

**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der**

**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**

**der**

**Ruprecht-Karls-Universität**

**Heidelberg**

**vorgelegt von**

**Diplom-Biochemiker Wulf Eckhard Haubensak**

**aus Tübingen**

**Tag der mündlichen Prüfung:\_\_\_\_\_**

# **Analyse Neurone-generierender Zellteilungen im Neuroepithel der Maus**

**Gutachter: Prof. Dr. Wieland B. Huttner**

**PD Dr. Hans-Hermann Gerdes**

*meinen Eltern*

## ZUSAMMENFASSUNG

In Vertebraten kann die Zunahme der Gehirngröße verschiedener bzw. die relative Größe von Gehirnarealen innerhalb einer Spezies auf eine verlängerte Proliferationsphase neuronaler Vorläuferzellen im Neuroepithel (Neuroepithelzellen) zurückgeführt werden. Die Dauer der Proliferationsphase und damit die Neuronenzahl wird vermutlich durch das *timing* des Übergangs von im *cell fate* symmetrischen, proliferativen (Generierung zweier Neuroepithelzellen) zu asymmetrischen, differenzierenden Zellteilungen (Generierung einer Neuroepithelzelle und eines Neurons) kontrolliert. Direkte Beweise für die Existenz dieser asymmetrischen Teilungen und deren Einordnung in die *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ stehen noch aus, genauso wie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und die genetische Kontrolle des „Umschaltens“ weitgehend unbekannt sind. In diesem Kontext wurden durch die Expression von GFP unter Kontrolle regulatorischer Sequenzen des TIS21-Gens spezifisch Neurone-generierende Neuroepithelzellen markiert, um (i) die Symmetrie der Neurone-generierenden Zellteilung videomikroskopisch zu untersuchen und (ii) eine differentielle Analyse der Zellbiologie (in dieser Arbeit: Verteilung apikaler Membran, Zellzyklusdauer) und Genexpression von proliferierenden vs. Neurone-generierenden Neuroepithelzellen zu ermöglichen.

Es wurden drei transgene (TG1, TG2, TG3) und eine *TIS21-GFP-knock in*-Mauslinie (KI1) etabliert. TG1 enthält 2 kb 5', TG2 17 kb 5' und TG3 6 kb 5'+8 kb 3' genomischer Sequenz relativ zum TIS21-Transkriptionsstart. In KI1 ersetzt GFP das offene Leseraster von TIS21 in Exon 1. KI1 exprimiert entlang des ganzen Neuralrohrs, TG2 im Mittel-, Hinterhirn und Rückenmark und TG3 im Vorder-, Mittel-, Hinterhirn und Rückenmark GFP in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen. Die unterschiedlichen Expressionsmuster implizieren: Die Expression von TIS21 im Neuroepithel wird offensichtlich von verschiedenen Elementen gesteuert, die jeweils bestimmte Regionen im Neuralrohr abdecken, und die nicht mit dem *in vitro* funktionellen proximalen TIS21-Promoter (0.4 kb 5') identisch sind.

In Schnittkulturen von Neuralrohr-Explantaten aus *TIS21-GFP-knock in*-Embryonen wurden mit Multiphoton-Videomikroskopie Neurone-generierende Teilungen über einen Zeitraum von bis zu 16 h verfolgt. Zu Beginn der Neurogenese im Hinterhirn (E10) bzw. Telencephalon (E12) wurden neben sich apikal teilenden neuronalen Vorläuferzellen überraschend auch GFP-positive Zellen entdeckt, die sich auf der basalen Seite des Neuroepithels teilen. Tochterzellen apikaler Mitosen wandern mit signifikant verschiedener Geschwindigkeit in basaler Richtung, wobei eine Tochterzelle bevorzugt im Neuroepithel, die andere in den neuronalen Schichten verbleibt. Dagegen wandern beide Tochterzellen basaler Teilungen tendenziell mit gleicher Geschwindigkeit in neuronale Schichten. Demnach existieren in Vertebraten zwei Typen Neurone-generierender Teilungen: (i) im *cell fate* asymmetrische, apikale Teilungen typischer Neuroepithelzellen und (ii) symmetrische, basale Teilungen einer hier erstmals beschriebenen Zellpopulation.



Als mögliche Steuerungsmechanismen des Übergangs von Proliferation zu Neurogenese wurden (i) die Verteilung apikaler Membran bei apikalen Teilungen von, und (ii) die Zellzykluslänge in, proliferierenden vs. Neurone-generierenden Neuroepithelzellen untersucht. Die Orientierung der Teilungsebene (abgeleitet aus der Chromatinfärbung in Anaphase) relativ zur apikalen Membran (identifiziert als Lücke in der basolateralen, Cadherin-positiven Plasmamembran) zu frühen Stadien der Neurogenese (E10.5-E11.5 Mes-, Di- und Telencephalon) im *TIS21-GFP-knock in* zeigt, dass der Schritt von Proliferation zu Neurogenese durch einen Wechsel in der Verteilung apikaler Membrankomponenten kontrolliert werden könnte: Apikale Teilungen mit symmetrischer Verteilung der apikalen Membran sind größtenteils proliferierend, Teilungen mit asymmetrischer Verteilung der apikalen Membran Neurone-generierend (Kosodo *et al.*, 2002). Zudem korreliert die Differenzierung mit einer Verlängerung des Zellzyklus: Durch kumulative BrdU-Markierung im *TIS21-GFP-knock in* konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Neurogenese (E10.5 Telencephalon) Neurone-generierende Neuroepithelzellen den Zellzyklus um 40% auf 13 h gegenüber 9 h in proliferierenden Neuroepithelzellen, verlangsamten. Eine ursächliche Beteiligung von TIS21, das spezifisch in Neurone-generierenden, also sich langsamen teilenden Neuroepithelzellen exprimiert ist und bekanntermaßen Zellzyklus-verlangsamend wirkt, an diesem Phänomen ist noch nicht geklärt. Homozygote *TIS21-GFP-knock in*-Tiere, als *TIS21-knock out*-Modell, zeigen allerdings keinen offensichtlichen qualitativ veränderten Ablauf der Neurogenese. Dagegen verschiebt sich im Blutbild das Gleichgewicht von Lymphozyten zu Granulocysten. In Verbindung mit dem in dieser Arbeit beschriebenen embryonalen und adulten Aktivitätsmuster - TIS21 ist in differenzierenden Zellpopulationen verschiedener Gewebe exprimiert - impliziert dies eine physiologische Funktion von TIS21 bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen.

Die physiologische Funktion von Genen kann durch *loss of function*-Studien untersucht werden, in der Regel durch eine induzierte Veränderung im Genom (z.B. Mutagenese-*screens* oder wie hier für TIS21: *gene targeting*). Hier wurde die Möglichkeit untersucht, mit *RNA-interference* (RNAi) spezifisch die Expression von Genen in postimplantorischen Mäuseembryonen zu unterdrücken. Konkret wurde esi-(*endonuclease III-prepared short interfering*)-RNA in E10 Mäuseembryonen intraventrikulär injiziert, durch Elektroporation in Neuroepithelzellen transfiziert und der Effekt von RNAi nach 24 h *in vitro*-Kultur der Embryonen analysiert. esiRNA gegen  $\beta$ -Galaktosidase, koelektroporiert mit einem  $\beta$ -Galaktosidase- und einem GFP-Expressionsvektor, inhibierte spezifisch die  $\beta$ -Galaktosidase- nicht aber die GFP-Expression. In einem analogen Experiment in E10 *TIS21-GFP-knock in* Embryonen verhinderte die Elektroporation von esiRNA gegen GFP die GFP-Expression zu Beginn der Neurogenese. Es ist also prinzipiell möglich, auch in postimplantorischen Mäuseembryonen (d.h. im Säuger *in vivo*) via esiRNA RNAi zu induzieren und selektiv die Expression endogen exprimierter Gene zu unterdrücken.

# INHALT

	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Evolutionäre Zunahme der Gehirngröße	6
1.2	Histogenese des ZNS	9
1.3	Modelle zur Neurogenese	12
1.4	Der Übergang von Proliferation zu Differenzierung kontrolliert die Neuronenzahl	16
1.5	Symmetrische und asymmetrische Zellteilungen im Neuroepithel	20
1.6	Steuerung des Übergangs von proliferierenden zu differenzierenden Zellteilungen	22
1.7	Hinweise auf Mechanismen und Gene: Kandidatengene verändern die Neuronenzahl	27
1.8	TIS21 - ein Marker für Neurone-generierende Zellteilungen	33
1.9	<i>TIS21</i> -GFP-markierte Neuroepithelzellen – ein Ansatz zur Untersuchung der Proliferationskontrolle im Neuroepithel	36
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>38</b>
2.1	Material	38
2.1.1	Geräte	38
2.1.2	Chemikalien	38
2.1.3	Kits	39
2.1.4	Filme	39
2.1.5	Bakterienstämme	40
2.1.6	Versuchstiere	40
2.1.7	Zelllinien	40
2.1.8	Vektoren	40
2.1.9	Antikörper	41
2.1.10	Oligonukleotide	42
2.1.11	Puffer und Medien	43
2.2	Methoden	47
2.2.1	Plasmid-Mini-Präparation	47
2.2.2	Plasmid-Maxi-Präparation	47
2.2.3	PCR	47
2.2.4	Restriktionsanalyse	48
2.2.5	DNA-Sequenzierung	48

2.2.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	48
2.2.7	Klonierung der Transgene und Targeting-Vektoren	49
2.2.8	Präparation von genomischer DNA	51
2.2.9	Genotypisierung mittels PCR	51
2.2.10	Markierung von DNA-Sonden	52
2.2.11	Genotypisierung mittels Southern-Blot	52
2.2.12	RNA-Präparation	52
2.2.13	Northern-Blot	53
2.2.14	Proteinpräparation	53
2.2.15	Western-Blot	53
2.2.16	Immunhistochemische Färbungen von Kryostatschnitten	53
2.2.17	Kultivierung von Vero-Zellen	54
2.2.18	Transfektion von Vero-Zellen	54
2.2.19	Kultivierung von Feeder- und ES-Zellen	54
2.2.20	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	55
2.2.21	Genotypisierung von ES-Zellklonen	56
2.2.22	Amplifikation von ES-Zellklonen	56
2.2.23	Injektion von ES-Zellklonen in Blastocysten	56
2.2.24	Pronukleusinjektion von DNA	56
2.2.25	Videomikroskopie	57
2.2.26	BrdU-Markierung	58
2.2.27	FACS-Analyse	58
2.2.28	Präparation von esiRNA	58
2.2.29	Elektroporation und <i>whole embryo culture</i>	59
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>60</b>
3.1	Generierung <i>TIS21</i> -GFP-transgener Mauslinien	60
3.2	Generierung von <i>TIS21</i> -GFP- <i>knock in</i> -Mauslinien	62
3.3	TG1, TG2, TG3 und KI1 exprimieren GFP <i>in vivo</i>	67
3.4	TG1, TG2, TG3 und KI1 zeigen Unterschiede im Expressionsmuster	68
3.5	Die Expression von TG2, TG3 und KI1 korreliert mit den Gradienten der Neurogenese	74
3.6	TG2, TG3 und KI1 markieren Neurone-generierende Neuroepithelzellen	77
3.7	KI1 markiert im gesamten ZNS Neurone-generierende Neuroepithelzellen während der ganzen neurogenetischen Periode	81

3.8	Apikale und basale Neurone-generierende Zellteilungen im Neuroepithel während der frühen Neurogenese	88
3.9	Die ersten Neurone entstehen aus asymmetrischen apikalen Teilungen und symmetrischen basalen Teilungen im Neuroepithel	90
3.10	Die asymmetrische Verteilung apikaler Membran korreliert mit Neurogenese	94
3.11	In Neurone-generierenden Neuroepithelzellen verlangsamt sich der Zellzyklus	96
3.12	KI1-homozygote Tiere sind ein <i>TIS21-knock out</i>	98
3.13	In <i>TIS21-knock out</i> Mäusen verläuft die Neurogenese normal	99
3.14	Das <i>TIS21</i> -Gen ist in adulten Geweben exprimiert	102
3.15	<i>TIS21-knock out</i> Mäuse zeigen ein verändertes Blutbild	106
3.16	esiRNA unterdrückt spezifisch die Genexpression im Neuroepithel	109
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>112</b>
4.1	<i>TIS21</i> -GFP markiert Neurone-generierende Neuroepithelzellen	112
4.2	Neurone entstehen aus Neuroepithelzellen und „BMCs“	115
4.3	Die asymmetrische Verteilung apikaler Membran korreliert mit Neurogenese	125
4.4	Ein verlangsamter Zellzyklus korreliert auf zellulärer Ebene mit Neurogenese	127
4.5	Regiospezifische Elemente regulieren die Expression von <i>TIS21</i>	128
4.6	Zur Funktion von <i>TIS21</i> in Proliferations- und Differenzierungsprozessen	130
4.7	Die Suche nach Kandidatengen zur Proliferationskontrolle – ein mechanistischer Ansatz	132
4.8	Evaluierung von Kandidatengen: Gen- <i>knock down</i> durch esiRNA	134
4.9	Perspektive	136
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>159</b>
6.1	Alignment der BTG/Tob-Proteinsequenzen	159
6.2	Abkürzungen	161
	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b>	<b>163</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>165</b>

