überein (Lindsell et al., 1996; Sommer et al., 1996; Ma et al., 1997; Pleasure et al., 2000; Yuasa, 2001a). Ein

wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass das Neuroepithelium des mutanten Gyrus Dentatus in der Lage ist, die bHLH-Kaskade so zu exprimieren, dass sie nahezu mit dem Expressionsmuster im Wildtyp übereinstimmt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die grundlegende Kontrolle der Neurogenese im Gyrus Dentatus der Emx2-Mutante erhalten bleibt. Weiterhin wurden kleinere Änderungen im spatio-temporalen Expressionsmuster gefunden: verzögerter Beginn und vorzeitiger Abbruch der Expression des proneuralen Gens Mash1, vorzeitige Expression des antineuralen Gens Id3, die Anzahl der Delta1 exprimierenden Zellen ist in der Mutante reduziert. Zusätzlich scheint auch die Expression von TenascinC (Marker für astrogliale Vorläuferzellen) verzögert zu sein. Diese Veränderungen könnten fehlerhafte Regulierungen der frühen Schritte in der neurogenetischen Kaskade anzeigen, die für die Unfähigkeit die sekundäre Matrix (proliferative Zone im Gyrus Dentatus des Wildtyps, s.u) zu etablieren, verantwortlich sind.

4.4.2 Funktion von Emx2 im Telenzephalon und im Gyrus Dentatus

Es gibt Hinweise, dass Emx2 eine Funktion im Telenzephalon antagonistisch dem Fgf8- und Wnt-Signalsystem ausübt (Fukuchi-Shimogori und Grove, 2001, 2003; Ligon et al., 2003). Auf zellulärer Ebene moduliert das Fehlen von Emx2 im Telenzephalon die Positionsinformationen durch Änderungen der tangentialen und radialen Migration (Bishop et al., 2000, 2002; Mallamci et al., 2000b; Shinozaki et al., 2002; Ligon et al., 2003). Mit diesen Daten übereinstimmend ist die Entwicklung der radialen Gliazellen in Emx2-Mutanten verändert (Mallamci et al., 2000b). Positionsinformationen und Migration sind für die Bildung der kortikalen Arealisierung wichtig (Rakic, 1991; Muzio et al., 2002a; Muzio und Mallamci, 2003). Störungen der Positionsinformation und der neuronalen Migration beeinflussen den gesamten Hippokampus und können für einen spezifischen Defekt im Gyrus Dentatus verantwortlich sein, indem sie z.B. die Generierung der sekundären Matrix verändern. Parallel dazu können anomale radiale Gliazellen nicht mehr migrieren und dementsprechend auch nicht die Wanderung der Vorläuferzellen unterstützen.

4.4.3 Drastische Reduktion der sekundären Matrix in der Emx2-Mutante

Während des Stadiums E14.5 bis E15.5 wird eine Gruppe sich teilender Vorläuferzellen im Neuroepithelium des Gyrus Dentatus geboren, die die ventrikuläre Schicht verlassen um ein mitotisches Zentrum, die subventrikuläre Zone bzw. sekundäre germinale Matrix zu bilden (Altman und Bayer, 1990a). Die sekundäre Matrix lässt weitere Vorläuferzellen

entstehen, die die Migrationsstraße mitotischer Zellen bilden, die schließlich die Körnerzellen produzieren (Altman und Bayer, 1990a, b). Die Bildung der sekundären Matrix im Wildtyp des Stadiums E15.5 konnte durch ISH für Notch1, Delta1 und bHLH-Gene beobachtet werden. In diesem Stadium exprimieren die meisten migrierenden Zellen Ngn2 oder Hes5. Notch1 und besonders Mash1 und Id3 exprimierende, wandernde Zellen scheinen reduziert, und nahezu keine Zelle exprimiert Delta1. Die unterschiedliche Anzahl radial migrierender Zellen lassen die Existenz verschiedener Unterpopulation migrierender Vorläuferzellen vermuten (Pleasure et al., 2000).

In der *Emx2*-defizienten Maus ist die sekundäre Matrix stark verkleinert. Definiert wird die Reduktion durch 1. die geringe Zahl proliferierender Zellen in der Migrationsstraße, 2. die Beschränkung der Marker migrierender Vorläuferzellen wie Id3, Notch1, Hes5, Delta1 und Ngn2 auf das Neuroepithelium und 3. den vorzeitigen Verlust von Mash1, welches migrierende Vorläuferzellen markiert. Die Tatsache, dass z.B. Ngn2 im Stadium E18.5 des Wildtyps stark im hippokampalen Neuroepithelium und relativ schwach in den Migrationsstraßen exprimiert, eröffnet die Möglichkeit, dass Ngn2 ein Marker für eine kleine Untergruppe migrierender Vorläuferzellen darstellt. Diese Resultate lassen vermuten, dass die Vorläuferzellen im mutanten Gyrus Dentatus zwar alle Stadien der bHLH-Expression durchlaufen, dass die Zellen aber atypisch in der ventrikulären Schicht arretiert werden.

Färbungen mit Ki67-Antikörper (Proliferationsmarker) zeigen einige Zellen, die eine subventrikuläre Schicht bilden. Das weist daraufhin, dass in der Abwesenheit von *Emx2* eine verkümmerte sekundäre Matrix gebildet werden kann. Da das Neuroepithelium des Gyrus Dentatus (primäre Matrix) nur mittels der sekundären Matrix Körnerzellen generiert (Altman und Bayer, 1990a), scheint die nahezu totale Abwesenheit der sekundären Matrix der Grund für die dramatische Reduzierung der Körnerzellzahl in der Mutante.

4.4.4 Das gliale Gerüst im Gyrus Dentatus der *Emx2*-Mutante

Das Neuroepithelium produziert nicht nur sekundäre Vorläuferzellen, sondern stellt auch radiale Gliazellen für die Migration zur Verfügung (Eckenhoff und Rakic, 1984; Rickmann et al., 1987). Jede Änderung, die die Fähigkeit des Neuroepitheliums die sekundäre Matrix zu generieren, modifiziert, kann als Störung dieses wichtigen histogenetischen Vorgangs aufgefasst werden. Die langen Fortsätze der radialen Gliazellen enthalten GFAP und werden von den Vorläuferzellen als Migrationssubstrat benutzt (Rickmann et al., 1987). Tenascin C exprimierende Vorläuferzellen von Astrozyten benutzen den gleichen Weg, um die Region der Körnerzellschicht zu erreichen, zu dessen Histogenese sie beitragen

(Yuasa, 2001a,b). Anomale radiale Gliazellen und veränderte neuronale Migration wurden im Kortex der *Emx2*-Mutante beschrieben (Mallamaci et al., 2000b; Shinozaki et al., 2002). Dementsprechend zeigen die Ergebnisse dieser Experimente eine dramatische Reduktion des radialen glialen Gerüsts in der Mutante. In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Ergebnissen für GFAP ist das radiale gliale Gerüst und die Anzahl der Astrozyten verringert, obwohl *In Situ*-Hybridisierungen zeigen, dass GFAP exprimierende Vorläuferzellen im mutanten Neuroepithelium existieren. Die Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass neuroepitheliale Zellen nicht in der Lage sind die richtige Anzahl differenzierter radialer Fortsätze zu generieren. Das bewirkt, dass Astrozytenvorläuferzellen die Körnerzellschicht nicht erreichen können und parallel dazu die Körnerzellschicht nicht formiert wird.

4.4.5 Körnerzellen im Gyrus Dentatus der *Emx2*-Mutante sind stark reduziert und nicht ausdifferenziert

Die Abwesenheit von Migration könnte die Funktion von Vorläuferzellen beeinträchtigen, z.B. indem Zellen daran gehindert werden, in Kontakt mit Signalmolekülen zu treten, was normalerweise während der Migration stattfindet. Es wurde gezeigt, dass Körnerzellen in der Mutante nicht korrekt differenziert sind (Savaskan et al., 2002). Übereinstimmend damit zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine verzögerte Expression des Körnerzellmarkers *Prox1*. Die Abwesenheit von *NeuroD2*, einem Marker frisch differenzierter Körnerzellen, bestätigt, dass diese Neuronen die endgültige Differenzierung nicht erreichen. Die Daten zeigen nicht, ob es sich um ein zellautonomes Problem oder ein sekundäres Differenzierungsproblem in Vorläuferzellen handelt. Interessanterweise sind die wenigen Körnerzellen und Astrozyten, die in der Mutante gebildet werden, in der Lage, bis zur tangentialen Migrationsstraße zu wandern, vielleicht weil sie dafür ein anderes Substrat als die Vorläuferzellen benutzen.

4.4.6 Die hippokampale Fissur ist im Gyrus Dentatus der *Emx2*-Mutante nicht vorhanden

Zwei zelluläre Systeme exprimieren *Emx2* im Gyrus Dentatus des Wildtyps. Das ventrikuläre System wird von Zellen der ventrikulären Schicht gebildet, die in Richtung der zukünftigen Körnerzellschicht wandern. Das piale System ist fortlaufend mit markierten Zellen der neokortikalen Pia verbunden und teilt sich in zwei Teile um die hippokampale Fissur zu bilden. Eine Mehrheit der Zellen dringt in die Fissur ein, die anderen

positionieren sich entlang des zukünftigen ventralen Blattes des Gyrus Dentatus (Morest und Silver, 2003).