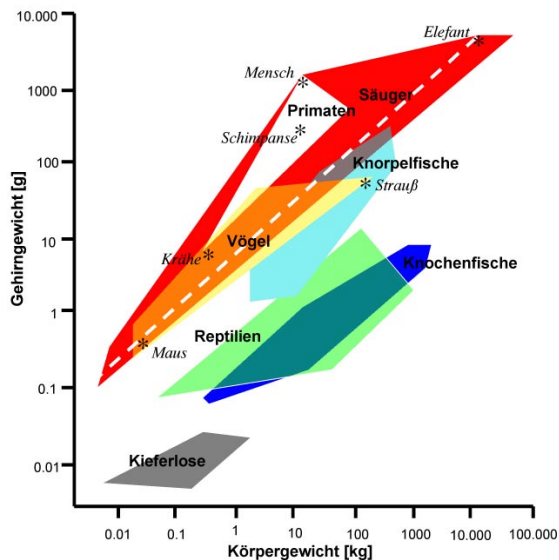
# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Evolutionäre Zunahme der Gehirngröße

Als Spezies zeichnen wir uns, so glauben wir, insbesondere durch unseren Intellekt aus und neigen dazu, uns auf Grund dessen eine evolutionäre Sonderstellung zuzusprechen - aus anthropozentrischer Sicht vielleicht zurecht. In Hinblick auf kognitive Fähigkeiten, die Entwicklung von Sprache und Kultur, sind wir wirklich einzigartig, auch im Vergleich mit unseren nächsten Verwandten, den Schimpansen. Beim Blick auf ihr Genom überrascht deshalb umso mehr, wie sehr wir uns genetisch ähneln, sind die Gene von Menschen und Schimpansen doch zu mehr als 98% identisch (King & Wilson, 1975). Gerade deshalb übt die Suche nach den Unterschieden eine gewisse Faszination aus. Die Frage, welche dieser Veränderungen für die Zunahme der kognitiven Fähigkeiten verantwortlich sind, wird letztlich oft als Suche nach einem genomischen Korrelat menschlichen Geistes verstanden – sind sie es doch, die eine kulturelle Entfaltung erst ermöglicht haben (Bahnsen, 2001). Sinn und Erfolgsaussichten dieser Bemühungen seien dahingestellt - es wäre wirklich interessant zu wissen, welche Mutationen uns zu dem machten, was wir sind.

Es ist anzunehmen, dass dieser evolutionäre Sprung mit der Vergrößerung des Gehirns zusammenhängt und den daran beteiligten Genen eine Schlüsselrolle zukommt.

Tatsächlich stehen wir am Ende einer langen Entwicklung: Die Zunahme der relativen Gehirngröße ist ein allgemeiner Trend in der Evolution der Vertebraten (Abb. 1). Die relative Gehirngröße ist das Gehirngewicht korrigiert um einen oder mehrere allometrische Parameter (Körpergröße, Körperoberfläche) und ist ein Maß für die Encephalisierung der jeweiligen Spezies. Innerhalb der Vertebraten nimmt die relative Gehirngröße von niederen Taxa (Amphibien, Fische, Reptilien) zu höher entwickelten (Vögel, Säugetiere) zu. Gleiches gilt innerhalb eines Taxons: Sperlingsvögel haben relativ größere Gehirne als Hühnervögel, Primaten haben relativ größere Gehirne als Insektivoren (Jerison, 1969; Hofman, 1989; Rehkamper & Zilles, 1991). In Primaten bzw. Hominiden hält diese Tendenz an: Menschen haben ein relativ größeres Gehirn als Schimpansen und Rhesusaffen. Neben anthropoiden Primaten gehören Cetaceae zu den am höchsten encephalisierten Gruppen (Marino, 1998). Auch sie haben in der Evolution, parallel zu den an Land lebenden Gruppen, relativ zu ihrer Körpergröße große Gehirne entwickelt.



**Abb. 1. Gehirn-vs.-Körpergewicht-Korrelation verschiedener Taxa und Spezies (logarithmische Darstellung).** Die Lage der Polygone beschreibt die Encephalisierung der jeweiligen Taxa, die Lage der Messpunkte einzelner Spezies (\*) innerhalb der Polygone die Encephalisierung der jeweiligen Spezies. Vergleicht man beispielsweise Säuger mit Reptilien, haben Säugetiere durchweg relativ größere Gehirne als Reptilien gleicher Körpergröße – das Polygon der Säuger liegt über dem der Reptilien. Beim Vergleich innerhalb eines Taxons sind höher encephalisierte Spezies bzw. Gruppen bei maximalen Gehirn-/Körpergewicht-Verhältnissen, d.h. am oberen Rand der entsprechenden Polygone, zu finden: z.B. Krähe vs. Strauß, Mensch vs. Schimpanse bzw. die Lage der Primaten innerhalb der Säuger. Der Grad an Encephalisierung ist die positive Abweichung im relativen Gehirngewicht gegenüber einer (hypothetischen) Spezies innerhalb der Vergleichsgruppe: Bei einem Vergleich innerhalb der Säuger würde man sich auf einen „Referenz-Säugetier“ auf der Verbindungslinie Maus-Elefant beziehen. Mensch und Schimpanse haben beide ein relativ größeres Gehirn als ein typischer Säuger ihrer Körpergröße, wobei die positive Abweichung beim Menschen größer ausfällt. Die Distanz zur Referenzlinie entspricht dem „extra-neuronalen Volumen“ . (Abb. aus Butler & Hodos, 1996, modifiziert).

### Leistungsfähigkeit korreliert mit der Größe

Eine positive Abweichung von der erwarteten relativen Gehirngröße innerhalb einer Vergleichsgruppe (z.B. Säugetiere), z.B. das überschüssige relative Gehirngewicht eines Rhesusaffen gegenüber eines (hypothetischen) Insektivoren gleicher Körpergröße, kann anschaulich als das „extra-neuronale Volumen“ beschrieben werden. In Abb. 1 entspräche dies dem jeweiligen Abstand der Spezies von der Verbindungslinie zwischen Maus und Elefant. Sie spiegelt das Gehirn-Körpergewicht-Verhältnis eines hypothetischen Säugers von durchschnittlicher Encephalisierung wider. Ein Rhesusaffe hat also mehr Gehirn als ein hypothetischer Insektivor seiner Größe - mehr, als er eigentlich benötigt, um seine Körperfunktionen zu kontrollieren und nach Insekten zu suchen. Dieses extra-neuronale Volumen kann allgemein als organisches Korrelat für die größeren integrativen Fähigkeiten eines Gehirns bzw. die höhere Intelligenz einer Spezies diskutiert werden (Jerison, 1973; Jerison, 1985). Dem Rhesusaffen beispielsweise verhelfen die freien Kapazitäten zu komplexerem adaptiven Verhalten, der treibenden Kraft in der Evolution des Primatengehirns (Jolly, 1966; Wilson, 1985). Der Sinn der Größenzunahme ist also in der Steigerung der kognitiven Fähigkeiten zu vermuten.

Die Annahme, dass inter-Spezies-Unterschiede in der Leistung von Gehirnen bzw. Gehirnarealen in erster Linie durch die unterschiedliche relative Größe bedingt sind, ist naheliegend und bedeutet, dass Größe der entscheidende Parameter für die Leistungsfähigkeit eines Gehirns bzw. bestimmter Gehirnareale sein sollte. Man sollte erwarten, dass deshalb die Größe bestimmter funktioneller Areale mit den Leistungsanforderungen der Umwelt korreliert. Tatsächlich entwickeln sich funktionelle Areale in Gehirnen von Spezies mit ähnlichen Verhaltensmustern in ähnlichen Proportionen (de Winter & Oxnard, 2001; Barton & Harvey, 2000). Im Fall der Primaten sind vor

allem Gehirnnareale mit höheren Hirnfunktionen, wie der Neocortex, bevorzugt einem positiven Selektionsdruck ausgesetzt und expandieren überproportional stark – in Menschen gegenüber Insektivoren ca. 40fach - während sich Regionen mit basalen Funktionen kaum verändern (Hofman, 1982; Rehkamper & Zilles, 1991). Innerhalb der Primaten korreliert diese Größenzunahme des Neocortex mit der Fähigkeit zu innovativem Verhalten und sozialer Intelligenz (Reader & Laland, 2002).

Insbesondere in Hominiden ist die Geschwindigkeit der Encephalisierung und der Größenzunahme des Neocortex beachtlich. In den letzten 3 Millionen Jahren hat sich das absolute Gehirnvolumen verdreifacht, und das relative mehr als verdoppelt (McHenry, 1994; Falk *et al.*, 2000). Dabei sind insbesondere Veränderungen in der Organisation des frontalen und temporalen Neocortex, Regionen assoziiert mit höheren integrativen Funktionen, zu erkennen. Man kann also davon ausgehen, dass auch unsere herausragenden kognitiven Fähigkeiten auf die Größenzunahme des Neocortex zurückzuführen sind.

### Größere Gehirne bestehen aus mehr Neuronen

Der entscheidende Unterschied zwischen unterschiedlich großen Gehirnen bzw. Gehirnnarealen verschiedener Spezies ist sicherlich die Neuronenzahl, weder der cytoarchitektonische Aufbau noch die vorhandenen Zelltypen. Insgesamt nimmt die Neuronendichte mit steigender Gehirngröße wegen der relativen Zunahme an weißer Substanz und Größe der Neurone zwar etwas ab (Tower, 1954; Jerison, 1973; Changizi, 2001), dieser Effekt wird aber durch die absolute Zunahme an Neuronen mehr als ausgeglichen.

Es ist also anzunehmen, dass die integrativen bzw. adaptiven Fähigkeiten auf die Neuronenzahl zurückzuführen sind - betrachtet man das Neuron als operative Einheit des Gehirns, scheint dies logisch. Gehirne tetraploider Salamander beispielsweise bestehen bei gleicher Größe nur aus halb so vielen, doppelt so großen Neuronen wie Gehirne diploider Tiere. Infolge dessen lernen tetraploide Tiere deutlich schlechter (Frankhauser *et al.*, 1955). Wir können also eine Erhöhung der Neuronenzahl in erster Näherung als organisches Korrelat evolutionär zunehmender kognitiver Fähigkeiten begreifen. Doch welche Mechanismen kontrollieren die Neuronenzahl, und welche Gene sind daran beteiligt?

## 1.2 Histogenese des ZNS

Der überwiegende Anteil der Neurone des zentralen Nervensystems (ZNS) entsteht während der Embryonalentwicklung und im Fall des Cerebellums in frühen postnatalen Stadien.

Eine Veränderung der Neuronenzahl im Adulten, insbesondere eine Zunahme im Säuger, ist lokal relativ begrenzt und selbst in Arealen aktivster Neurogenese, wie im *Gyrus dentatus*, bezogen auf die gesamte Neuronenzahl zu vernachlässigen. Interessanterweise ist sie von äußeren Stimuli abhängig (Kempermann & Gage, 1999; Seress, 1992) und korreliert auf neurologischer Ebene positiv mit der Lernfähigkeit verschiedener Mauslinien (Kempermann & Gage, 2002). Die Rate neu gebildeter Neurone nimmt allerdings von der Maus (0.04% pro Tag) zum Rhesusaffen (0.004% pro Tag) ab (Kempermann *et al.*, 1997; Kornack & Rakic, 1999). Die adulte Neurogenese ist demnach in evolutionär weiterentwickelten Gehirnen geringer. Dies erscheint paradox: Warum sollten höher entwickelte Gehirne auf eine erhöhte Lernfähigkeit verzichten? Gründe hierfür sind unbekannt (Kornack, 2000).

Die Neuronenzahl wird also während eines begrenzten Zeitraumes in der Embryonalentwicklung festgelegt.

### Neurale Induktion und Neurulation

Neurone des ZNS von Vertebraten werden aus neuroektodermalen Zellen des Neuroepithels der Neuralplatte bzw. des Neuralrohrs gebildet (Abb. 2A). Die Entstehung des ZNS beginnt während der Gastrulation mit der neuralen Induktion des Neuroektoderms und der Bildung der Neuralplatte. Die lateralen Bereiche der Neuralplatte falten sich, nach Einfurchung entlang der Mittellinie und Ausbildung der Neuralrinne, auf, und die Enden der Neuralwülste verschmelzen, ausgehend vom cervicalen Abschnitt der Neuralplatte, zum Neuralrohr. Das Neuralrohr selbst wird anschließend von Oberflächenektoderm umschlossen (Jacobson, 1991).