Die hippocampale Fissur wird in der *Emx2*-Mutante nicht gebildet. Moleküle, die sonst in der Fissur exprimiert werden (*Lhx5*, *Reelin*, *Cxcl12*), werden in der Mutante nur noch in der Hirnhaut und den Cajal-Retzius Zellen exprimiert. *Reelin* zeigt auch Expression in der Pre-Fissur, was darauf schließen lässt, dass sich dort Cajal-Retzius-Zellen aufhalten. Migrierende Zellen exprimieren den *Reelin*-Rezeptor *ApoEr2* oder den *Cxcl12*-Rezeptor *Cxcr4*. In der *Emx2*-Mutante können die Kapillaren der Hirnhaut nicht die Pre-Fissur erobern (s. Nissl-Färbungen).

Das Fehlen der Fissur im Hippokampus entspricht in gewisser Weise einen lissenzephalischen Kortex (Fehlen von Windungen und Furchen auf der Gehirnoberfläche). Mäuse verfügen grundsätzlich über einen lissenzephalischen Kortex. Deshalb eignen sie sich auch nicht als Model für die Formation kortikaler Gyri. Allerdings verfügen sie über die hippocampale Fissur, die in der *Emx2*-Mutante fehlt. Dieser Gedanke sollte weiter verfolgt werden, um die genetische Regulation der Bildung der hippocampalen Fissur aufzuklären und dies dann als als Model der Gyrus-Formation im Säugetierkortex zu verwenden.

4.4.7 *Alp*, *Pcp4* und *Smad1* fehlen im Gyrus Dentatus der *Emx2*-Mutante

Auf der Suche nach Kandidaten, die unter der Kontrolle von *Emx2* stehen, fanden wir das aktinin-assoziierte Lim Protein (*Alp*), ein Protein das in der Skelettmuskulatur exprimiert wird und über eine N-terminale PDZ-Domäne und ein C-terminales Lim Motiv verfügt (Xia et al., 1997). Es wird im Gyrus Dentatus in der Migrationsstraße exprimiert. In der Mutante ist *ALP* verschwunden. Die Expression in diesem Bereich wurde bisher nicht beschrieben. Lim- und PDZ-Domänen stellen zwei strukturell verschiedenartige hochspezifische Adapterproteine für Protein-Protein-Interaktion dar, die Transmembranproteine mit ihren Effektorproteinen, Strukturproteinen oder Signalmolekülen zu einem funktionellen Proteinkomplex vereinen. Die Interaktion von *Alp* mit α -Aktinin und die Funktionen von Proteinen mit Lim- und PDZ-Domänen bringen *Alp* in Verbindung zur neuronaler Migration. Aus unseren Ergebnissen wissen wir, dass ein gliales Netzwerk in der *Emx2*-Mutante nicht bebildet wird. *Alp* wird im Wildtyp entlang dieses Netzwerkes exprimiert. Neuronale Migration ist auch abhängig von Interaktion mit dem Zytoskelett, weil dieses für die Beweglichkeit vom migrierenden Neuronen verantwortlich ist (siehe Einleitung). Wenn *Alp* also eine Funktion in der Entwicklung des Gyrus Dentatus ausübt,

dann vermutlich als Adaptermolekül, das wichtige Komponenten der neuronalen Migration mit Aktin verbindet.

Ein weiteres Protein, das in der *Emx2*-Mutante nicht mehr exprimiert ist, ist *Pcp4*, *Purkinje Cell Protein 4*, das im Gehirn primär in zerebellaren Purkinje Zellen vorkommt (Cabin et al., 1996). Weil es spezifisch in Neuronen exprimiert wird und auf Chromosom 21 lokalisiert ist, vermuteten Chen und Kollegen (1996), dass die Überexpression Phänotypen des Down-Syndroms darstellen könnte. *Pcp4* gehört zu einer Proteinfamilie, die Kalziumsignale durch Calmodulin unterdrückt (Thomas et al., 2003). Dadurch wird in diesem Fall Apoptose verhindert. Während der Embryogenese wird *Pcp4* hauptsächlich im Ektoderm und Neuroektoderm, einschließlich Neuralleistenzellen, exprimiert (Thomas et al., 2003). Kürzlich wurde es auch in Arterien gefunden (Wada et al., 2002).

Bei dem dritten Kandidaten, der nicht mehr in der Mutante exprimiert wird, handelt es sich um *Smad1*, ein Signaltransduktionsprotein, das an der Induzierung der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Astrozyten beteiligt ist (Nakashima et al., 1999) Mitglieder der BMP-Familie (bone morphogenetic protein) und die verwandten Mitglieder der *Transforming Growth Factor (TGF)- β* -Superfamilien leiten ihre Signale durch einen heterotetrameren Serin-Threonin-Kinaserezeptor weiter (Heldin et al., 1997).

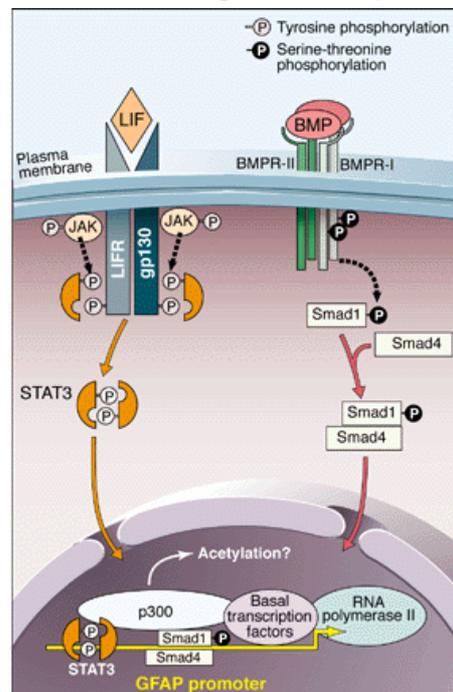


Abbildung 5.3: Signalweg für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Astrozyten. Die Signalkaskaden der Zytokine Lif (leukemia inhibitory factor) und BMP2 (bone morphogenetic protein 2) werden durch den Koaktivator p300 zusammengeführt. Lif induziert die Heterodimerisierung der Lif-Rezeptoren (LIFR) mit gp130, die zu einer Aktivierung der Jak-Familie von Tyrosinkinasen. Die Phosphorylierung von Lifr und gp130 führt zu einer Anlagerung und Phosphorylierung von Stat3 durch jaks. Dimerisiertes Stat3 wandert in den Kern und interagiert mit dem Promotor von GFAP, ein Marker der Astrozyten-Differenzierung. Dimere des Zytokins BMP induzieren die BMP-rezeptoren. Das führt zur Phosphorylierung von Smad1. Dieses verbindet sich mit Smad4. Dieser Komplex bindet direkt an den GFAP-Promotor.

Aktiviert BMP-Rezeptoren phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren Smad1, 5 oder 8, die wiederum mit Smad4 assoziieren. Der resultierende, heteromere Smad-Komplex transloziert in den Kern und reguliert die Transkription (Heldin et al., 1997). Ein Komplex aus Stat3 und Smad1, die mittels p300 interagieren wird durch kooperative Signale von Lif1 und BMP2 aktiviert und induziert die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Astrozyten (Nakashima et al., 1999, Abb. 5.3). Da Smad1 in der Emx2-Mutante nicht mehr exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass es der direkten oder indirekten Kontrolle von Emx2 liegt. Das führt zu der Annahme das Emx2 über Smad1 die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Astrozyten steuert, die in der Mutante nicht anwesend sind.

Smad1 und Pcp4 werden u. a. in der hippocampalen Fissur des Wildtyps exprimiert, die in der Mutante nicht mehr gebildet wird. Dort findet man auch in anderen Regionen keine Pcp4 oder Smad1 exprimierenden Zellen mehr. Pcp4 wurde in Arterien gefunden (Wada et al., 2002) und Smad1 ist notwendig für die Angiogenese (Goumans et al., 2003). Aus Nissl-Färbungen wissen wir, dass die Kapillaren der mutanten Hirnhaut nicht in die Pre-Fissur einwandern.

Zusammenfassend kann folgende Hypothese aufgestellt werden: Normalerweise wandern Kapillare in die Fissur. Durch das Fehlen von Pcp4 und Smad1 entstehen diese nicht oder sind unzureichend ausgebildet und können aufgrunddessen keine Fissur bilden. Wir vermuten, dass weitere Zellen normalerweise über die Kapillaren der Pia in die Fissur einwandern. Diese Art der Migration wäre ein neues noch nicht beschriebenes Phänomen: "Blutgefäß-bedingte neuronale Migration" (Idee: Gonzalo Alvarez-Bolado). Damit gäbe es einen Einstieg in die molekulare Erklärung für die Entstehung von Fissuren.

5 Literatur

- Aicardi J.; The agyria-pachygyria complex: a spectrum of cortical malformations.; *Brain Dev.* 1991;13(1):1-8.
- Alcantara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E.; Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse.; *J Neurosci.* 1998 Oct 1;18(19):7779-99.
- Allen PB, Ouimet CC, Greengard P.; Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines.; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 2;94(18):9956-61.
- Altman J, Das GD.; Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.; *J Comp Neurol.* 1965 Jun;124(3):319-35.
- Altman J, Das GD.; Post-natal origin of microneurons in the rat brain.; *Nature.* 1965 Aug 28;207:953-6.
- Altman J, Bayer SA.; Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods.; *J Comp Neurol.* 1990 Nov 15;301(3):365-81.
- Altman J, Bayer SA.; Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells.; *J Comp Neurol.* 1990 Nov 15;301(3):325-42.
- Angevine J Jr and Sidman RL.; Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse; *Nature* 192, 766-768, 1961
- Bagri A, Gurney T, He X, Zou YR, Littman DR, Tessier-Lavigne M, Pleasure SJ.; The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells.; *Development.* 2002 Sep;129(18):4249-60.
- Bartsch U, Bartsch S, Dorries U, Schachner M.; Immunohistological Localization of Tenascin in the Developing and Lesioned; Adult Mouse Optic Nerve.; *Eur J Neurosci.* 1992;4(4):338-352.
- Bartsch S, Bartsch U, Dorries U, Faissner A, Weller A, Ekblom P, Schachner M.; Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex.; *J Neurosci.* 1992 Mar;12(3):736-49.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F.; Proneural genes and the specification of neural cell types.; *Nat Rev Neurosci.* 2002 Jul;3(7):517-30
- Bishop KM, Goudreau G, O'Leary DD.; Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6.; *Science.* 2000 Apr 14;288(5464):344-9.
- Bishop KM, Rubenstein JL, O'Leary DD.; Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex.; *J Neurosci.* 2002 Sep 1;22(17):7627-38.
- Bohner AP, Akers RM, McConnell SK.; Induction of deep layer cortical neurons in vitro.; *Development.* 1997 Feb;124(4):915-23.
- Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M.; Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*.; *Cell.* 1986 Dec 26;47(6):1033-40.