Die neurale Induktion wird durch die vom dorsalen Mesoderm ausgehende Inhibierung von BMP- (*bone morphogenetic protein*)-Signalen eingeleitet, wodurch permissive Bedingungen für die Umwandlung von Ektoderm zu Neuroektoderm geschaffen werden. BMP-Signale verhindern, dass sich Ektoderm automatisch in Neuroektoderm umwandelt (Wilson & Hemmati-Brivanlou, 1995). Interessanterweise tendieren auch neuroektodermale Zellen dazu, sich in Abwesenheit instruktiver Signale in Neurone umzuwandeln. Es scheint, als müssen proliferierende Vorläuferzellen aktiv davon abgehalten werden, Neurone zu werden, ein Phänomen, auf das in Abschnitt 1.7 wieder eingegangen wird: Dort wird FGF- (*fibroblast growth factor*)-2 als ein Faktor vorgestellt, der diese Umwandlung verhindert.



Es ist offensichtlich, dass die Zahl induzierter neuroektodermaler Zellen die Gehirngröße entscheidend bestimmen kann: Allein die Induktion von mehr Neuroektoderm könnte bei einem weiteren invarianten Ablauf der Embryonalentwicklung zu einer Größenzunahme führen.

### Regionalisierung des Neuralrohres

Entlang der a/p (anterior/posterior) Achse grenzen sich die primären Gehirnregionen Pros-, Mes-, und Rhombencephalon sowie das Rückenmark voneinander ab. Im weiteren Verlauf unterteilt sich das Prosencephalon in Tel- und Diencephalon und das Rhombencephalon in Met- und Myelencephalon. Aus dem Metencephalon geht das spätere Cerebellum hervor. Die Regionalisierung des Neuralrohres in die verschiedenen Gehirnabschnitte wird durch entsprechende Zentren, *organizer* (z.B. *anterior neural ridge*, ANR, *mid-hindbrain boundary*, MHB), und davon ausgehende Morphogensignale kontrolliert. Einhergehend mit der neuralen Induktion wird die Neuralplatte bzw. das Neuralrohr entlang der a/p und d/v (dorsal/ventral) Achse regionalisiert (*patterning*), wodurch innerhalb des Neuroepithels eine regionale Identität vermittelt wird. So werden z.B. die a/p und medio-laterale Arealisierung des Telencephalons durch sekretierte FGF8-Signale der ANR, Wnt3a- und BMP-Signale des Cortex bzw. Shh-Signale der MGE (*medial ganglionic eminence*) gesteuert. Homeobox-Transkriptionsfaktoren wie Otx2, Emx2, Pax6 und Lhx2 vermitteln dabei regionale Identität im Neuroepithel (Monuki & Walsh, 2001; O'Leary & Nakagawa, 2002). Durch einen kombinatorischen regionalen Code verschiedener *patterning*-Gene werden z.B. Vorläuferzellen für die Motor- und Interneuron-*lineage* im Rückenmark spezifiziert (Marquardt & Pfaff, 2001).

*Patterning*-Prozesse regulieren die Größenverhältnisse verschiedener Gehirnregionen untereinander: So wachsen bei Überexpression anteriorer *patterning*-Gene anteriore Regionen zu Lasten posteriorer. Ein Beispiel ist die Wirkung von FGF8 (siehe Abschnitt 1.7). Die Expansion verläuft aber nicht notwendigerweise nur über eine relative Ausdehnung auf Kosten anderer Regionen, sondern kann auch durch einen proliferativen Effekt einiger *patterning*-Gene zu einem realen Wachstum führen, das nicht auf Kosten anderer Region geht (z.B. einige wnt-Gene) (siehe Abschnitt 1.7).

### Histologische Veränderungen im Neuroepithel während der Neurogenese

Initial ist das Neuroektoderm ein cuboidales Epithel mit typischer apikal-basaler Polarität. Die Neuroepithelzellen stehen apikal mit dem Lumen des Neuralrohres und basal mit der Basallamina in Kontakt (Abb. 2A). Sie sind nach derzeitigem Verständnis die direkten Vorläufer der Neurone und als neurale Stammzellen molekular durch die Expression von Nestin charakterisiert (Lendahl *et al.*, 1990). Sie bilden die innerste Zellschicht des Neuralrohres, die Ventrikularzone, die sich im Verlauf der Neurogenese bald klar von den basal entstehenden neuronalen Schichten absetzt und die primäre proliferative Zone im Neuroepithel darstellt.

Die Zellkerne der Neuroepithelzellen durchlaufen synchron mit dem Zellzyklus eine interkinetische Migration (Sauer, 1935) (Abb. 2B): In der G1-Phase wandern die Zellkerne basal, durchlaufen die S-Phase im basalen Drittel des Neuroepithels und wandern in der G2-Phase wieder zur apikalen Oberfläche, wo sich die Zellen teilen. Während der Kernwanderung behalten die Zellen den Kontakt zumindest zur apikalen Oberfläche bei. Neuroepithelzellen teilen sich immer auf der apikalen Seite.

Durch anhaltende Proliferation und die resultierende radiale Ausdehnung nimmt das Neuroepithel zunehmenden pseudostratifizierten Charakter an und verliert noch vor Beginn der Neurogenese seine wesentlichen epithelialen Eigenschaften (angedeutet durch unterbrochene Linien in Abb. 2C): die Polarität des Membrantransportes nimmt ab, und *tight junctions* gehen verloren (Aaku-Saraste *et al.*, 1996; Aaku-Saraste *et al.*, 1997). Die Expression von E-Cadherin wird durch N-Cadherin ersetzt (Hatta & Takeichi, 1986; Hatta *et al.*, 1987). Wahrscheinlich stehen diese Veränderungen auch in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Neurogenese.

Auch Neurone entstehen aus apikalen Mitosen und wandern basal in die neuronalen Schichten - Vorläuferzellen und Neurone bilden verschiedene Zellschichten. Im Neocortex entsteht im weiteren Verlauf der Neurogenese, basal zur Ventrikularzone und apikal zu den neuronalen Schichten, die Subventrikularzone als zweite proliferative Zone im Neuroepithel. Die Neuroepithelzellen wandeln sich zum Ende der Neurogenese in Ependymzellen um, die als eine einzellige Schicht die ventrikuläre Oberfläche im ZNS ausbilden. Von den Zellen der Subventrikularzone wird angenommen, dass sie in der Embryonalentwicklung in erster Linie Vorläufer für Glia sind (Privat & Leblond, 1972; Paterson *et al.*, 1973; Levison & Goldman, 1993), während sie im Adulten Neurone und Glia generieren (Reynolds & Weiss, 1992). Adulte Subventrikularzonenzellen sind wie embryonale Neuroepithelzellen neurale Stammzellen. Die adulte Subventrikularzone ist, verglichen mit der embryonalen, in ihrer Ausdehnung ebenfalls stark reduziert. Beide proliferativen Zonen sind demnach, genau wie ihre Hauptzelltypen Neuroepithelzellen und Subventrikularzonenzellen, größtenteils transiente Strukturen, die entsprechend des Fortschritts der Neurogenese in ihrer Größe stark variieren.

### 1.3 Modelle zur Neurogenese

Proliferation<sup>1</sup>, Neuronenproduktion und die histologischen Veränderungen im Neuroepithel lassen sich qualitativ durch ein gängiges 3-Phasen-Neurogenese-Modell, unterteilt in eine prä-neurogenetische (Phase 1) und zwei neurogenetische Phasen (Phasen 2 und 3), beschreiben (Abb. 2C). Ein solches Modell sollte die beobachteten histologischen Entwicklungen *in vivo* erklären. Kahle (Kahle, 1951) formulierte diese Überlegungen erstmals als *Matrixphasenkonzept*. Der direkte Beweis für die postulierten Zellteilungsmodi (d.h. dass Neurone tatsächlich aus asymmetrischen Teilungen hervorgehen) steht aber noch aus (Abschnitt 1.5).

#### Das 3-Phasen Modell der Neurogenese

In **Phase 1** entstehen durch im *cell fate* symmetrische<sup>2</sup>, proliferierende Teilungen aus einer Neuroepithelzelle zwei neuroepitheliale Tochterzellen, die beide wieder in den Zellzyklus eintreten, d.h. sich beide weiter teilen. In dieser Phase expandiert die Zahl der Vorläuferzellen exponentiell. Man kann sich vorstellen, dass der Wiedereintritt in den Zellzyklus durch apikal lokalisierte Faktoren gesteuert wird. Diese werden durch die hier angedeutete, zellbiologisch symmetrische Teilung an beide Tochterzellen weitergegeben.

Definierten a/p und d/v Gradienten folgend, gehen Neuroepithelzellen von Proliferation zu Neurogenese über (**Phase 2**). Diesen räumlich-zeitlichen Verlauf der Neurogenese werden wir im Folgenden auch als neurogenetischen Gradienten bezeichnen. Auf zellulärer Ebene entspricht dies einem Wechsel, vielleicht durch eine asymmetrische Verteilung intrazellulärer *cell fate determinants* gesteuert, zu im *cell fate* asymmetrisch-differenzierenden Teilungen: Es werden ein Neuron und eine Neuroepithelzelle generiert. Die Zahl an Neuroepithelzellen bleibt konstant, während die an Neuronen linear ansteigt. Die jungen Neurone wandern in basaler Richtung radial aus der

---

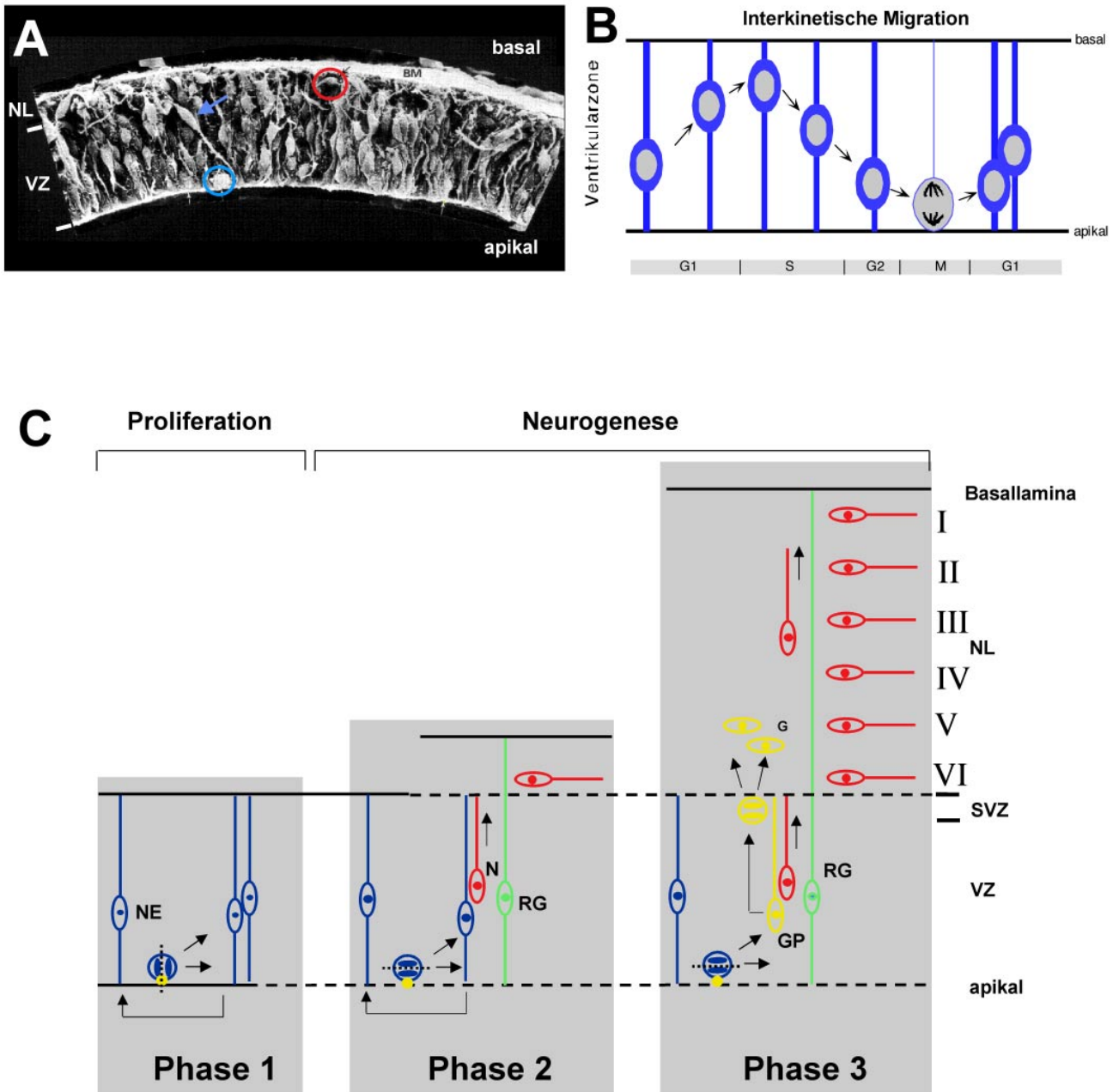
<sup>1</sup> Proliferation bedeutet hier: die Vermehrung der Zellzahl eines Typs. In proliferativen Teilungen sind Mutter- und Tochterzellen gleichen Typs. Proliferation ist also von Zellteilung zu unterscheiden.