- Borrell V, Del Rio JA, Alcantara S, Derer M, Martinez A, D'Arcangelo G, Nakajima K, Mikoshiba K, Derer P, Curran T, Soriano E.; Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections.; *J Neurosci*. 1999 Feb 15;19(4):1345-58.
- Borrell V, Ruiz M, Del Rio JA, Soriano E.; Development of commissural connections in the hippocampus of reeler mice: evidence of an inhibitory influence of Cajal-Retzius cells. *Exp Neurol*. 1999 Apr;156(2):268-82.
- Brittis PA, Meiri K, Dent E, Silver J.; The earliest patterns of neuronal differentiation and migration in the mammalian central nervous system.; *Exp Neurol*. 1995 Jul;134(1):1-12.
- Cabin DE, Gardiner K, Reeves RH.; Molecular genetic characterization and comparative mapping of the human PCP4 gene.; *Somat Cell Mol Genet*. 1996 May;22(3):167-75.
- Cai L, Morrow EM, Cepko CL.; Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival.; *Development*. 2000 Jul;127(14):3021-30.
- Carazo-Salas RE, Guarguaglini G, Gruss OJ, Segref A, Karsenti E, Mattaj JW.; Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation.; *Nature*. 1999 Jul 8;400(6740):178-81.
- Caric D, Gooday D, Hill RE, McConnell SK, Price DJ.; Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6.; *Development*. 1997 Dec;124(24):5087-96.
- Caspi M, Atlas R, Kantor A, Sapir T, Reiner O.; Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products.; *Hum Mol Genet*. 2000 Sep 22;9(15):2205-13.
- Cau E, Gradwohl G, Fode C, Guillemot F.; Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors.; *Development*. 1997 Apr;124(8):1611-21.
- Cau E, Gradwohl G, Casarosa S, Kageyama R, Guillemot F.; Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium.; *Development*. 2000 Jun;127(11):2323-32.
- Caviness VS Jr.; Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [³H]thymidine autoradiography.; *Brain Res*. 1982 Jul;256(3):293-302.
- Caviness VS Jr, Takahashi T, Nowakowski RS.; Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model.; *Trends Neurosci*. 1995 Sep;18(9):379-83.
- Cecchi C, Boncinelli E.; Emx homeogenes and mouse brain development.; *Trends Neurosci*. 2000 Aug;23(8):347-52.
- Cecchi C.; Emx2: a gene responsible for cortical development, regionalization and area specification.; *Gene*. 2002 May 29;291(1-2):1-9.
- Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH.; Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality.; *Neuron*. 1997 Jan;18(1):29-42.
- Chen H, Bouras C, Antonarakis SE.; Cloning of the cDNA for a human homolog of the rat PEP-19 gene and mapping to chromosome 21q22.2-q22.3.; *Hum Genet*. 1996 Dec;98(6):672-7.
- Chenn A, McConnell SK.; Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis.; *Cell*. 1995 Aug 25;82(4):631-41.

- Chenn A, Braisted JE, McConnell SK, O'Leary DDM in *Molecular and Cellular approaches to Neural Development*, eds. Cowan WM, Zirpursky L, Jessel T; Oxford University Press, New York, 1997, 440-473
- Chiquet M, Fambrough DM.; Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits.; *J Cell Biol.* 1984 Jun;98(6):1937-46.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T.; Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis.; *Cell.* 1986 Oct 10;47(1):131-9.
- Corbin JG, Nery S, Fishell G.; Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain.; *Nat Neurosci.* 2001 Nov;4 Suppl:1177-82.
- Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, Walsh CA.; Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex.; *J Neurosci.* 2002 Sep 1;22(17):7548-57.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T.; A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler.; *Nature.* 1995 Apr 20;374(6524):719-23.
- D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T.; Reelin is a ligand for lipoprotein receptors.; *Neuron.* 1999 Oct;24(2):471-9.
- Del Rio JA, Heimrich B, Borrell V, Forster E, Drakew A, Alcantara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E.; A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections.; *Nature.* 1997 Jan 2;385(6611):70-4.
- des Portes V, Francis F, Pinaud JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, Meiners LC, Capron F, Cusmai R, Ricci S, Motte J, Echenne B, Ponsot G, Dulac O, Chelly J, Beldjord C.; Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH); *Hum Mol Genet.* 1998 Jul;7(7):1063-70.
- Eckenhoff MF, Rakic P.; Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey.; *J Comp Neurol.* 1984 Feb 10;223(1):1-21.
- Edelman GM, Jones FS.; Gene regulation of cell Adhesion: a key step in neural morphogenesis.; *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 May;26(2-3):337-52.
- Eklund T, Jessell TM.; Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system.; *Cell.* 1999 Jan 22;96(2):211-24.
- Edmondson JC, Hatten ME.; Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study.; *J Neurosci.* 1987 Jun;7(6):1928-34.
- Efimov VP, Morris NR.; The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein.; *J Cell Biol.* 2000 Aug 7;150(3):681-8.
- Eksioglu YZ, Scheffer IE, Cardenas P, Knoll J, DiMario F, Ramsby G, Berg M, Kamuro K, Berkovic SF, Duyk GM, Parisi J, Huttenlocher PR, Walsh CA.; Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development.; *Neuron.* 1996 Jan;16(1):77-87.

- Elliott RC, Khademi S, Pleasure SJ, Parent JM, Lowenstein DH.; Differential regulation of basic helix-loop-helix mRNAs in the dentate gyrus following status epilepticus.; *Neuroscience*. 2001;106(1):79-88.
- Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O'Connell CB, Wang Y, Vallee RB.; A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function.; *Nat Cell Biol*. 2000 Nov;2(11):784-91.
- Feng Y, Olson EC, Stukenberg PT, Flanagan LA, Kirschner MW, Walsh CA.; LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome.; *Neuron*. 2000 Dec;28(3):665-79.
- Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Ouimet CC, Greengard P.; Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines.; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1;97(16):9287-92.
- Feng Y, Walsh CA.; Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration.; *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jun;2(6):408-16.
- Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK.; Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain.; *Nature*. 1993 May 6;363(6424):38-45.
- Fleck MW, Hirotsune S, Gambello MJ, Phillips-Tansey E, Soares G, Mervis RF, Wynshaw-Boris A, McBain CJ.; Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly.; *J Neurosci*. 2000 Apr 1;20(7):2439-50.
- Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA.; Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia.; *Neuron*. 1998 Dec;21(6):1315-25.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J.; Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons.; *Neuron*. 1999 Jun;23(2):247-56.
- Friocourt G, Chafey P, Billuart P, Koulakoff A, Vinet MC, Schaar BT, McConnell SK, Francis F, Chelly J.; Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system.; *Mol Cell Neurosci*. 2001 Sep;18(3):307-19.
- Frotscher M and Soriano E.; Different functions of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development; *Eur.J. Neurosci*. 1998 10, 102
- Fujita S.; Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography; *J Comp Neurol*. 1964 Jun;122:311-27.
- Fukuchi-Shimogori T, Grove EA.; Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8.; *Science*. 2001 Nov 2;294(5544):1071-4. Epub 2001 Sep 20.
- Fukuchi-Shimogori T, Grove EA.; Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling.; *Nat Neurosci*. 2003 Aug;6(8):825-31.
- Garel S, Huffman KJ, Rubenstein JL.; Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants.; *Development*. 2003 May;130(9):1903-14.
- Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ.; Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections.; *Nature*. 1990 Sep 13;347(6289):179-81.