<sup>2</sup> Man muss generell zwischen der zellbiologischen Symmetrie und der Symmetrie im *cell fate* unterscheiden. Die zellbiologische Definition bezieht sich auf die Verteilung von polar lokalisierten Molekülen, z.B. intrinsische *cell fate determinants*, eine Definition über die Symmetrie im *cell fate* rein auf die Identität der Tochterzellen (histologischer Zelltyp, nicht molekulare Zusammensetzung, die durchaus zwischen Zellen leicht variieren kann, ohne dass diese ein histologisch verschieden differenzierter Zelltyp sind). Zellbiologische Symmetrie ist unabhängig von der Symmetrie im *cell fate*, kann aber mit letzterer in einem Zusammenhang stehen, sofern es sich um die Verteilung von intrinsischen *cell fate determinants* handelt: Man kann annehmen, dass durch eine asymmetrische Verteilung intrinsischer *cell fate determinants* Zellen unterschiedlichen Schicksals hervorgehen können. Umgekehrt kann eine zellbiologisch symmetrische Teilung Tochterzellen gleichen Typs generieren, wenn diese unterschiedlichen extrinsischen *cell fate determinants* ausgesetzt sind (Abb. 5). In dieser Arbeit bezieht sich, sofern nicht weiter spezifiziert, Symmetrie auf das *cell fate* – andernfalls wird von zellbiologischer Symmetrie gesprochen.

Ventrikularzone aus und bilden apikal zur Basallamina die neuronalen Schichten - im Fall des Neocortex die corticalen Schichten in der typischen *inside out*-Reihenfolge (Schicht I, VI, V, IV, III, II). Diese Wanderung verläuft entlang „radialer Gliazellen“, einer Subpopulation von Neuroepithelzellen (Rakic, 1972). Zeitlich nacheinander entstandene Neurone desselben Areals wandern in gleichen Routen und bilden radiale Säulen ontogenetisch verwandter Zellgruppen, „radiale Einheiten“ - eine Art Minimal-Baustein, aus dem sich der Neocortex zusammensetzt (Rakic, 1988).

Die Neuronenzahl innerhalb einer radialen Einheit unterliegt ontogenetischen Beschränkungen: Während der Neurogenese kann die *founder*-Zelle einer radialen Einheit nur eine bestimmte Anzahl an Zellzyklen durchlaufen, also nur eine begrenzte Anzahl Neurone generieren. Die radiale Ausdehnung einer radialen Einheit und somit auch des Cortex ist deshalb relativ invariant und begrenzt, der Cortex muss über die Erhöhung der Anzahl radialer Einheiten, also tangential über eine Zunahme der Oberfläche und nicht radial in der Dicke expandieren. Tatsächlich nimmt er in der Oberfläche 100fach mehr zu als in der Dicke: Im Vergleich mit Insektivoren hat die Oberfläche des Neocortex von Primaten ca. 1000fach und die Dicke nur ca. 10fach zugenommen (Hofman, 1989). Durch die Zunahme der Oberfläche verändern sich die expandierenden Bereiche in ihrer Geometrie - sie werden stärker gyrifiziert (von Bronin, 1941; Hofman, 1985). Dabei unterliegt die Verknüpfung funktioneller Areale über axonale Verbindungen ebenfalls ontogenetischen bzw. räumlichen Beschränkungen. Folglich ist auch die Größe funktioneller Areale limitiert. Bestehende Areale spalten sich auf und können von neuen Funktionen besetzt werden (Finlay *et al.*, 2001). Letztendlich ist die Zunahme an radialen Einheiten der Schlüssel zur funktionellen Diversifizierung im Neocortex. In erster Näherung wird die Zahl der radialen Teilungen durch die Zahl der in Phase 1 generierten Gründerzellen festgelegt, die Zahl der Neurone innerhalb einer Einheit durch die in Phase 2 durchlaufenen Zellzyklen. Für die Zahl der Einheiten ist also der Übergang von Phase 1 nach Phase 2 entscheidend (siehe hierzu auch Abschnitt 1.4).

Im Gegensatz zu den radial wandernden Pyramidenzellen, entstehen in Säugern alle Interneurone des Cortex in der ventral gelegenen LGE (*lateral ganglionic eminence*) und wandern lateral in die corticalen Schichten ein (Wichterle *et al.*, 2001). Interessanterweise gibt es hier evolutionäre Unterschiede zwischen Mäusen, Rhesusaffen und Menschen: Nur im Menschen werden die Interneurone auch in radialen Einheiten generiert (Letinic *et al.*, 2002).



**Abb. 2. Neurogenese im ZNS.** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Neuroepithels zu Beginn der Neurogenese im Vertebraten. Das Neuroepithel besteht aus zwei Zelltypen: Neuroepithelzellen in Interphase (➤) und Mitose (blau umrandet) in der Ventrikularzone (VZ) und jungen Neuronen (rot umrandet) in den neuronalen Schichten (NL). (B) Interkinetische nukleare Migration: Während des Zellzyklus wandert der Zellkern einer Neuroepithelzelle zwischen apikaler und basaler Seite der Ventrikularzone. (C) Modell zur Entstehung von Neuronen und radialen Einheiten im Cortex. Phase 1: Neuroepithelzellen teilen sich proliferativ in zwei neuroepitheliale Tochterzellen (NE), die beide wieder in den Zellzyklus eintreten. Während der Proliferationsphase verliert das Neuroepithel Polarität und funktionelle *tight junctions* (unterbrochene Linie apikal). Phase 2: Zellen wechseln zu asymmetrisch Teilungen, bei denen sich eine Neuroepithelzelle regeneriert und ein Neuron (N) entsteht, das basal aus der Ventrikularzone entlang radialer Gliazellen (RG) auswandert und die neuronalen Schichten bildet (hier: die corticalen Schichten I-VI). Durch die radiale Ausdehnung der neuronalen Schichten verlieren die Neuroepithelzellen bis auf die Subpopulation radialer Gliazellen den Kontakt zur Basallamina (unterbrochene Linie basal). Phase 3: Neuroepithelzellen teilen sich differenzierend in entweder symmetrisch zwei Neurone oder asymmetrisch ein Neuron und einen Glia-Vorläufer (GP), die beide delaminieren. Die Glia-Vorläuferzellen bilden eine zweite proliferative Schicht: die Subventrikularzone (SVZ), aus der Gliazellen (G) entstehen. Die Neuroepithelzelle und die entstandenen Neurone bilden eine radiale Einheit ontogenetisch verwandter Zellen (grau unterlegt). Der Wechsel im *cell fate* der Tochterzellen beim Übergang von Proliferation zu Neurogenese wird vermutlich durch eine asymmetrische Verteilung polar lokalisierter *cell fate determinants* gesteuert (hier angedeutet durch den gelben Punkt an der apikalen Plasmamembran) (Abschnitt 1.6).

Im weiteren Verlauf (**Phase 3**) teilen sich die Neuroepithelzellen entweder symmetrisch-differenzierend in zwei Neurone bzw. zwei Gliazellen oder asymmetrisch-differenzierend in ein Neuron und eine Gliazelle. In beiden Fällen wird keine Neuroepithelzelle regeneriert. Folglich wird diese Zellpopulation aufgebraucht und je Neuroepithelzelle entstehen zwei post-Neuroepithelzellen. Eine dieser post-Neuroepithelzellen könnte ein Vorläufer von Zellen in der Subventrikularzone sein.

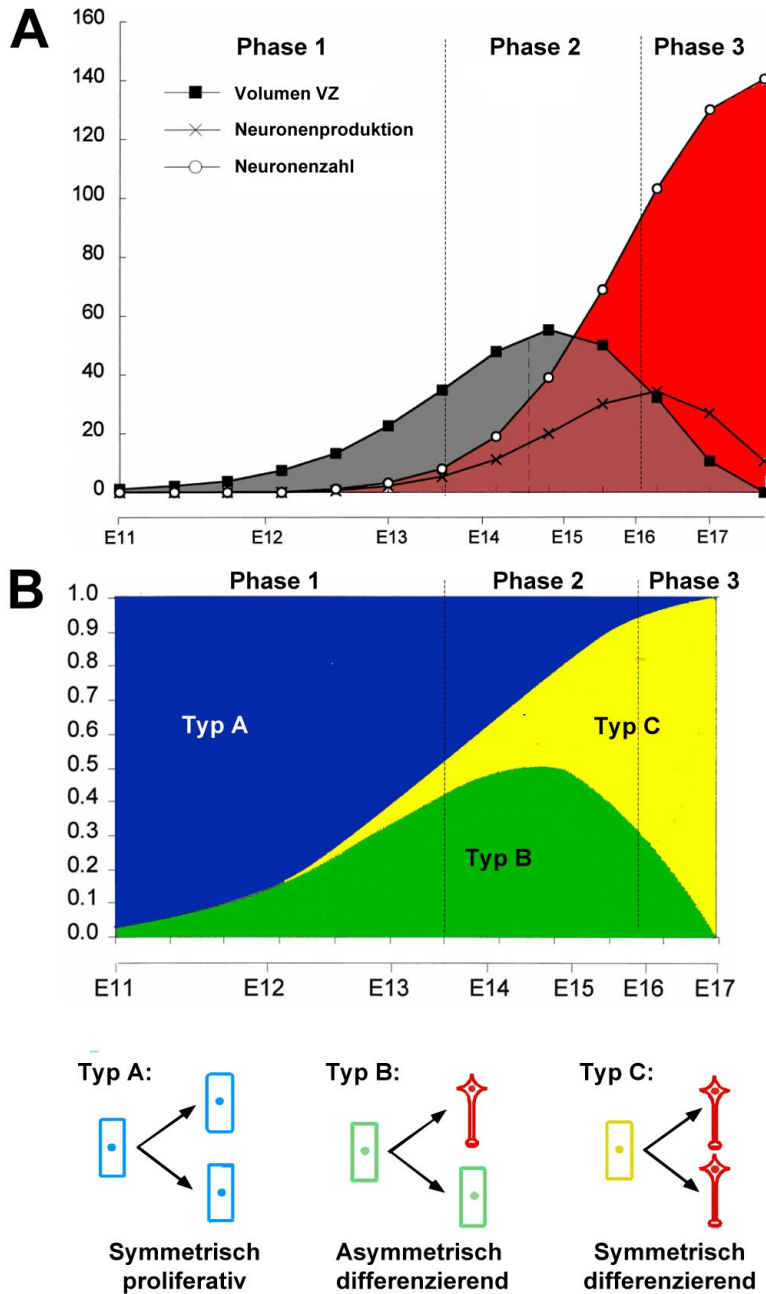
### Quantitative Modelle zur Neurogenese

In Abb. 3A sind Zu- und Abnahme der Neuroepithelzellen (als Volumenveränderungen der Ventrikularzone), die Zunahme an Neuronen und die Neuronenproduktion im Cortex dargestellt. Wie kann das 3-Phasen-Modell (Abb. 2C) erweitert werden, um somit das proliferative Verhalten und die Neuronenproduktion im Neuroepithel (Abb. 3A) auch quantitativ zu beschreiben?

Die beobachteten Veränderungen können quantitativ beschrieben werden, wenn man annimmt, dass die einzelnen Phasen des 3-Phasen-Neurogenese-Modells nicht abrupt, sondern graduell ineinander übergehen (Abb. 3B), d.h. einzelne Zellen sind schon in die nächste Phase übergegangen, andere hingegen teilen sich weiterhin entsprechend der vorherigen. Die verschiedenen Zellteilungsmodi koexistieren, lediglich ihr relativer Anteil ändert sich. Auf Populationsebene konnte dies durch Zellzyklusstudien während des neurogenetischen Intervalls im Neocortex (E11-E17) bestätigt werden (Takahashi *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1996). In diesen Studien wurden durch zeitlich versetzte Markierung von S-Phasen mit  $^3\text{H}$ -dT und BrdU (Bromodesoxyuridin) die proliferierende (P) und differenzierende (Q) Zellpopulation im Neuroepithel bestimmt. Die Ergebnisse implizieren für den Übergang von Proliferation zu Neurogenese auch auf zellulärer Ebene einen Wechsel in der Zellteilungssymmetrie von symmetrischen zu asymmetrischen Zellteilungen, beweisen dies aber aus konzeptionellen Gründen nur auf Zellpopulationsebene.

Es ist zu beachten, dass in diesem Modell eine mögliche Entstehung von Neuronen durch die Subventrikularzone nicht berücksichtigt wird – sie trägt nach der gängigen Vorstellung (Abb. 2C) nicht zur Neuronenproduktion bei (in dieser Arbeit wird gezeigt, dass dies wahrscheinlich eine unzulässige Vereinfachung ist).

Dieses quantitative Neurogenese-Modells ermöglicht es trotzdem, die kritischen und relevanten Parameter zur Kontrolle der Neuronenzahl zu veranschaulichen (Abschnitt 1.4).



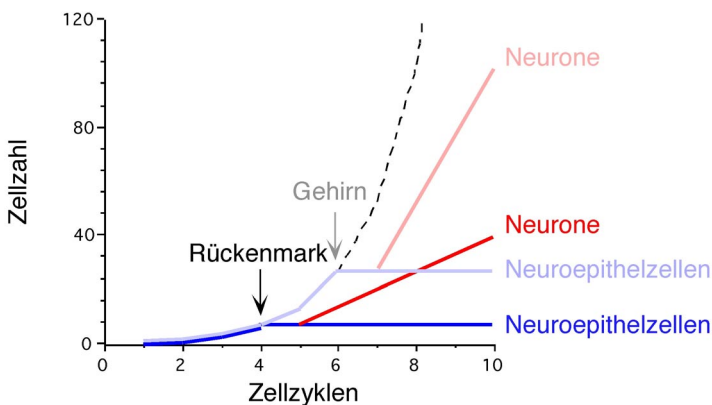
**Abb. 3. Proliferation und Neuronenproduktion im Cortex der Maus während der Neurogenese (E11-E17).** (A) Volumen der Ventrikularzone, Neuronenproduktion und Neuronenzahl in den neuronalen Schichten im zeitlichen Verlauf. Das Volumen der VZ entspricht in erster Näherung der Zahl der Neuroepithelzellen. Die Kurven wurden aus der Bestimmung der sich teilenden und der quieszenten Zellpopulation im Neuroepithel berechnet (Takahashi *et al.*, 1996) und beschreiben gut die histologischen Veränderungen in den drei Phasen der Neurogenese. (B) Die beobachteten histologischen Veränderungen (A) in Phase 1-3 können durch einen Wechsel in den Zellteilungsmodi (Typ A, B, C Teilungen; siehe auch Abb. 2) erklärt werden, die graduell ineinander übergehen: Die Zellen wechseln nicht alle gleichzeitig, sondern innerhalb eines bestimmten Zeitraumes in den nächsten Modus, d.h. die verschiedenen Zellteilungsmodi koexistieren, lediglich ihr relativer Anteil ändert sich. Ob die Teilungen auf Zellebene tatsächlich so ablaufen, ist noch unklar: In Typ B könnte das Neuron nicht direkt, sondern über eine transiente Zelle entstehen, die sich dann symmetrisch in zwei Neurone teilt. Die Neurone-generierende Zellteilung selbst wäre dann symmetrisch. Dies ist von Bedeutung, da für die Neuronenzahl der Übergang zur in der *lineage* ersten, nicht mehr symmetrisch proliferativen Teilung relevant ist (siehe hierzu Abschnitt 1.4). (Abb. modifiziert nach Takahashi *et al.*, 1996)

### 1.4 Der Übergang von Proliferation zu Differenzierung kontrolliert die Neuronenzahl

Wie bereits angesprochen, wird die überwiegende Zahl der Neurone in der Neurogenese während der Embryonalentwicklung gebildet. Im Verlauf der Histogenese sterben zwar bis zu 50% der gebildeten Neurone, dieser Wert variiert aber nicht allzu stark zwischen Spezies mit Gehirnen von unterschiedlicher Neuronenzahl (Strom & Williams, 1998). Seitens der Sterberate können wir also annehmen, dass sie im Speziesvergleich relativ konstant ist. Differenzen in der Gehirngröße bzw. Neuronenzahl von mehreren Größenordnungen lassen sich ohnehin nicht durch unterschiedliche Apoptoseraten erklären. Die Zahl an Neuronen hängt also in erster Linie von der Zahl der produzierten Zellen ab.

Konzept der verzögerten Differenzierung

Betrachten wir die Zahl der pro Zellzyklus produzierten Neurone entsprechend der verschiedenen Zellteilungsmodi (Abschnitt 1.3, Abb. 3B): in Modus 1 (Proliferation) expandiert die Vorläuferpopulation exponentiell, in Modus 2 (Differenzierung durch asymmetrische Zellteilungen) steigt die Zahl der Neurone linear an, die Zahl der Vorläuferzellen bleibt konstant, in Modus 3 (Differenzierung durch symmetrische Teilungen) verdoppelt sich die Neuronenproduktion. Insgesamt wird jede jemals entstandene Vorläuferzelle zumindest in ein Neuron umgesetzt. Die Zahl der von einer Neuroepithelzelle geborenen Neurone wird also durch eine exponentielle (Modus 1) und eine lineare Komponente (Modus 2) bestimmt. Möchte man in einer gegebenen Zeit bzw. in einer möglichst geringen Anzahl Zellzyklen ein Maximum an Neuronen generieren, so muss die Differenzierung, d.h. das Verlassen der exponentiellen Komponente, möglichst spät einsetzen. Man kann sich das anschaulich an einem hypothetischen Vergleich zwischen Rückenmark und Gehirn verdeutlichen (Abb. 4). Smart führte diese Überlegung als *delayed differentiation concept* ein (Smart, 1972a). Dies gilt sowohl für die Entstehung von Neuronen über asymmetrische und dann symmetrische (Verlauf über Modus 1-2-3, Abb. 3B) als auch über rein symmetrische Zellteilungen (direktes Umschalten von Modus 1 nach 3, Abb. 3B). Die größte Ausbeute würde durch einen gleichzeitigen Übergang aller Neuroepithelzellen von proliferativen zu rein symmetrisch-differenzierenden Teilungen erreicht. In Wirklichkeit kann eine solche schlagartige Umwandlung aber nicht funktionieren. Die Histogenese über radiale Einheiten verlangt vielmehr einen graduellen Übergang, wobei erst radiale Einheiten etabliert werden (Phase 1), die sukzessive Neurone generieren (Phase 2 bzw. 3) (Abb. 2C).



**Abb. 4. Das Konzept der verzögerten Differenzierung.** Von einer Neuroepithelzelle generierte Neuroepithelzellen und Neurone während Teilungsmodus 1 und 2 der Neurogenese. Je später eine Neuroepithelzelle den proliferativen Teilungsmodus verlässt (der exponentielle Verlauf ist mit der unterbrochenen Linie angedeutet), desto mehr Neurone kann sie in einer gegebenen Anzahl Zellzyklen generieren. Beispielsweise resultiert eine Verzögerung um zwei Zellzyklen in einer Verdreifachung der Neuronenzahl (hier: Rückenmark vs. Gehirn). Diese Überlegung gilt für verschieden große Strukturen im ZNS einer, bzw. verschieden große Gehirne unterschiedlicher, Spezies: Strukturen mit mehr Neuronen differenzieren später. Es ist zu beachten, dass *in vivo* natürlich nicht alle Zellen zum gleichen Zeitpunkt umschalten (siehe Abb. 3B). Auf Populationsebene würde der Verlauf Abb. 3A entsprechen.

Es wurde angesprochen, dass Gehirne hauptsächlich über eine Vermehrung der radialen Einheiten expandieren, ein Phänomen, das durch das *delayed differentiation concept* leicht erklärt werden



kann. Stark vereinfacht wird in der proliferativen Phase die Zahl der *founder*-Zellen, d.h. die Zahl der radialen Einheiten und in der linearen Phase die Zahl der Neurone einer Einheit festgelegt. Eine Maximierung der Ausbeute in einem Entwicklungsintervall (d.h. in einer gegebenen Anzahl Zellzyklen) wird insbesondere über die Verlängerung der proliferativen Phase erreicht, was zwangsläufig mehr radiale Einheiten produziert und letztlich die Gehirnoberfläche vergrößert und nicht zu einer radialen Expansion führt (diese wäre durch eine Verlängerung der Phase 2 zu erklären).

Im wesentlichen determinieren demnach drei Faktoren die Zahl der Neurone einer Gehirnregion: (i) die initiale Zahl der ihr zugewiesenen induzierten Vorläuferzellen (Startpopulation an Neuroepithelzellen, festgelegt durch neurale Induktion und *patterning*) (Abschnitt 1.2) (ii) das *timing* des Umschaltens (die Zahl der Zellzyklen im proliferativen Modus) - d.h. der Übergang zur in der *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ ersten, nicht mehr proliferierenden Zellteilung und (iii) die Dauer der Neurogeneseperiode (ist nur bei der tatsächlichen Existenz eines asymmetrischen Zellteilungsmodus relevant: Zahl der Zellzyklen im asymmetrischen Modus).

Je länger die Vorläuferzellen proliferieren, je später die Neurogenese beginnt, desto größer wird die Zahl der Neurone. Dies sollte sowohl im intra- als auch inter-Speziesvergleich gelten: innerhalb einer Spezies sollte die Neurogenese in großen Hirnregionen später, in Spezies höherer Encephalisierung in der Embryonalentwicklung relativ später einsetzen. Ähnliche Tendenzen sollte man für den *peak* und die Dauer der Neurogenese erwarten. Tatsächlich wurden diese Trends experimentell bestätigt. Smart konnte zeigen, dass innerhalb einer Spezies größere Gehirnteile relativ später mit der Neurogenese beginnen: Der neurogenetische Gradient korreliert entlang der a/p und d/v Achse mit der Zahl der generierten Neurone (Smart, 1972a; Smart, 1972b; Smart, 1973; Smart, 1976).

### Evolutionäre Aspekte

Vergleicht man die Neuronenentstehung im Neocortex der evolutionär divergenten Spezies Maus und Rhesusaffe, verhält es sich tendenziell ähnlich. Die Neurogenese beginnt in der Maus bei E11, im Rhesusaffen bei E43, der *peak* liegt bei E16 bzw. E90, die Dauer der ganzen Neurogeneseperiode liegt bei 6 bzw. 55 Tagen, die gesamte Embryonalentwicklung dauert 19 bzw. 165 Tage (Caviness *et al.*, 1995; Finlay *et al.*, 1998; Clancy *et al.*, 2001; Kornack & Rakic, 1998). Korrigiert man diese Zeitspannen für die Zellzykluslänge von 8-18 h in der Maus und 23-54 h im Rhesusaffen, entstehen die ersten Neurone im Telencephalon (*subplate*, Layer I) im Rhesusaffen ca. 7 Zellzyklen später als in der Maus: Die Zeitdifferenz zum Beginn der Neurogenese im Rhombencephalon beträgt einen Tag in der Maus und 10 Tage im Rhesusaffen, das entspricht ca. 3 bzw. 10 Zellzyklen. Die Zahlen beschreiben also die Verzögerung Telencephalon - Rhombencephalon. Die ganze neurogenetische Periode dauert in der Maus 11 und im Affen 28 Zyklen. Während dieser Zeit entstehen im Affen ca. 400mal mehr Neurone als in der Maus. Im Menschen treten die ersten Neurone im Telencephalon

ca. weitere 3-4 Zellzyklen später auf, die Neurogenesephase dauert insgesamt 20 Tage länger. Insgesamt entstehen 16 mal mehr Neurone als im Rhesusaffen (aus, bzw. Abschätzung nach Daten von, Rakic, 1995; Caviness *et al.*, 1995; Kornack & Rakic, 1998 und Clancy *et al.*, 2001). Eine leichte Verzögerung der Differenzierung, insbesondere in spät differenzierenden Regionen, hat also auf Grund der exponentiellen Wachstumskurven der Vorläuferzellen ein überproportionales Wachstum zur Folge.

Die evolutionäre Expansion scheint einem entwicklungsbiologischen Muster zu folgen. Ein umfassender Vergleich zwischen unterschiedlichen Spezies zeigt, dass die Größenverhältnisse verschiedener Gehirnareale in einem nicht-linearen Verhältnis zueinander stehen: (i) ontogenetisch spät entstehende Regionen (Neocortex) sind sehr viel größer als ontogenetisch früher entstehende (Thalamus) und (ii) spät entstehende Regionen expandieren in der Evolution überproportional (Finlay & Darlington, 1995) - ein Befund der sich durch eine Verzögerung des neurogenetischen Gradienten erklären lässt. Es scheint also ein Zusammenhang zwischen Gehirnentwicklung und -evolution zu bestehen. Wahrscheinlich schränken ontogenetische Zwänge mögliche evolutionäre Veränderungen ein (Finlay & Darlington, 1995) und führen zu einer stereotypen Expansion alleine durch eine verzögerte Differenzierung (siehe *delayed differentiation concept*), die letztlich in der überproportionalen Expansion des Neocortex resultiert. Die Autoren vermuten solche Zwänge im invarianten Ablauf der Neurogenese. So korrelieren die Gradienten der Neurogenese im Vorderhirn gut mit der von Rubenstein *et al.*, 1994 als *prosomeric model* vorgeschlagenen (evolutionär relativ konservierten) Regionalisierung im Prosencephalon (Finlay *et al.*, 1998). Es scheint also eine Art Bauplan für Säugergerirne zu geben, der nach einem festgelegten Schema die Hirnentwicklung diktiert und einzig über das relative *timing* der Neurogenese Variationen zulässt. Es wird angenommen, dass auf Grund solcher heterochroner Effekte relativ wenige Mutationen zu schnellen evolutionären Veränderungen führen können (Vrba, 1998).