- Gilbert FS; *Developmental Biology*; 6th Edition; Sinauer Associates Incorporated; 1997
- Gilbert CD.; *Cortical dynamics.*; *Acta Paediatr Suppl.* 1997 Jul;422:34-7.
- Gillies K, Price DJ.; *The fates of cells in the developing cerebral cortex of normal and methylazoxymethanol acetate-lesioned mice*; *Eur J Neurosci.* 1993 Jan 1;5(1):73-84.
- Gilmore EC, Ohshima T, Goffinet AM, Kulkarni AB, Herrup K.; *Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex.*; *J Neurosci.* 1998 Aug 15;18(16):6370-7.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA.; *Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein.*; *Cell.* 1998 Jan 9;92(1):63-72.
- Gleeson JG, Minnerath SR, Fox JW, Allen KM, Luo RF, Hong SE, Berg MJ, Kuzniecky R, Reitnauer PJ, Borgatti R, Mira AP, Guerrini R, Holmes GL, Rooney CM, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Ricci S, Cusmai R, Crawford TO, Leroy R, Andermann E, Wheless JW, Dobyns WB, Walsh CA.; *Characterization of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome.*; *Ann Neurol.* 1999 Feb;45(2):146-53.
- Gleeson JG, Walsh CA.; *Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms.*; *Trends Neurosci.* 2000 Aug;23(8):352-9.
- Glezer II, Hof PR, Morgane PJ.; *Calretinin-immunoreactive neurons in the primary visual cortex of dolphin and human brains.*; *Brain Res.* 1992 Nov 13;595(2):181-8.
- Götz M, Stoykova A, Gruss P.; *Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex.*; *Neuron.* 1998 Nov;21(5):1031-44.
- Gonzalez JL, Russo CJ, Goldowitz D, Sweet HO, Davisson MT, Walsh CA.; *Birthdate and cell marker analysis of scrambler: a novel mutation affecting cortical development with a reeler-like phenotype.*; *J Neurosci.* 1997 Dec 1;17(23):9204-11.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G.; *Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways.*; *Trends Cardiovasc Med.* 2003 Oct;13(7):301-7.
- Grove EA, Fukuchi-Shimogori T.; *Generating the cerebral cortical area map.*; *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:355-80.
- Gulisano M, Broccoli V, Pardini C, Boncinelli E.; *Emx1 and Emx2 show different patterns of expression during proliferation and differentiation of the developing cerebral cortex in the mouse.*; *Eur J Neurosci.* 1996 May;8(5):1037-50.
- Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A.; *Life is a journey: a genetic look at neocortical development.*; *Nat Rev Genet.* 2002 May;3(5):342-55.
- Hatten ME.; *The role of migration in central nervous system neuronal development.*; *Curr Opin Neurobiol.* 1993 Feb;3(1):38-44. Review.
- Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K.; *Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]*; *Nature.* 1994 Jul 21;370(6486):216-8.

- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M.; Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6.; *Nat Neurosci.* 2002 Apr;5(4):308-15.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P.; TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.; *Nature.* 1997 Dec 4;390(6659):465-71.
- Herzig U, Cadenas C, Sieckmann F, Sierralta W, Thaller C, Visel A, Eichele G.; Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain.; *Novartis Found Symp.* 2001;239:129-46; discussion 146-59.
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J.; Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation.; *Neuron.* 1999 Oct;24(2):481-9.
- Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V.; Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene.; *Nature.* 1991 Dec 19-26;354(6354):522-5
- Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S.; The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):77-83.
- Hoffarth RM, Johnston JG, Krushel LA, van der Kooy D.; The mouse mutation reeler causes increased Adhäsion within a subpopulation of early postmitotic cortical neurons.; *J Neurosci.* 1995 Jul;15(7 Pt 1):4838-50.
- Hogan BL, Horsburgh G, Cohen J, Hetherington CM, Fisher G, Lyon MF.; Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse.; *J Embryol Exp Morphol.* 1986 Sep;97:95-110.
- Honda T, Tabata H, Nakajima K.; Cellular and molecular mechanisms of neuronal migration in neocortical development.; *Semin Cell Dev Biol.* 2003 Jun;14(3):169-74.
- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA.; Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations.; *Nat Genet.* 2000 Sep;26(1):93-6.
- Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, Reiner O.; Doublecortin, a stabilizer of microtubules.; *Hum Mol Genet.* 1999 Sep;8(9):1599-610.
- Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA.; Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1.; *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):733-7.
- Howell BW, Herrick TM, Cooper JA.; Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning.; *Genes Dev.* 1999 Mar 15;13(6):643-8.
- Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA.; Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development.; *Curr Biol.* 2000 Jul 27-Aug 10;10(15):877-85.
- Ide N, Hata Y, Hirao K, Irie M, Deguchi M, Yao I, Satoh A, Wada M, Takahashi K, Nakanishi H, Takai Y.; Interaction of rat lin-10 with brain-enriched F-actin-binding protein, neurabin-II/spinophilin.; *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Mar 6;244(1):258-62.

- Iler N, Rowitch DH, Echelard Y, McMahon AP, Abate-Shen C.; A single homeodomain binding site restricts spatial expression of Wnt-1 in the developing brain.; *Mech Dev.* 1995 Sep;53(1):87-96.
- Jackson CA, Peduzzi JD, Hickey TL.; Visual cortex development in the ferret. I. Genesis and migration of visual cortical neurons.; *J Neurosci.* 1989 Apr;9(4):1242-53.
- Keshvara L, Magdaleno S, Benhayon D, Curran T.; Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates disabled 1 independently of Reelin signaling.; *J Neurosci.* 2002 Jun 15;22(12):4869-77.
- Kirchhausen T.; Adaptors for clathrin-mediated traffic.; *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:705-32
- Kitagawa M, Umezumi M, Aoki J, Koizumi H, Arai H, Inoue K.; Direct association of LIS1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE.; *FEBS Lett.* 2000 Aug 11;479(1-2):57-62.
- Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni AB, Li E, Tsai LH.; p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment.; *J Neurosci.* 2001 Sep 1;21(17):6758-71.
- Komuro H, Rakic P.; Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration.; *Neuron.* 1996 Aug;17(2):275-85.
- Kwon YT, Tsai LH.; A novel disruption of cortical development in p35(-/-) mice distinct from reeler.; *J Comp Neurol.* 1998 Jun 15;395(4):510-22.
- Lei Y, Warrior R.; The Drosophila Lissencephaly1 (DLis1) gene is required for nuclear migration.; *Dev Biol.* 2000 Oct 1;226(1):57-72.
- Leung CL, Sun D, Zheng M, Knowles DR, Liem RK.; Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13;147(6):1275-86.
- Leung CL, Green KJ, Liem RK.; Plakins: a family of versatile cytolinker proteins.; *Trends Cell Biol.* 2002 Jan;12(1):37-45.
- Ligon KL, Echelard Y, Assimacopoulos S, Danielian PS, Kaing S, Grove EA, McMahon AP, Rowitch DH.; Loss of Emx2 function leads to ectopic expression of Wnt1 in the developing telencephalon and cortical dysplasia.; *Development.* 2003 May;130(10):2275-87.
- Lindsell CE, Boulter J, diSibio G, Gossler A, Weinmaster G.; Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development.; *Mol Cell Neurosci.* 1996;8(1):14-27.
- Liu Z, Steward R, Luo L.; Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport.; *Nat Cell Biol.* 2000 Nov;2(11):776-83.
- Lund RD, Mustari MJ.; Development of the geniculocortical pathway in rats.; *J Comp Neurol.* 1977 May 15;173(2):289-306
- Luskin MB, Shatz CJ.; Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones.; *J Neurosci.* 1985 Apr;5(4):1062-75.
- Luskin MB, Shatz CJ.; Neurogenesis of the cat's primary visual cortex.; *J Comp Neurol.* 1985 Dec 22;242(4):611-31.

- Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson DJ.; Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands.; *J Neurosci.* 1997 May 15;17(10):3644-52.
- Mallamaci A, Iannone R, Briata P, Pintonello L, Mercurio S, Boncinelli E, Corte G.; EMX2 protein in the developing mouse brain and olfactory area.; *Mech Dev.* 1998 Oct;77(2):165-72.
- Mallamaci A, Mercurio S, Muzio L, Cecchi C, Pardini CL, Gruss P, Boncinelli E.; The lack of Emx2 causes impairment of Reelin signaling and defects of neuronal migration in the developing cerebral cortex.; *J Neurosci.* 2000 Feb 1;20(3):1109-18.
- Marin O, Rubenstein JL.; Cell migration in the forebrain.; *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:441-83. Epub 2003 Feb 26.
- Marin-Padilla M.; Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1971;134(2):117-45.
- Mastick GS, Davis NM, Andrew GL, Easter SS Jr.; Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain.; *Development.* 1997 May;124(10):1985-97.
- Meech R, Kallunki P, Edelman GM, Jones FS.; A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell Adhäsion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins.; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2420-5.
- Menezes JR, Luskin MB.; Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon.; *J Neurosci.* 1994 Sep;14(9):5399-416.
- Mione MC, Cavanagh JF, Harris B, Parnavelas JG.; Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex.; *J Neurosci.* 1997 Mar 15;17(6):2018-29.
- Miyata T, Maeda T, Lee JE.; NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus.; *Genes Dev.* 1999 Jul 1;13(13):1647-52.
- Monuki ES, Walsh CA.; Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans.; *Nat Neurosci.* 2001 Nov;4 Suppl:1199-206.
- Morest DK.; A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young.; *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1970;130(4):265-305.
- Morest DK, Silver J.; Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: What are they? Where are they from? How do they get where they are going?; *Glia.* 2003 Jul;43(1):6-18.
- Moro F, Carrozzo R, Veggiotti P, Tortorella G, Toniolo D, Volzone A, Guerrini R.; Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene.; *Neurology.* 2002 Mar 26;58(6):916-21.
- Muzio L, DiBenedetto B, Stoykova A, Boncinelli E, Gruss P, Mallamaci A.; Emx2 and Pax6 control regionalization of the pre-neuronogenic cortical primordium.; *Cereb Cortex.* 2002 Feb;12(2):129-39.
- Muzio L, DiBenedetto B, Stoykova A, Boncinelli E, Gruss P, Mallamaci A.; Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in Emx2(-/-) Pax6(Sey/Sey) double-mutant mice.; *Nat Neurosci.* 2002 Aug;5(8):737-45.