Es wird sogar argumentiert, dass auf Grund dieser allometrischen Beziehungen und eines starken Selektionsdrucks auf die Körpergröße insbesondere die Größenzunahme des Cortex nur ein evolutionäres Nebenprodukt einer zunehmenden Körpergröße ist (Finlay *et al.*, 2001). Dieser Argumentation ins Extrem folgend, hätten wir erst überschüssige mentale Kapazitäten erlangt und diese dann mit Aufgaben beschäftigt, wir hätten sozusagen aus Langeweile mit dem Denken begonnen - ein auch in der Literatur umstrittener Zusammenhang.

Neben diesem stereotypen Grundmuster gibt es offensichtlich auch einen gewissen Anteil modularer Evolution (Barton & Harvey, 2000). Dabei wachsen bestimmte Areale zu Lasten anderer, während die Wachstumsrate, über das gesamte Gehirn betrachtet, unverändert bleibt. Ein Beispiel ist die Rückbildung des olfaktorischen Systems (Paleocortex und *Bulbus olfactorius*) zugunsten des Neocortex in der Evolution der Anthropoiden (Passingham, 1985). Am ehesten ist dies auf eine Variation in der Verteilung zwischen den Hirnarealen, durch z.B. unterschiedliches *patterning*, bzw. erhöhte Proliferation bestimmter Areale zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, sind *patterning* und

Proliferationsprozesse über Morphogengradienten (z.B. Wnt-Signaling) eng gekoppelt (Rubenstein *et al.*, 1994; Megason & McMahon, 2002).

### 1.5 Symmetrische und asymmetrische Zellteilungen im Neuroepithel

Es wurde argumentiert, dass der Übergang zur ersten, nicht mehr proliferierenden Zellteilung in der *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ der Schlüsselschritt in der Neurogenese ist. Allerdings wurden die vom Neurogenese-Modell vorgeschlagene *lineage* und Zellteilungsmodi noch nicht direkt nachgewiesen. Nur in Kenntnis der Zelltypen, aus denen bzw. über die, ausgehend von proliferierenden Neuroepithelzellen, Neurone entstehen, und der Symmetrie (im *cell fate*) der dabei ablaufenden Zellteilungen, kann man aber die Mechanismen bzw. Gene, die das Umschalten zwischen den Teilungen steuern, untersuchen.

Im Folgenden soll deshalb (i) kurz auf die experimentellen Evidenzen für die Existenz im *cell fate* symmetrischer und asymmetrischer Zellteilungen im Neuroepithel eingegangen, und (ii) diese in die neuronale *lineage* eingeordnet werden.

#### Symmetrische und asymmetrische Teilungen neuronaler Vorläuferzellen

Wie in jedem wachsenden Zellverband der initial aus einem Zelltyp besteht und in zwei Zelltypen differenziert, müssen auch im Neuroepithel symmetrische und asymmetrische Zellteilungen abgelaufen sein.

Tatsächlich gibt es sowohl indirekte als auch direkte Hinweise auf symmetrische und asymmetrische Zellteilungen im Neuroepithel von Vertebraten. Das Verteilungsmuster retroviral markierter Zellklone im Neocortex in der Maus (Luskin *et al.*, 1988; Cai *et al.*, 1997), Ratte (Reid *et al.*, 1995; Mione *et al.*, 1997) und im Rhesusaffen (Kornack & Rakic, 1995) kann in dieser Richtung interpretiert werden. In diesen Studien wurden einzelne Neuroepithelzellen in der Ventrikularzone *in vivo* markiert und die Verteilung der Tochterzellen in den corticalen Schichten zu späteren Zeitpunkten analysiert. Horizontal verteilte Klone suggerieren symmetrische Teilungen einer Vorläuferzelle, deren Nachkommen sich auf benachbarte Einheiten bzw. innerhalb einer radialen Einheit verteilten (Abb. 3B, Modus 1, bzw. 3), radial verteilte Klone wurden wahrscheinlich sequenziell von einer sich wiederholt asymmetrisch teilenden Vorläuferzelle generiert (Abb. 3B, Modus 2). Das Auftreten einzelner TIS21-positiver Zellen impliziert ebenfalls asymmetrische Zellteilungen im Neuroepithel der Maus (Iacopetti *et al.*, 1999): Diese Einzelzellen müssen aus asymmetrischen Zellteilungen hervorgegangen sein – in diesem Fall aus einer asymmetrischen TIS21-negativen Zellteilung, nach der die TIS21-Expression nur in einer Tochterzelle initiiert wird. Im Frettchen konnten Chenn und McConnell (Chenn & McConnell, 1995) die Existenz symmetrischer und asymmetrischer Teilungen durch videomikroskopische Analysen Farbstoff-

markierter Neuroepithelzellen in Explantatkulturen auf Grund der unterschiedlichen Migration und Morphologie indirekt ableiten: Die basale Tochterzelle asymmetrischer Teilungen wandert deutlich schneller als ihre apikale Schwester, und beide Zellen unterscheiden sich morphologisch. *In vitro* konnten sowohl symmetrische als auch asymmetrische Teilungen neuroepithelialer Zellen der Maus in videomikroskopischen Analysen direkt gezeigt werden (Qian *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 2000). Zudem konnten Noctor und Mitarbeiter (Noctor *et al.*, 2001) und Miyata und Mitarbeiter (Miyata *et al.*, 2001) *in vivo* die asymmetrische Teilung radialer Gliazellen in späteren Stadien der Neurogenese der Ratte mittels Videomikroskopie in Explantatkulturen beobachten. In diesen Studien wurden Neuroepithelzellen durch retrovirale Infektion GFP-markiert und deren Tochterzellen nach Zeitraffermikroskopie immunhistochemisch charakterisiert. Die Definition radialer Glia wurde größtenteils anhand morphologischer Kriterien vorgenommen. Geht man davon aus, dass radiale Gliazellen identisch mit, oder zumindest eine Subpopulation von, Neuroepithelzellen sind (Huttner & Brand, 1997; Noctor *et al.*, 2002), sprechen auch diese Studien für die Existenz asymmetrischer Zellteilungen von Neuroepithelzellen.

#### Symmetrie der Neurone-generierenden Teilung und neuronale *lineage*

Die Einordnung dieser im *cell fate* symmetrischen und asymmetrischen Teilungen in die neuronale *lineage* ist noch weitgehend offen. Es ist derzeit immer noch unklar, ob Neurone selbst aus symmetrischen oder asymmetrischen Zellteilungen entstehen und ob vor der Neurone-generierenden Teilung schon eine asymmetrische Teilung stattgefunden hat. In diesem Fall wäre der entscheidende Schritt (Verlassen der Proliferation) bereits eine Zellteilung früher zu suchen.

In der bereits erwähnten Studie zeigen Chenn und McConnell (Chenn & McConnell, 1995) in Bezug auf Migrationsverhalten und Morphologie offensichtlich asymmetrische Zellteilungen – nicht aber, dass es sich hierbei zwingend um Neurone-generierende Zellteilungen handelt. Die Autoren klassifizieren die basale, schnell wandernde Zelle einzig anhand ihrer Morphologie im Fluoreszenzbild als Neuron, zeigen aber nicht, dass diese tatsächlich das Neuroepithel verlässt und zum Neuron differenziert. Letztendlich interpretieren sie die Daten als Existenzbeweis einer asymmetrischen Neurone-generierenden Teilung. Andererseits zeigen die *lineage*-Studien von Qian und Mitarbeitern (Qian *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 2000) an isolierten Neuroepithelzellen der Maus eindeutig, dass der überwiegende Anteil Neurone-generierender Zellteilungen symmetrisch verläuft: Eine Neuroepithelzelle generiert zwei Neurone, auch zu Beginn der Neurogenese. Ein offensichtlicher Widerspruch, der auch durch die angesprochenen Studien zum Teilungsverhalten radialer Glia nicht gelöst wird: Noctor und Mitarbeiter (Noctor *et al.*, 2001) und Miyata und Mitarbeiter (Miyata *et al.*, 2001) konnten die Entstehung von Neuronen aus asymmetrischen Teilungen radialer Gliazellen beobachten. Allerdings bieten die Autoren selbst auch alternative Interpretationen ihrer Ergebnisse an, nach der sie die Entstehung von Neuronen aus symmetrischen Teilungen nicht ausschließen (siehe Abschnitt 4.2).

Es ist also nicht mit Sicherheit geklärt, ob Neurone durch eine asymmetrische Teilung generiert werden, genauso wie die *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ noch weitgehend unbekannt ist. Beides sind aber Voraussetzungen, um eine Analyse von Steuerungsmechanismen mit *cell fate decisions* und Proliferationskontrolle in Verbindung zu bringen.

## 1.6 Steuerung des Übergangs von proliferierenden zu differenzierenden Zellteilungen

Welche Mechanismen könnten den Übergang einzelner Zellen innerhalb des Neuroepithels zu Neurone-generierenden Teilungen steuern? Es ist offensichtlich, dass *cell fate decisions* im Zusammenspiel mit regionalen und subregionalen bzw. zellulären Mechanismen kontrolliert werden. Neurale Induktion, *patterning*, der Verlust epithelialer Eigenschaften im Vorfeld der Neurogenese (Aaku-Saraste *et al.*, 1996) und der Verlust des Kontaktes von Neuroepithelzellen zur Basallamina im Verlauf der Neurogenese (Koch, 2000) wirken eher in regionalen Dimensionen und vermitteln die Kompetenz aller Zellen, innerhalb dieser Region ein bestimmtes *cell fate* anzunehmen. Laterale Inhibition, die bestimmte Zellen innerhalb eines Zellverbandes auswählt, sowie eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung von *cell fate determinants* bei zellbiologisch asymmetrischen Zellteilungen generieren dann letztendlich Tochterzellen mit unterschiedlichen *cell fate* innerhalb einer Region, wirken also in subregionalen bzw. zellulären Dimensionen. Offensichtlich integrieren Zellen Signale aus allen Ebenen. Die Mechanismen sind in ihrer Wirkung deshalb nicht getrennt voneinander zu betrachten.

### Neurale bHLH-Gene und Notch-Delta-Signalweg

Bei der Spezifizierung von neuronalen Vorläuferzellen bzw. Neuronen spielen proneurale bHLH- (*basic helix loop helix*)-Gene, neurale Differenzierungsgene und ihre Interaktion mit dem, über Notch-Delta vermittelten, Prozess der lateralen Inhibition eine zentrale Rolle. Durch laterale Inhibition nehmen innerhalb eines Zellverbandes zufällig bestimmte Zellen ein anderes *cell fate* an. Diese Mechanismen sind in der Evolution von *Drosophila* bis zum Säuger nicht unverändert, aber doch erstaunlich konserviert geblieben. Homologe der *achaete-scute* bzw. *atonal* Gruppe in *Drosophila*, Mash- bzw. Math- und Neurogenin-Gene sind auch in Vertebraten im sich entwickelnden ZNS exprimiert (Lee, 1997). Mash-Gene, Math1 und Neurogenin-Gene (Ngn1/2) regulieren in Vertebraten die Generation von Neuronen aus neuroepithelialen Vorläuferzellen. Mash1-*knock out*-Mäuse haben Neurogenese-Defekte im Telencephalon (Casarosa *et al.*, 1999), Ngn1/2-doppel-*knock outs* im Rückenmark (Fode *et al.*, 2000). Der Neurogenese-Defekt ist wahrscheinlich auf einen Verlust korrekt spezifizierter neuronaler Vorläuferzellen zurückzuführen, die dadurch verfrüht in Gliazellen differenzieren (Bertrand *et al.*, 2002). Die regional unterschiedliche Expression verschiedener Mitglieder dieser Gruppen vermittelt dabei eine räumliche Identität innerhalb der Vorläuferpopulation und spezifiziert ein entsprechendes *cell fate* in

Richtung verschiedener neuronaler Subtypen. Ein Beispiel ist die Interaktion von Mash1, Math1 und Ngn1 bei der Spezifizierung von Neuronen im Telencephalon der Maus (Fode *et al.*, 2000). NeuroD, NeuroM und Math2 sind eine andere Gruppe neuronaler bHLH-Proteine, die zeitlich verzögert nach den proneuralen Genen in postmitotischen Neuronen exprimiert werden. Die ektopische Expression dieser Gruppe neuronaler Differenzierungsgene kann in *Xenopus* Ektoderm (Lee *et al.*, 1995) oder P19 Zelllinien (Farah *et al.*, 2000) in Neurone transformieren.