- Muzio L, Mallamaci A.; Emx1, emx2 and pax6 in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex.; *Cereb Cortex*. 2003 Jun;13(6):641-7.
- Nacher J, Crespo C, McEwen BS.; Doublecortin expression in the adult rat telencephalon.; *Eur J Neurosci*. 2001 Aug;14(4):629-44.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL.; Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex.; *Nat Neurosci*. 2001 Feb;4(2):143-50.
- Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T.; When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin.; *J Cell Biol*. 1998 Nov 16;143(4):1041-52.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T.; Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300.; *Science*. 1999 Apr 16;284(5413):479-82.
- Niethammer M, Smith DS, Ayala R, Peng J, Ko J, Lee MS, Morabito M, Tsai LH.; NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein.; *Neuron*. 2000 Dec;28(3):697-711.
- Nishitani H, Hirose E, Uchimura Y, Nakamura M, Umeda M, Nishii K, Mori N, Nishimoto T.; Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex.; *Gene*. 2001 Jul 11;272(1-2):25-33.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagy K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K.; The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons.; *Neuron*. 1995 May;14(5):899-912.
- Ohkubo Y, Chiang C, Rubenstein JL.; Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles.; *Neuroscience*. 2002;111(1):1-17.
- Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB.; Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death.; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):11173-8.
- O'Leary DD.; Do cortical areas emerge from a protocortex?; *Trends Neurosci*. 1989 Oct;12(10):400-6.
- O'Leary DD, Nakagawa Y.; Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex.; *Curr Opin Neurobiol*. 2002 Feb;12(1):14-25.
- Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ, Gruss P.; Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development.; *Mech Dev*. 1993 Nov;44(1):3-16.
- O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK.; Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex; *Science*. 1992;258, 299-302
- O'Rourke NA, Sullivan DP, Kaznowski CE, Jacobs AA, McConnell SK.; Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex.; *Development*. 1995 Jul;121(7):2165-76.
- O'Rourke NA, Chenn A, McConnell SK.; Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development*. 1997 Mar;124(5):997-1005.

- Parnavelas JG.; The origin and migration of cortical neurones: new vistas.; Trends Neurosci. 2000 Mar;23(3):126-31.
- Pashmforoush M, Pomies P, Peterson KL, Kubalak S, Ross J Jr, Hefti A, Aebi U, Beckerle MC, Chien KR.; Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy.; Nat Med. 2001 May;7(5):591-7.
- Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ.; Clathrin coat construction in endocytosis.; Curr Opin Struct Biol. 2000 Apr;10(2):220-8.
- Pellegrini M, Mansouri A, Simeone A, Boncinelli E, Gruss P.; Dentate gyrus formation requires Emx2.; Development. 1996 Dec;122(12):3893-8.
- Perron M, Opdecamp K, Butler K, Harris WA, Bellefroid EJ.; X-ngnr-1 and Xath3 promote ectopic expression of sensory neuron markers in the neurula ectoderm and have distinct inducing properties in the retina.; Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 21;96(26):14996-5001.
- Pleasure SJ, Collins AE, Lowenstein DH.; Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development.; J Neurosci. 2000 Aug 15;20(16):6095-105.
- Pratt T, Vitalis T, Warren N, Edgar JM, Mason JO, Price DJ.; A role for Pax6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections.; Development. 2000 Dec;127(23):5167-78.
- Price DJ und Willshaw DJ; Mechanism of cortical development, Oxford University Press, New York, 2000
- Quinn JC, West JD, Hill RE.; Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development.; Genes Dev. 1996 Feb 15;10(4):435-46.
- Raedler E, Raedler A.; Autoradiographic study of early neurogenesis in rat neocortex.; Anat Embryol (Berl). 1978 Sep 27;154(3):267-84.
- Rakic P.; Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus.; J Comp Neurol. 1971 Mar;141(3):283-312.
- Rakic P.; Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex.; Brain Res. 1971 Oct 29;33(2):471-6.
- Rakic P.; Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex.; J Comp Neurol. 1972 May;145(1):61-83.
- Rakic P.; Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition.; Science. 1974 Feb 1;183(123):425-7..
- Rakic P.; Specification of cerebral cortical areas.; Science. 1988 Jul 8;241(4862):170-6. Review.
- Rakic P.; Experimental manipulation of cerebral cortical areas in primates.; Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1991 Mar 29;331(1261):291-4.
- Rakic P.; Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex.; Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 5;92(25):11323-7.
- Rakic P, Knyihar-Csillik E, Csillik B.; Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration.; Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 20;93(17):9218-22.

- Rakic P; Intra- and extracellular control of neuronal migration: relevance to cortical malformations. In *Normal and abnormal development of the cortex* (eds. A. Galaburda and Y. Christen). Springer Verlag, 1997
- Ramon y Cayal S.; *Histologie du Systeme Nerveus de l'Homme et des Vestrebres.*; Paris: Maloine, 1911
- Rauber und Kopsch; *Anatomie des Menschen, Band III*; Hrsg.: H. Leonhardt, G. Töndury und K. Zilles.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1987
- Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH.; Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats.; *Nature*. 1993 Aug 19;364(6439):717-21.
- Ren M, Drivas G, D'Eustachio P, Rush MG.; Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis.; *J Cell Biol*. 1993 Jan;120(2):313-23.
- Rice DS, Sheldon M, D'Arcangelo G, Nakajima K, Goldowitz D, Curran T.; Disabled-1 acts downstream of Reelin in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain.; *Development*. 1998 Sep;125(18):3719-29.
- Rice DS, Curran T.; Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development.; *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1005-39.
- Rickmann M, Amaral DG, Cowan WM.; Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus.; *J Comp Neurol*. 1987 Oct 22;264(4):449-79.
- Rivas RJ, Hatten ME.; Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons.; *J Neurosci*. 1995 Feb;15(2):981-9.
- Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD.; Basic helix-loop-helix factors in cortical development.; *Neuron*. 2003 Jul 3;39(1):13-25.
- Royet J, Finkelstein R.; Pattern formation in Drosophila head development: the role of the orthodenticle homeobox gene.; *Development*. 1995 Nov;121(11):3561-72.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.; *Biotechnology*. 1992;24:104-8.
- Sapir T, Elbaum M, Reiner O.; Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit.; *EMBO J*. 1997 Dec 1;16(23):6977-84.
- Sasaki S, Shionoya A, Ishida M, Gambello MJ, Yingling J, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S.; A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system.; *Neuron*. 2000 Dec;28(3):681-96.
- Satoh A, Nakanishi H, Obaishi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, Hirao K, Nishioka H, Hata Y, Mizoguchi A, Takai Y.; Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell Adhäsion sites.; *J Biol Chem*. 1998 Feb 6;273(6):3470-5.
- Savaskan NE, Alvarez-Bolado G, Glumm R, Nitsch R, Skutella T, Heimrich B.; Impaired postnatal development of hippocampal neurons and axon projections in the Emx2^{-/-} mutants.; *J Neurochem*. 2002 Dec;83(5):1196-207.

- Schmahl W, Knoedlseder M, Favor J, Davidson D.; Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6-locus.; *Acta Neuropathol (Berl)*. 1993;86(2):126-35.
- Schmechel DE, Rakic P.; Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey.; *Nature*. 1979 Jan 22;277(5694):303-5.
- Schuermans C, Guillemot F.; Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing Telencephalon; *Curr Opin Neurobiol*. 2002 Feb;12(1):26-34. Review.
- Shatz CJ, Luskin MB.; The relationship between the geniculocortical afferents and their cortical target cells during development of the cat's primary visual cortex.; *J Neurosci*. 1986 Dec;6(12):3655-68.
- Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, Wilner A, Henchy R, Crino P, Kamuro K, DiMario F, Berg M, Kuzniecky R, Cole AJ, Bromfield E, Biber M, Schomer D, Wheless J, Silver K, Mochida GH, Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Dobyns WB, Wood NW, Walsh CA.; Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females.; *Hum Mol Genet*. 2001 Aug 15;10(17):1775-83.
- Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T.; Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice.; *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):730-3.
- Sheppard AM, Pearlman AL.; Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the reeler mutant mouse.; *J Comp Neurol*. 1997 Feb 10;378(2):173-9.
- Shinozaki K, Miyagi T, Yoshida M, Miyata T, Ogawa M, Aizawa S, Suda Y.; Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in *Emx1/2* double mutant cerebral cortex.; *Development*. 2002 Jul;129(14):3479-92.
- Sidman RL, Miale II, Feder N.; Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system.; *Exp Neurol*. 1959 Oct;1:322-33.
- Simeone A, Gulisano M, Acampora D, Stornaiuolo A, Rambaldi M, Boncinelli E.; Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex.; *EMBO J*. 1992 Jul;11(7):2541-50.
- Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E.; Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain.; *Nature*. 1992 Aug 20;358(6388):687-90.
- Simpson TI, Price DJ.; Pax6; a pleiotropic player in development.; *Bioessays*. 2002 Nov;24(11):1041-51.
- Smart IH, Smart M.; Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon: I. Autoradiographic studies of the histogenesis of the isocortex and adjacent areas.; *J Anat*. 1982 Mar;134 (Pt 2):273-98.
- Smart IH.; Three dimensional growth of the mouse isocortex.; *J Anat*. 1983 Dec;137 (Pt 4):683-94.
- Smith DS, Niethammer M, Ayala R, Zhou Y, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Tsai LH.; Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian *Lis1*.; *Nat Cell Biol*. 2000 Nov;2(11):767-75.

- Smith FD, Oxford GS, Milgram SL.; Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein.; *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19894-900.
- Sommer L, Ma Q, Anderson DJ.; Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS.; *Mol Cell Neurosci.* 1996;8(4):221-41.
- Stanfield B. B. and Cowan W. M.; The development of the hippocampal region. In *Cerebral Cortex*; eds. Edward G. Jones and Alan Peters 1988, pp. 91-131. New York: Plenum Press.
- Stephens DJ, Banting G.; Direct interaction of the trans-Golgi network membrane protein, TGN38, with the F-actin binding protein, neurabin.; *J Biol Chem.* 1999 Oct 15;274(42):30080-6.
- Stephens DJ, Banting G.; In vivo dynamics of the F-actin-binding protein neurabin-II. *Biochem J.* 2000 Jan 15;345 Pt 2:185-94.
- Stephens DJ, Banting G.; The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking.; *Traffic.* 2000 Oct;1(10):763-8.
- Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS.; Filamins as integrators of cell mechanics and signalling.; *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):138-45
- Stoykova A, Gruss P.; Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns.; *J Neurosci.* 1994 Mar;14(3 Pt 2):1395-412.
- Stoykova A, Fritsch R, Walther C, Gruss P.; Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice.; *Development.* 1996 Nov;122(11):3453-65.
- Stoykova A, Gotz M, Gruss P, Price J.; Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain.; *Development.* 1997 Oct;124(19):3765-77.
- Sun D, Leung CL, Liem RK.; Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins.; *J Cell Sci.* 2001 Jan;114(Pt 1):161-172.
- Sweet HO, Bronson RT, Johnson KR, Cook SA, Davisson MT.; Scrambler, a new neurological mutation of the mouse with abnormalities of neuronal migration.; *Mamm Genome.* 1996 Nov;7(11):798-802.
- Talamillo A, Quinn JC, Collinson JM, Caric D, Price DJ, West JD, Hill RE.; Pax6 regulates regional development and neuronal migration in the cerebral cortex.; *Dev Biol.* 2003 Mar 1;255(1):151-63.
- Tekki-Kessarlis N, Woodruff R, Hall AC, Gaffield W, Kimura S, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD.; Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon.; *Development.* 2001 Jul;128(13):2545-54.
- Temple S.; The development of neural stem cells.; *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):112-7.
- Theil T, Alvarez-Bolado G, Walter A, Ruther U.; Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development.; *Development.* 1999 Aug;126(16):3561-71.

- Thomas S, Thiery E, Aflalo R, Vayssettes C, Verney C, Berthuy I, Creau N.; PCP4 is highly expressed in ectoderm and particularly in neuroectoderm derivatives during mouse embryogenesis.; *Gene Expr Patterns*. 2003 Mar;3(1):93-7.
- Tole S, Christian C, Grove EA.; Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus.; *Development*. 1997 Dec;124(24):4959-70.
- Tole S, Goudreau G, Assimacopoulos S, Grove EA.; Emx2 is required for growth of the hippocampus but not for hippocampal field specification.; *J Neurosci*. 2000 Apr 1;20(7):2618-25.
- Toresson H, Potter SS, Campbell K.; Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2.; *Development*. 2000 Oct;127(20):4361-71.
- Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M.; Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system.; *Development*. 1999 Feb;126(3):443-56.
- Treisman J, Harris E, Desplan C.; The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein.; *Genes Dev*. 1991 Apr;5(4):594-604.
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J.; Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein.; *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33556-60.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J.; Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2.; *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):689-701.
- Tsukada M, Prokscha A, Oldekamp J, Eichele G.; Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein.; *Mech Dev*. 2003 Sep;120(9):1033-43.
- Tyas DA, Pearson H, Rashbass P, Price DJ.; Pax6 regulates cell Adhäsion during cortical development.; *Cereb Cortex*. 2003 Jun;13(6):612-9.
- Uylings HB, van Eden CG.; Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans.; *Prog Brain Res*. 1990;85:31-62.
- Valverde, F., Facal-Valverde, M. V., Santacana, M. and Heredia, M.; Development and differentiation of early generated cells of sublayer VIIb in the somatosensory cortex of the rat: a correlated Golgi and autoradiographic study.; *J. Comp. Neurol* 1989;290, 118-140.
- Visel A, Thaller C, Eichele G.; *GenePaint.org*: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo.; *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32
- Vitalis T, Cases O, Engelkamp D, Verney C, Price DJ.; Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6.; *J Neurosci*. 2000 Sep 1;20(17):6501-16.
- Vivo M, Calogero RA, Sansone F, Calabro V, Parisi T, Borrelli L, Saviozzi S, La Mantia G.; The human tumor suppressor arf interacts with spinophilin/neurabin II, a type 1 protein-phosphatase-binding protein.; *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):14161-9. Epub 2001 Jan 30.
- Wada H, Hashimoto K, Wada Y, Kobayashi M, Izumi A, Sugiyama A, Kohro T, Hamakubo T, Kodama T.; Extensive oligonucleotide microarray transcriptome analysis of the rat cerebral artery and arachnoid tissue.; *J Atheroscler Thromb*. 2002;9(5):224-32.

- Wahle P, Meyer G.; Morphology and quantitative changes of transient NPY-ir neuronal populations during early postnatal development of the cat visual cortex.; *J Comp Neurol.* 1987 Jul 8;261(2):165-92.
- Walsh CA, Goffinet AM.; Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse.; *Curr Opin Genet Dev.* 2000 Jun;10(3):270-4
- Walther C, Gruss P.; Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS.; *Development.* 1991 Dec;113(4):1435-49.
- Ware ML, Fox JW, Gonzalez JL, Davis NM, Lambert de Rouvroit C, Russo CJ, Chua SC Jr, Goffinet AM, Walsh CA.; Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, *mdab1*, in the scrambler mouse.; *Neuron.* 1997 Aug;19(2):239-49.
- Warren N, Price D.; Roles of Pax-6 in murine diencephalic development.; *Development.* 1997 Apr;124(8):1573-82.
- Wood JG, Martin S, Price DJ.; Evidence that the earliest generated cells of the murine cerebral cortex form a transient population in the subplate and marginal zone.; *Brain Res Dev Brain Res.* 1992 Mar 20;66(1):137-40.
- Xia H, Winokur ST, Kuo WL, Altherr MR, Bredt DS.; Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs.; *J Cell Biol.* 1997 Oct 20;139(2):507-15.
- Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR.; NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration.; *Mol Biol Cell.* 1995 Mar;6(3):297-310.
- Yoneshima H, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K.; A novel neurological mutant mouse, *yotari*, which exhibits reeler-like phenotype but expresses CR-50 antigen/reelin.; *Neurosci Res.* 1997 Nov;29(3):217-23.
- Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, Aizawa S.; *Emx1* and *Emx2* functions in development of dorsal telencephalon.; *Development.* 1997 Jan;124(1):101-11.
- Yuasa S.; Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression.; *Arch Histol Cytol.* 2001 Feb;64(1):119-26.
- Yuasa S.; Development of astrocytes in the mouse hippocampus as tracked by tenascin-C gene expression.; *Arch Histol Cytol.* 2001 May;64(2):149-58.
- Yuasa S, Nakajima M, Aizawa H, Sahara N, Koizumi K, Sakai T, Usami M, Kobayashi S, Kuroyanagi H, Mori H, Koseki H, Shirasawa T.; Impaired cell cycle control of neuronal precursor cells in the neocortical primordium of presenilin-1-deficient mice. *J Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):501-13.

6 Anhang

6.1 Tabelle

Auf Pax6 getestete Kandidaten und ihre Einteilung in verschiedene Kategorien. Gelb unterlegte Felder = kortikale Platte ist verändert; grün unterlegte Felder = subventrikuläre Schicht ist verändert; rot unterlegte Felder = Subplatte ist verändert; blau unterlegte Felder = ventrikuläre Schicht ist verändert. Abkürzungen: y, yes; n, no; sbv, subventrikuläre Schicht; spl, Subplatte; ven, ventrikuläre Schicht; il, intermediäre Schicht; ctx, Kortex; cpl, kortikale Platte

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E 18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
2810418N01Rik	y	y	?	down	n	A	sbv down	completely unknown	unknown	unknown
9130024F11Rik	y	no	?	down	y	A	spl vanishes (histol. marker)	completely unknown	unknown	unknown
Bcan	y	y	no	down+spreads	y	A	ven down+expands	cell Adhäsion	extracell.	hyaluronic acid binding
Bhlhb5	y	no	y	histol.	y	A	spl vanishes (histol. marker)	regulation of transcription	nucleus	repressor
Birc5	y	y	no	up	y	A	sbv increases	antiapoptotic	cytoplasm	cystein protease inhibitor
Catna1	y	y	no	vanishes	y	A	ven vanishes	cell Adhäsion	cytoskel.	adhes., struct.
Cbx1	y	y	y	down	n	A	ven cpl vanish	chromatin assembly/disass.	heterochro.	chr. binding
Cdh10	y	no	no	down	y	A	sbv vanishes spl stays	cell Adhäsion	int. membr.	Ca++ binding
Cxcl12	y	no	no	down	y	A	sbv vanishes	chemotaxis, brain develop.	extracell.	chemokine
Cyln2	y	y	no	expands	n	A	ven expands	transcription	cytop.,nucl.	protein binding, RNA pol.II
D14Ert732e	y	y	?	up	y	A	sbv up expands	ser/thr kinase	unknown	ATP binding, protein binding
Dlx2	y	no	y	appears	y	A	invades dramatically sbv to il	cell diff., development	transcription factor	DNA binding
Fgfr1	y	y	no	down	y	A	spl vanishes	brain development	integral membrane	fgf receptor, ATP binding
Fgfr2	y	y	no	down	y	A	spl vanishes; increases in ven	brain development	integral membrane	fgf receptor, ATP binding
Gad1/Gad67	y	no	no	appears	n	A	invades ctx dramatically	neurotransmitter biosynthesis		glutamate decarboxylase
Gnai2	y	y	no	down	y	A	ven vanishes	signaling coupled to receptor		ATP binding GTP binding