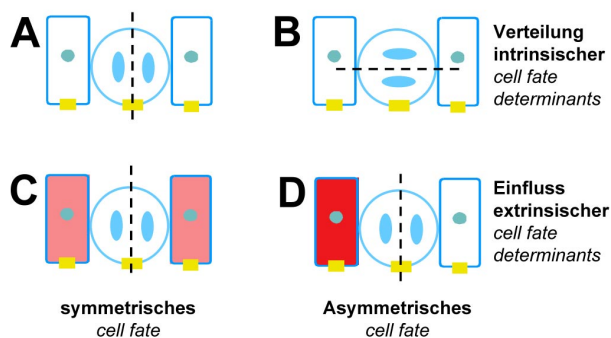
Die Expression der bHLH-Gene selbst wird in Koordination mit dem Notch-Delta-Signalweg gesteuert und bildet das zentrale Modul des lateralen Inhibitionsprozesses. Am Ende des durch Delta induzierten Notch-Signalwegs steht die, im Komplex mit RBP-Jk, dem Vertebraten-Homolog des *Drosophila m.* SuH (*Suppressor of Hairless*), vermittelte Expression von HES-Proteinen, Vertebraten-Homologe des *Enhancer of Split* Komplexes in *Drosophila*. Diese Klasse von bHLH-Proteinen wirkt als negativer Regulator proneuraler bHLH-Gene in *Drosophila* und Vertebraten (Fisher & Caudy, 1998). bHLH-Proteine induzieren ihrerseits die Expression von Delta. Im Resultat bildet sich zwischen zwei Zellen eine positive Regelschleife, die anfänglich kleine Unterschiede in der Expression von Komponenten dieses Netzwerkes (z.B. Delta, Notch, proneurale bHLH) amplifiziert, bis die Unterschiede in der Expression für ein unterschiedliches *cell fate* (z.B. neuronal vs. epithelial in *Drosophila*) ausreichen.

Es ist nicht überraschend, dass sowohl Notch als auch HES eine zentrale Rolle in der Neurogenese im Vertebraten spielen: Eine Störung des Notch-Delta Signalwegs resultiert in der Regel in einer gestörten Proliferation bzw. Differenzierung der Neuroepithelzellen (Abschnitt 1.7). Trotzdem ist es unwahrscheinlich, dass die Gradienten der Neurogenese über diese Gene gesteuert werden. Laterale Inhibition verhindert vielmehr ein (verfrühtes) gleichzeitiges Umschalten aller Zellen von Proliferation zu Neurogenese, das durch die Expression von proneuralen Genen induziert wird. In der Regel leitet eine Inaktivierung eine zu frühe neuronale Differenzierung ein, so dass letztendlich weniger Neurone geboren werden. Vermutlich ist ein intakter Notch-Delta-Signalweg notwendig, um eine Balance zwischen Proliferation und Differenzierung aufrechtzuerhalten (siehe Abschnitt 1.7). Man könnte sich vorstellen, dass durch laterale Inhibition das sukzessive langsame Umschalten einzelner Zellen in die nächste Neurogenese-Phase gewährleistet wird. Ohne laterale Inhibition wechseln alle Zellen schlagartig. In diesem Zusammenhang ist die Expression des Notch-Liganden Delta in Neuronen interessant (Appel *et al.*, 2001): Unterdrückt man dessen Expression im Zebrafisch, schalten alle Vorläufer verfrüht zu Neurogenese um.

#### Asymmetrische Verteilung von *cell fate determinants*

Unterschiedliche Tochterzellen können nach einer Zellteilung auf Grund einer asymmetrischen Verteilung von intrinsischen *cell fate determinants* hervorgehen (Abb. 5). Aspekte dieser in *Drosophila* sehr gut untersuchten Mechanismen sind auch in Vertebraten wiederzufinden. Zentrales Motiv hierbei ist: Polar lokalisierte *cell fate determinants* werden auf Grund einer zellbiologisch

asymmetrischen Zellteilung nicht gleichmäßig an die Tochterzellen weitergeben. Typischerweise sind solche Faktoren an prominenten zellulären Strukturen lokalisiert, wie z.B. der apikalen Plasmamembran oder den *tight junctions*. Ein klassisches Beispiel für neurale asymmetrische Zellteilungen ist die Teilung von Neuroblasten in *Drosophila m.*. Im *Drosophila m.* ZNS beginnt die Neurogenese mit der Delaminierung von Neuroblasten aus dem Neuroektoderm. Die delaminierten Neuroblasten teilen sich dann asymmetrisch in eine GMC (*ganglion mother cell*) und einen Neuroblasten. Während der Neuroblast sich selbst regeneriert, teilt sich die GMC symmetrisch in zwei Neurone. Der delaminierte Neuroblast ist zwar nicht mehr selbst Bestandteil des Epithels, behält aber teilweise seine Polarität. Dies wird kurz vor der Cytokinese sich teilender Zellen deutlich: ein Komplex aus den Proteinen Par-6, aPKC (*atypical protein kinase C*), Bazooka, Inscuteable, und Pins (*partner of inscuteable*) ist im apikalen Cortex lokalisiert, Miranda, Prospero-mRNA und -Protein, Stauf, Numb und Pon (*partner of numb*) basal. Die Zelle wird sich rechtwinklig zur apiko-basalen Achse teilen, begleitet von einer vertikalen Orientierung der Mitosespindel. Folglich wird die GMC Numb und Pon erhalten, die durch Inhibierung des Notch-Signalweges deren weitere Differenzierung in Neurone ermöglichen. Es wurde gezeigt, dass in diesem Prozess Zellpolarität, korrekte Spindelorientierung und somit die asymmetrische Teilung maßgeblich durch diesen Komplex bestimmt wird – der Komplex verbindet gewissermaßen die Spindelorientierung mit der Polarität des Epithels (Wodarz *et al.*, 1999; Schober *et al.*, 1999; Petronczki & Knoblich, 2001). Fehlen Komponenten wie Bazooka oder Inscuteable, wird der Komplex nicht korrekt lokalisiert, die Spindel orientiert sich zufällig, und eine asymmetrische Verteilung von *cell fate determinants* wie Numb wird nicht mehr erreicht.



**Abb. 5. Symmetrie von Zellteilungen und Verteilung intrinsischer und extrinsischer *cell fate determinants*.** (A & B) Das *cell fate* kann durch unterschiedliche Verteilung intrinsischer *cell fate determinants* (z.B. apikal lokalisierte Proteinkomplexe) bestimmt werden. Hierbei ist die Orientierung der Zellteilungsebene zu den intrinsischen Faktoren entscheidend. Die zellbiologische Definition der Symmetrie der Zellteilung bezieht sich auf die Verteilung polar lokalisierter *cell fate determinants*. Sie kann zu der Symmetrie der Zellteilung, definiert über das *cell fate* der Tochterzellen, in Relation gesetzt werden: Eine zellbiologisch asymmetrische Teilung ist im *cell fate* asymmetrisch (Fall B). (C & D) Zellbiologisch symmetrische Teilungen können aber im *cell fate* asymmetrisch sein, falls die Orientierung der Zellteilungsebene relativ zu extrinsischen *cell fate determinants* (z.B. eines Morphogen-Gradienten) asymmetrisch ist (Fall D).

Obwohl die Komponenten (z.B. Notch, Numb, Bazooka/Par-3) dieser Maschinerie auch in der Neurogenese im Vertebraten exprimiert sind (Chenn & McConnell, 1995; Wakamatsu *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1996; Manabe *et al.*, 2002), ist dort der Mechanismus einer asymmetrischen Zellteilung im Neuroepithel und ihr Zusammenhang mit der Neurogenese weniger verstanden. In Vertebraten ist die Reorientierung der Spindel von proliferierenden zu Neurone-generierenden Teilungen weit

weniger stringent an die Geometrie des Epithels gekoppelt. Obwohl von Chenn und McConnell (Chenn & McConnell, 1995) postuliert, ist es unwahrscheinlich, dass in Vertebraten die Orientierung der Teilungsebene relativ zur ventrikulären Oberfläche das entscheidende Kriterium einer proliferierenden bzw. Neurone-generierenden Teilung ist: Die Zahl horizontaler Teilungen korreliert nicht mit der Neurogenese und ist zu gering, um die Entstehung aller Neurone durch eine solche Teilung erklären zu können (Langmann *et al.*, 1966; Smart, 1972a; Landrieu & Goffinet, 1979). Vermutlich muss im Vertebraten ein anderer Bezugspunkt gewählt werden. Auf Grund der fehlenden Korrelation zwischen Neurogenese und horizontalen Zellteilungen wurde von Huttner und Brand (Huttner & Brand, 1997) ein anderes Modell vorgeschlagen: Entscheidend ist die relative Orientierung zur apikalen Plasmamembran (und den dort lokalisierten *cell fate determinants*) und nicht zur ventrikulären Oberfläche. Eine asymmetrische Zellteilung ist schon durch eine ungleichmäßige Verteilung apikaler Membrankomponenten erreicht und nicht notwendigerweise durch einen radikalen Wechsel in der Zellteilungsebene. Die apikale Membran kann als Prominin-positive, Cadherin-negative Lücke in der Plasmamembran identifiziert werden (Röper, 2000). Prominin ist ein Marker für die apikale Membran (Weigmann *et al.*, 1997), Cadherin für die basolaterale Plasmamembran. Die Teilungsebene kann durch die Position der Chromosomen in der Anaphase bestimmt werden, wenn bereits keine Rotation der Spindel mehr auftreten kann und somit die Teilungsebene festgelegt ist. Unter Anwendung dieser Kriterien konnte Röper (Röper, 2000) die relative Orientierung der Zellteilungsebene zur apikalen Membran ableiten und zeigen, dass in der Maus sowohl Teilungen mit symmetrischer als auch Teilungen mit asymmetrischer Verteilung der apikalen Membran koexistieren. Dabei können vertikale Teilungen (90-60° zur ventrikulären Oberfläche) die apikale Membran asymmetrisch verteilen (siehe beispielsweise Abb. 26) und oblique Teilungen (60-30°) symmetrisch (Röper, 2000), d.h. die zellbiologische Symmetrie wird durch die relative Orientierung der Zellteilungsebene zur apikalen Membran besser beschrieben als durch die relative Orientierung zur ventrikulären Oberfläche. Ein einleuchtender Grund ist der in *Drosophila* wesentlich größere Anteil der apikalen Membran an der gesamten Plasmamembran. Um diesen asymmetrisch zu verteilen, muss die Teilungsebene notwendigerweise stärker rotieren, beim Vertebraten ist dies nicht nötig. So würden auch im Vertebraten letzten Endes eine ungleichmäßige Verteilung von Membran-assoziierten *cell fate determinants* das *cell fate* kontrollieren. Tatsächlich gibt es Hinweise auf eine asymmetrische Verteilung von Notch und Numb (Chenn & McConnell, 1995; Wakamatsu *et al.*, 1999) und eine Assoziation von Bazooka/Par-3 mit den *adherens junctions* im Vertebraten (Manabe *et al.*, 2002). Für das Vertebraten-Homolog von *minibrain*, eine Proteinkinase involviert in der Neurogenese in *Drosophila* und Vertebraten (Abschnitt 1.7), konnte ebenfalls eine asymmetrische Verteilung in Neuroepithelzellen gezeigt werden (Hammerle *et al.*, 2002). Es ist anzunehmen, dass Neurogenese im Vertebraten, ähnlich wie im *Drosophila* Neuroektoderm, durch die ungleiche Verteilung Membran-assoziiierter *cell fate determinants* kontrolliert wird. Eine Aspekt, der auch in dieser Arbeit näher untersucht werden wird (Abschnitt 1.9).



Zeit

Ein weiterer Steuerungsmechanismus von *cell fate decisions* könnte der Faktor Zeit sein. Es wird angenommen, dass die Proliferation im Neuroepithel über die Länge der G1 Phase am G1/S-Kontrollpunkt durch Interaktion mit CyclinD/cdk4/5, Rb, E2F und CyclinE/cdk2 reguliert wird (Caviness *et al.*, 1999). Interessanterweise nimmt die Länge des Zellzyklus während der Neurogenese der Maus von ca. 8 auf 16 h zu (Tuckett & Morriss-Kay, 1985; Takahashi *et al.*, 1993). Die Zunahme der Zellzykluslänge ist hier ausschließlich durch eine Verlängerung der G1-Phase bedingt (Takahashi *et al.*, 1995; Miyama *et al.*, 1997). Diese Daten zeigen eine Korrelation auf Populationsebene, jedoch noch nicht zwingend einen kausalen Zusammenhang zwischen Zellzykluslänge und Neurogenese auf zellulärer Ebene, d.h. es konnte noch nicht geklärt werden, ob sich differenzierende Zellen langsamer teilen als ihre proliferierenden Nachbarn. Handelte es sich bei der Zellzyklusverlangsamung tatsächlich um einen aktiven Prozess, der auf zellulärer Ebene den Übergang von Proliferation zu Neurogenese steuert, würde man dies erwarten.