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Hip1	y	y	no	down		A	ven cpl down	endocytosis	cytoplasm	clathrin binding, protein binding
Hip1 E18.5	y	y	no	down		A	layer 6b seems to be still there	endocytosis	cytoplasm	clathrin binding, protein binding
Jmj	y	no	y?	down	y	A	sbv and cpl disappear	development	cytopl., nucleus	ATP binding, DNA binding
Kifc5a E18.5	y	y	no	up		A	same	development	cytopl., nucleus	ATP binding, DNA binding
Kifc5a	y	y	no	up		A	ven expands	microtubule-based processes	kinesin complex	ATP binding, kinesin motor activity
Kpna4	y	y	no	down	n	A	ven down	unknown	unknown	unknown
Lix1	y	no	no	down	y	A	sbv & spl vanish	unknown	unknown	unknown
Neurod1	y	no	y	down	y	A	sbv vanishes	cell differentiation, development	nucleus	DNA binding
Neurod4	y	y	y	down	y	A	ven vanishes	cell differentiation, development	nucleus	DNA binding
Neurog1	y	y	y	down	n	A	ven vanishes	cell differentiation, development	nucleus	DNA binding
Neurog2	y	y	y	down	y	A	ven vanishes	cell differentiation, development	nucleus	DNA binding
NudC	y	y	?	up	y	A	sbv up	unknown	unknown	unknown
Odz3 und 18.5	y	y	no	up	y	A	up in ven	unknown	integral membrane	unknown
Odz4	y	no	no	down	n	A	cpl condenses; not very interesting			
Otx1	y	y	y	down	y	A	ven down	development	nucleus	DNA binding
Pax6	y				n	A				
Pcp4	y	y	no	down histol.	n	A	sbv vanishes; cpl stays	unknown	unknown	Ca++ binding
Pcp4 E18.5	y	y	no	down histol.	y	A	One layer disappears!	unknown	unknown	Ca++ binding
Pde1b	y	y	no	down	n	A	up in ven	signal transduction		phosphodiesterase, calmodulin binding
Ptpri	y	y	no	up	y	A	up in ven	phosphatase, cell Adhäsion	integral membrane	phosphatase, hydrolase
Sema7a	y	no	no	down	y	A	spl vanishes	development, neurogenesis	integral membrane	
Sfrp2	y	y	no	down	n	A	cpl vanishes; ven a bit decreased	development	transmembrane	receptor
Sfrp2 E18.5	y	y	no	down	y	A	One layer disappears! Layer 6?	development	transmembrane	receptor
Sgyr3	y	no	no	down	n	A	vanishes from il		integral membrane	
Syt6	y	no	no	vanishes	y	A	cpl vanishes	transport	membr.	transport

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Trim9	y	no	no	down	y	A	sbv vanishes	synaptic vesicle exocytosis	cytoplasm	protein binding
2410004I17Rik	y	y	?	down + spreads	n	B	sbv down+expands	unknown	unknown	unknown
Adcy1	y	no	no	down	y	B	cpl decreases			
Arx	y	y	y	down	n	B	germinal zone disappears	development	transcription factor	DNA binding
Atm	y	y	y	up	n	B	increases a bit in ven	cell cycle	cytopl. nucleus	DNA binding, inositol kinase
Bub1	y	y	no	up	n	B	sbv increases	cell cycle	nucleus	ATP binding, kinase
Ccnd2	y	y	no	up	n	B	sbv increases	cell cycle	nucleus	cyclin-dependent protein kinase
Cdc2a	y	y	no	up	n	B	sbv increases	cell cycle	nucleus	ATP binding, Hsp70 protein binding
Chaf1a	y	y	no	up	n	B	sbv up+expands	cell cycle, DNA repair	heterotrimeric G-protein complex	GTPase, signal transducer
Cnil	y	no	no	down	n	B	spl vanishes	intracellular signaling cascade	integral membrane	
Cpsf5	y	y	no	up	n	B	ven increases			
Crabp1	y	no	no	down	n	B	invades cpl from hippocampus	transport		binding, lipid binding
Dab1	y	no	no	down	y	B	spl vanishes			
Efnb3	y	no	no	up	n	B	increases in cpl			
Enc1	y	no	no	up	n	B	sbv vanishes			
FoxM1	y	no	y	up	n	B	sbv up+expands			
Hnt-pending (Neurotrimin)	y	no	no	down	n	B	spl down			
L1cam	y	no	no	histol.	n	B	germinal border down			
Lpl	y	no	no	down	n	B	sbv down			
Mcm5	y	y	?	expands	n	B	sbv up+expands			
Mup2	y	y	?	histol.	n	B	ven very reduced			
Ndr2	y	y	no?	down	n	B	very reduced in ven, disapp. from cpl			
NeuroD6	y	y	y	down	n	B	sbv disappears			
Nfia	y	no	y	down	n	B	spl down			
Ngfr/p75	y	no	no	up	n	B	cpl down			

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Odz2	y	no	no	histol.	n	B				
Pgrmc1	y	no	no	down	n	B	cpl down			
Reelin	y	no	no	histol.	n	B	sbv disappears			
Ror beta	y	no	no	down	y	B	cpl down			
Sema5A	y	y	no	down	n	B				
Tbr1	y	no	y	down	n	B	il down	txf	nucleus	txf
Tmpo	y	y	y?	up	n	B	sbv up+expands			
Top2a	y	y	y		n	B	ven expands			
Vamp	y	no	no	down	n	B				
Wnt7b	y	no	no	down	n	B	disappears from il			
Zfhx1b	y	no	y	histol.	n	B	spl down			
4632413K17Rik	?		?		n	C				
9030624B09Rik	y	no	?	histol.	n	C	sbv up+expands	N receptor signaling pathway	nucleus	protein binding
Atp5o	y	y	no	down	n	C	ven vanishes; spl vanishes			
Auts2	y				n	C	germinal border down			
Cbfa2T1	y	no	y	up	n	C				
Ccna2	y	no	no	histol.	n	C				
Cdca1	y	y	no?	up	n	C	sbv expands a bit			
Cdh9	y	no	no	down	n	C				
Cdk5r2	y	no	no	up	n	C	cpl condenses; not very interesting			
Centg3	y	no	y	down	n	C				
Chrn2	y	no	no	down	n	C				
Clu	y	y	no	down	n	C	ven a bit down			
CoupTf1	y				n	C				
Dnajb9	y				n	C				

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Dpysl4	y	y	no	up	n	C	spreads diffusely from ven up			
Drd1a	y	no	no	histol.	n	C				
Dtx1	y	no	no	histol.	n	C				
EphA7	y	no	no	down	n	C				
Fkbp3	y	y	no	down	n	C				
Fzd8	y	y	no	up	n	C	ven up			
G3bp-pending	y	y	no	diffuses	n	C	diffuses out from ven			
Garb2	y	no	no	histol.	n	C				
Gadd45	y	y	no	spreads	n	C				
Gria1	y	no	no	distrib.	n	C	distribution changes (accumulates up)			
Igfbpl1	y	no	no	diffuses	n	C	sbv diffuses			
Itn	y	y	no	histol.	n	C	ven decreases; cpl condenses			
Kif11	y	y	no	down	n	C	ven disappears, sbv conserved			
Kif4	?		no		n	C	ven increases			
Lhx6	y	no	y	down	n	C				
Limk1	y	no	y	down	n	C	contradictory results; potentially very interesting			
Lrig1/Lig1	y	y	no	down	n	C				
Mc4r	y	no	no	up	n	C				
Mcm7	y	y	?	expands	n	C				
Mdk	y	y	no	up	n	C				
Mif	y	y	no	down	n	C	ven decreases			
Pde4a	y	no	no	up	n	C	spl vanishes			
Pde9a	y	no	no	up	n	C	cpl expands a bit down			
Plxnb1	y	no	no	down	n	C	ugly probe; impossible to figure out			
Plxnb2	y	y	no	down	n	C				

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Pou2f1	y	no	no	bad	n	C				
Ptprd	y	no	no	down	n	C	ven vanishes; il decreases			
Slc6a1	y	no	no	up	n	C	goes up everywhere			
Sox5	y	y	y	histol.	n	C	il down cpl stays			
Sst	y	no	no	histol.	n	C				
Stmn3	y	no	no	histol.	n	C	il expands			
Stx1a	y	no	no	down	n	C				
Syt7	y	no	no	up	n	C	spl vanishes cpl up	transport	membr.	transport
Tera-pending	y	y	?	up	n	C	germinal zone up+expands	unknown	unknown	unknown
U2af1	y	y	no	down	n	C				
Vdac2	y	y	no	down	n	C				
Vim	y	y	no	histol.	n	C	germinal zone up+distorted		filament	
WBSscr17	y	no	no	up	n	C				
Ywhag	y	no	no	down	n	C	cpl down			
Cdh2	y	no	no	down	n	C	spl vanishes			
Gas5	y	no	no	bad	n	C				
Gmps	y	no	no	bad	n	C				
Lamp	y	no	no	bad	n	C				
Pde1c	y	y	no	bad	n	C	sbv vanishes			
Ttc3/Tprd	y	no	no	bad	n	C				
6A3-5 rat	n									
Adamts-1	n									
Adamts-5	n									
Adcy 3	n									
Adcy 5	n									
Adcy 6	n									
Al606473	n									
Ankrd3/Pkk	n									
Anp32a	n									
Ap2m1	n									
Apba2	n									
Arf3	n									
Arhgap	n									

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
A-Synuclein	n									
Ataxin1	n									
Bace2	n									
Baz1b	n									
Big1	n									
Big2	n									
Bnip3l	n									
Btg3	n									
Bubblegum	n									
C21orf19	n									
C21orf25	n									
C21orf4	n									
C21orf5	n									
C21orf6	n									
C21orf80	n									
CB1	n									
Cbfb	n									
CBX5	n									
Cck	n									
Cct8	n									
CD81	n									
CDH11	n									
CDH13	n									
Cer1	n									
Chrd	n									
Chrm4	n									
Chrna4	n									
Cldn8	n									
Col18A1	n									
Comt	n									
Cornichon	n									
CoupTf2	n									
Crb1	n									
Crumbs1	n									
Cryz1l	n									
Cstb	n									
Dazap1	n									
Dkk1	n									
Dmbx1	n									
Donson	n									
Dscam	n									
E28 Riken	n									
E2F3	n									
E2F5	n									
E2F6	n									
E58 Riken	n									
E61 Riken	n									
Edr	n									
Efnb1	n									
Elk3	n									
Eomes	n									
Erh	n									
Esr1	n									
Ewsh	n									
Extl3	n									
F3	n									
Fabp3	n									
Fgf1	n									
Fgf10	n									

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Fgf13	n									
Fgf14	n									
Fgf15	n									
Fgf17	n									
Fgf9	n									
Fgfr3	n									
Fgfr4	n									
Flot	n									
Fnbp3	n									
Frzb	n									
Fzd4	n									
Fzd9 (Fzd3)	n									
Gart	n									
Gas1	n									
Gda	n									
Gdi1	n									
Glud	n									
Gnao	n									
Gnas	n									
Grin1	n									
Guk1	n									
H2bfs	n									
Hap1	n									
Hec-pending	n									
Hunk = Mak-v	n									
Ifngr2	n									
Igsf5	n									
Jam2	n									
Jcam2	n									
Kcne2	n									
KIAA0618	n									
Kif5a	n									
Kremen	n									
Lef1	n									
Lhx1	n									
Lhx2	n									
Lhx5	n									
Lhx9	n									
Lis1	n									
Lmo1	n									
Lmo2	n									
Lrp6	n									
Lta4h	n									
Mapre1	n									
Mki67	n									
Chst2	n									
mRamp	n									
Mrps39	n									
Myc	n									
Ncam2	n									
Ndufv3	n									
Nes	n									
Nf2	n									
Nfe2l2	n									
Nfix	n									
Ngn3	n									
Notch3	n									
Nr1d2	n									
Nr3c1	n									

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Nsep1	n									
Nudel	n									
Pax3	n									
Pcnt2	n									
Pcsk1n	n									
Pdxk	n									
Pex14	n									
Pfkl	n									
Pkia	n									
Pknox	n									
Pld3	n									
PlexinC1	n									
Plxna3	n									
Pnck	n									
Ppap2a	n									
Prdx	n									
Prim1	n									
Prkcz	n									
Psap	n									
PTP mu	n									
PTP rho	n									
Q11	n									
Q37	n									
Q44	n									
Q47	n									
Q71	n									
Q75	n									
Q79	n									
Rack17	n									
Rad54B1	n									
Rangap1	n									
Rbm11	n									
Rel	n									
Rfx1	n									
Rik130076O07	n									
Rik900075G08	n									
Rpn2	n									
RST507	n									
Rtn2	n									
Rxrg	n									
Sept5	n									
Sept7	n									
Seb1	n									
Sema3a	n									
Sema4F	n									
Sema5B	n									
Sfrp1	n									
Shfdg1	n									
Slc25a3	n									
Sod1	n									
Sox9	n									
Stch	n									
Stk6	n									
Stmn4	n									
Sv2a	n									
Svop	n									
Synj1	n									
Syt11	n									
Syt3	n									

Locus Link Gene Symbol (other names; other names)	changes?	co-loc?	txf?	pattern	E18.5?	how good?	notes	Process	Component	Function
Tcf3	n									
Tcf2a	n									
Tegf	n									
Teneurin m1	n									
Thra	n									
Tim	n									
Tle1	n									
Tle3	n									
Tmem1	n									
Trim27	n									
Trp53	n									
Tsc2	n									
Tsga2/1	n									
Ube2g2	n									
Usf1	n									
Wdr4	n									
Wnt7a	n									
Wrb	n									
Zfp161	n									

Tabelle 6.1 Auf Pax6-Mutante getestete Kandidaten

6.2 Abkürzungen

A	Adenin
Ab.	<i>Antibody</i>
Abb.	Abbildung
A/P	anterior/posterior
APS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BGB	Bundesgesetzbuch
bHIH	basic Helix-loop-Helix
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	Zirka
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
CIP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CTP	Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA

DTT	Dithiotreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxymethylnitrilo)tetraessigsäure
et al.	et alteri
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
for	<i>forward</i> (Primerbezeichnung)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Grün fluoerszierendes Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIT	high throughput
HRP	<i>horse redish peroxidase</i>
Ig G	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiol- β -D-Galactosidase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasen
ko	Knock-out
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LB	<i>Luria Broth Base</i>
M	molar
mBq	Millibequerel
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MWB	Maleatwaschpuffer
NBT	4-Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
NGS	<i>Normal goat serum</i>
nm	Nanometer
NTE	Natrium-Tris-EDTA-Puffer
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
P	postnataler Tag
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBT	PBS mit Tween-20
PCR	Polmerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidendifluorid
rev	<i>reverse</i> (Primerbezeichnung)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SB	<i>Sample Buffer</i>
SCLH	Subcorticale Laminare Heterotopia
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sey	<i>small eye</i> , Allel von Pax6
³⁵ S	Schwefelisotop 35
Sp6	Sp6-Bakteriophagen-Promoter
SSC	Natrium-Citratpuffer, salzhaltig
T7	T7-Bakteriophagen-Promoter
TAE	Trisacetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
TNB	Tris-NaCl-Blocking-Reagenz Puffer
TNT	Tris-NaCl-Tween Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
ü.N.	über Nacht
UTP	Udenintriphosphat
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V	Volt
Wt	Wildtyp
YPDA	<i>Yeast, Peptone</i> , Dextrose, Adenin
YTH	Yeast Two Hybrid
z.B	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, Judit Oldekamp, geboren am 11.10.1974 in Nordhorn, an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Chemie der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Molekulare Analysen zur Kortextentwicklung der Maus

am Max Planck Institut für experimentelle Endokrinologie, in der Abteilung „Molekulare Embryologie“, in Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Eichele ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung der Promotion eingereicht, noch wurden diese oder andere Arbeiten als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den

Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Eichele für die die Gelegenheit, meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und für die Förderung eines selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitsstils.

Herrn Dr. Gonzalo Alvarez-Bolado, Herrn PD Dr. Thomas Skutella und Nadine Krämer für eine konstruktive und sehr produktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Walter Müller für die freundliche Übernahme der Begutachtung und Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Herrn Prof. Bernd Otto für die Bereitschaft als dritter Referent meine Arbeit zu beurteilen.

Marei Warnecke, die einige der Pax6-*In Situ*-Hybridisierungen durchgeführt hat, sowie Dr. Axel Visel, Babara Fischer, Uwe Grunenberg, Doreen Deimer und Martin Kaatz für die Unterstützung im Pax6-Projekt.

Dr. Henrik Oster für das Korrekturlesen der Arbeit.

Weiterer Dank gilt Dr. Miki Tsukada, Alexander Prokscha, Cornelia Maslo, Christine Zwingmann, Heike Krause, Polina Spies, Dr. Xunlei Zhou, Qihong Jiang, Frank Sacher, Judit Kovac, Dr. Carsten Möller, Dr. Markus Hüchel, Dr. Pablo Szendro, Sarah Herzog, Claus Ebert, Karola Neubert, Sabine Bergmann, Karsten Mävers, Vera Langer, Nadine Naujokat stellvertretend für das Tierhaus, Uwe Herzig stellvertretend für die Werkstatt, und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung meiner Arbeit und das gute Arbeitsklima.

Meiner Familie danke ich für den guten Start ins Leben und für die jahrelange finanzielle Unterstützung des Studiums.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Freund Christian für die jahrelange Unterstützung während des Studiums und der Promotion, dafür, dass er immer an mich geglaubt hat und für alles andere, das hier gar nicht aufgezählt werden kann.

Veröffentlichungen

*Oldekamp J, *Krämer N, Alvarez-Bolado G, Skutella T; bHLH gene expression in the emx2-deficient dentate gyrus reveals defective granule cells and absence of migrating precursors; Cereb Cortex; June 2004; epub ahead of print, april 2004

Oldekamp J, Kramer N, Alvarez-Bolado G, Skutella T; Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development.; Gene Expr Patterns. 2004 May; 4(3):283-8.

Tsukada M, Prokscha A, Oldekamp J, Eichele G; Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein; Mech Dev. 2003 Sep; 120(9):1033-43.

*Brinks H, *Conrad S, *Vogt J, *Oldekamp J, Sierra A, Deitinghoff L, Bechmann I, Alvarez-Bolado G, Heimrich B, Monnier PP, Mueller BK, Skutella T; The Repulsive Guidance Molecule RGM is involved in the Formation of Hippocampal Connections; J Neurosci. 2004 April; 24(15):3862-9

*these authors contributed equally to the work

Lebenslauf

Name	Judit Oldekamp
Geburtstag	11.10.1974
Geburtsort	Nordhorn
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Hochschulausbildung

05/2001 - 05/2004	Dissertation in der Max Planck Gesellschaft am Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover; Abteilung molekulare Embryologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gregor Eichele
09/2000 - 03/2001	Diplomarbeit in der Max Planck Gesellschaft am Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover; Abteilung molekulare Embryologie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gregor Eichele
09/2000	Diplomprüfung (Biochemie)
04/1996	Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität Hannover
10/1994 - 03/1996	Studium der Oecotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

06/1994	Abitur
08/1987 - 06/1994	Besuch des Gymnasiums Nordhorn
08/1985 – 07/1987	Orientierungsstufe Deegfeld in Nordhorn
08/1981 – 07/1985	Grundschule Stadtflur in Nordhorn