Ein Vermutung ist, dass mit verlängerter Zellzyklusdauer die zugrunde liegenden biochemischen Reaktionen länger ablaufen. Es entsteht mehr Produkt pro Zellzyklus, was ein entsprechendes Entscheidungsprogramm einleiten könnte. Solche Signale bzw. biochemischen Prozesse könnten schon vor Differenzierungsvorgängen ablaufen, würden aber durch einen zu schnellen Zyklus einfach „überlesen“. Erst bei einer Verlängerung des Zellzyklus, könnten die Produkte einen Schwellenwert erreichen, der für die Differenzierung notwendig ist. Dies gilt für die Wirkung asymmetrisch verteilter Determinanten und für symmetrische Teilungen, in denen der Zellzyklus in beiden Tochterzellen langsamer wird. Das Resultat wäre das gleiche. Durch eine Verlangsamung würde die Differenzierung eingeleitet: Es sollten eine bzw. zwei differenzierte Zellen entstehen. Tatsächlich führt alleine die Verlängerung der G1-Phase proliferierender Neuroepithelzellen der Maus zu einer verfrühten Neurogenese - es besteht also ein Kausalzusammenhang zwischen der beobachteten Zunahme der Zellzyklusdauer und Differenzierung im Neuroepithel (Calegari *et al.*, in Vorbereitung). Man kann sich vorstellen, dass die Verlängerung des Zellzyklus als „Verstärker“ für Signale wirkt, die durch laterale Inhibition und/oder asymmetrische Verteilung von *cell fate determinants* vermittelt werden.

Die Neuronenzahl eines Areals wird über die initiale Anzahl induzierter Vorläuferzellen (kontrolliert durch neurale Induktion bzw. *patterning*) sowie die Zahl der proliferativen und asymmetrischen Zellteilungen der Vorläuferzellen (Steuerung z.B. durch laterale Inhibition, asymmetrische Verteilung von *cell fate determinants*, Zeit) determiniert. Die verschiedenen Prozesse sind nicht getrennt voneinander zu betrachten, sondern miteinander verzahnt. Die Zelle integriert dabei Signale, vermittelt über extrinsische und intrinsische *cell fate determinants*, und geht, wahrscheinlich auf Grund eines ausbleibenden Proliferationssignals, zu Neurone-generierenden Teilungen über. Bis heute ist dieses Signal unbekannt, es ist aber anzunehmen, dass es auf die ein oder andere Weise von

den vorgestellten Regulationsmechanismen generiert wird bzw. mit diesen interagiert. Strategien zur Identifikation werden im weiteren Verlauf der Arbeit vorgestellt (Abschnitt 1.9 & 4.7).

## 1.7 Hinweise auf Mechanismen und Gene: Kandidatengene verändern die Neuronenzahl

In den vorherigen Abschnitten wurden Mechanismen besprochen, die möglicherweise die Neuronenzahl kontrollieren könnten. In der folgenden Übersicht werden einige Gene bzw. Faktoren vorgestellt, die über diese oder noch nicht erwähnte Mechanismen einen Einfluss auf die Neuronenzahl haben (Tab. 1). Sie haben gemeinsam, dass sie Proliferation entweder global oder in bestimmten Regionen fördern und/oder die Differenzierung hinauszögern. Dies kann über eine Beschleunigung des Zellzyklus (erhöhte Proliferationsrate) oder ein Hinauszögern der differenzierenden Teilungen erfolgen. Eine erhöhte Proliferationsrate führt zu mehr Zellzyklen von Neuroepithelzellen absolut in, oder relativ zur, übrigen Embryonalentwicklung. Ein Hinauszögern der Differenzierung würde über ein späteres Verlassen der proliferativen Phase mehr Neurone hervorbringen, ohne extra Zellzyklen.

### Wachstumsfaktoren und Proliferationskontrollgene

Eine Gruppe von Genen, die einen Einfluss auf die Neuronenzahl haben, sind Gene, die in Körper- oder Organgrößenregulation involviert sind, und die generelle Wachstumssignale bzw. Proliferationskinetiken steuern, wie z.B. Komponenten des IGF-Signalwegs. Der IR (*insulin receptor*) und IGFR (*insulin-like growth factor receptor*) sind positive Regulatoren von Zellgröße und Proliferation (Liu *et al.*, 1993) und stehen mit positiver Regulation (adulter) Neurogenese in Zusammenhang (O'Kusky *et al.*, 2000). PTEN, ein Repressor des IGFR-Signalwegs wirkt als negativer Zellzyklusregulator. PTEN-*knock out*-Mäuse haben vergrößerte Gehirne, was ebenfalls auf eine überhöhte Proliferation von neuronalen Stammzellen zurückzuführen ist (Groszer *et al.*, 2001). Das Genprodukt der, bei einem *screen* auf Phänotypen in der Gehirnentwicklung entdeckten flat-top-Mutation, agiert ebenfalls als Inhibitor der IGFR-Signalkaskade. Die Mutanten haben Proliferationsdefizite im Telencephalon und ein generell verlangsamtes Wachstum infolge einer geringeren Zellteilungsrate (Hentges *et al.*, 1999). Als betroffenes Gen konnte FRAP/mTOR, eine Serin/Threonin-Kinase, identifiziert werden. Diese Kinase vermittelt Mitogen-Signale, ihre Inaktivierung führt zu einer Arretierung in der G1-Phase (Hentges *et al.*, 2001).

FGF2 ist das klassische Mitogen für neuronale Stammzellen: *In vitro* verhindert FGF2 deren Differenzierung und erhält ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Kilpatrick, 1993; Ghosh & Greenberg, 1995). *In vivo* erhöht die Injektion von FGF2 Neuronendichte und Größe des Neocortex, der *knock out* verringert die Neuronenzahl um 50% (Raballo *et al.*, 2000), wobei sich die Zahl der Vorläuferzellen zu Beginn der Neurogenese auf 50% reduziert. Durch kompensatorische Mechanismen kann dieser Verlust teilweise ausgeglichen werden. Man sollte eigentlich erwarten,

dass die Reduktion stärker ausfallen würde, da eine Amplifikation des Effektes eintreten sollte - ein Defizit an *founder*-Zellen sollte zu einem nicht linearen Verlust an Neuronen führen.

EGF scheint ebenfalls die Proliferation von Neuroepithelzellen zu steigern. Die exogene Zugabe *in vitro* wirkt positiv (Vescovi *et al.*, 1993), der *knock out* negativ auf deren Proliferation (Threadgill *et al.*, 1995).

p27 ist wohl der Prototyp unter den Zellzyklusregulatoren und involviert in die allgemeine Proliferationskontrolle. p27 reguliert über den G1/S-Kontrollpunkt die Proliferation generell (d.h. im ganzen Embryo), die von Neuroepithelzellen (Mitsubishi *et al.*, 2001) und letztlich die Neuronenzahl (Delalle *et al.*, 1999). p27 scheint im Neuroepithel als intrinsischer Timer die Differenzierung zu steuern: Durch zunehmende Akkumulation wird nach einer gewissen Zeit der Zellzyklus gestoppt, und die Zellen differenzieren zum Neuron (auf den Zusammenhang von Zellzyklusdauer und Differenzierung wurde in Abschnitt 1.6 hingewiesen). Tatsächlich führt eine Überexpression von p27 *in vitro* zu neuronaler Differenzierung, zumindest in der Retina (Durand *et al.*, 1998), der *knock out* zu einer Überproliferation. p27-*knock out*-Tiere bestehen aus 30% mehr Zellen und haben auch 30% mehr Neurone als der Wildtyp (Nakayama *et al.*, 1996).

Kürzlich konnte ein Gen identifiziert werden, das, assoziiert mit primärer Microcephalie beim Menschen, ebenfalls in der Zellzyklusregulation von (corticalen) Neuroepithelzellen involviert sein könnte. Mutationen in diesem Gen korrelieren mit einer globalen Reduktion des corticalen Volumens auf ca. ein Drittel. Die disproportionale Verkleinerung des Neocortex geht ohne große Veränderung in Gyrfizierung, corticaler Architektur und ohne neurologische Symptome einher (Mochida & Walsh, 2001). Das Genprodukt, Microcephalin, ist während der Neurogenese im Neuroepithel exprimiert. Das einzige funktionelle Motiv ist eine BRCT-(*breast cancer translocated*)-Domäne. Diese Domäne ist in Proteinen zu finden, die den Zellzyklus kontrollieren (Huyton *et al.*, 2000), was Spekulationen über eine Rolle von Microcephalin bei der Kontrolle von Proliferation im Neuroepithel zulässt (Jackson *et al.*, 2002). Über die molekulare Evolution dieses Gens ist noch nichts bekannt. Neben dem Microcephalin-Locus wurden fünf weitere Loci identifiziert, die ebenfalls mit primärer Microcephalie in Verbindung stehen (Roberts *et al.*, 1999; Moynihan *et al.*, 2000; Pattison *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2002).

### Patterning-Gene

Beispiele für Musterbildungsprozesse im Telencephalon sind die Wechselwirkungen von FGF8, Pax6 und Emx2-abhängigem *patterning*. FGF8 und Pax6 sind spezifisch im anterioren Telencephalon exprimiert. Eine Überexpression von FGF8 führt zu einer Expansion rostro-lateraler relativ zu caudo-medialer Areale, ein Funktionsverlust von FGF8 bzw. Pax6 hat den gegenteiligen Effekt (Fukuchi-Shimogori & Grove, 2001; Monuki & Walsh, 2001).

Pax6 und Emx2 regulieren ebenfalls das Proliferationsverhalten von Neuroepithelzellen. In Pax6-Mutanten ist der Zellzyklus verlangsamt, und der Anteil horizontaler Zellteilungen nimmt zu (Estivill-Torres *et al.*, 2002). Die Überexpression von Emx2 *in vitro* induziert zellbiologisch symmetrische Zellteilungen (sofern definiert als vertikal zur Ventrikeloberfläche orientierte Teilungen), der *knock out* verringert ihren Anteil im Neuroepithel (Heins *et al.*, 2001).

Im *knock out* von BF-1, ein durch FGF8-induziertes Gen, endet eine vorzeitige Differenzierung mit einer deutlichen letalen Reduktion der cerebralen Hemisphären (Xuan *et al.*, 1995). Dieser Effekt von BF-1 wird über p27 vermittelt (Hardcastle & Papalopulu, 2000).

Mitglieder der Wnt-Genfamilie sind ebenfalls in *patterning* und Proliferationskontrolle involviert. Wnt-3a und Wnt-1 haben einen deutlichen proliferativen Effekt auf Neuroepithelzellen: Die Überexpression von Wnt-3a und Wnt-1 erhöht den *labeling index* von Neuroepithelzellen und verzögert die Differenzierung wahrscheinlich über eine Steigerung der CyclinD1-Expression (ein gegenteiliger Effekt wie der von TIS21, siehe Abschnitt 1.8) (Megason & McMahon, 2002).  $\beta$ -Catenin, eine Komponente *downstream* im Wnt-1-Signalweg, wirkt ebenfalls verzögernd auf die Differenzierung und verlängert die Proliferationsphase im Neuroepithel. Die Überexpression einer dominant-aktiven Form führt so zu einer dramatischen Vergrößerung der Oberfläche des Neocortex. Infolge dessen wird auf anatomischer Ebene der ursprünglich lissencephalische Neocortex der Maus in einen gyrencephalischen transformiert (Chenn & Walsh, 2002). Ein gyrencephalischer Neocortex tritt normalerweise erst bei sehr viel höher encephalisierten Spezies auf, was Spekulationen über mögliche evolutionäre Implikationen zulässt.

### Laterale Inhibition

Der Notch-Delta Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Proliferationskontrolle im Neuroepithel (Abschnitt 1.6). Notch-1-, RBP-Jk- (de la Pompa *et al.*, 1997) und HES1/5-*knock out* (Ishibashi *et al.*, 1995) zeigen eine verfrühte Neurogenese, Überexpression von Notch-3 führt zu einer deutlichen Überproliferation mit Aufwerfungen des Neuroepithels, ähnlich im Fall von  $\beta$ -Catenin (Lardelli *et al.*, 1996). Die Überexpression von neuronalen bHLH-Genen wie Hes1 und Hes5 resultiert ebenfalls in einer Expansion der neuronalen Stammzellpopulation (Ishibashi *et al.*, 1994; Solecki *et al.*, 2001; Ohtsuka *et al.*, 2001).

Ein *knock out* von Numb, ein ebenfalls im Neuroepithel exprimierter direkter Notch-Repressor, resultiert in einem inversen Phänotyp: Hier findet eine verfrühte Neurogenese bei reduzierter Proliferation der Vorläuferzellen statt (Zhong *et al.*, 2000). Noch drastischer wird dieser Effekt im Doppel-*knock out* für Numb und dessen Homolog Numblike (Petersen *et al.*, 2002).

Auffällig ist, dass sowohl Notch- als auch Numb-/Numblike-*knock out* beide eine verfrühte Neurogenese zeigen – ein noch nicht zufriedenstellend geklärtes Phänomen. Eine mögliche Erklärung wurde in Abschnitt 1.6 angesprochen: Jede Störung (sofern vollständig, wie sie nur im

Numb-/Notch-*knock out* erreicht wird, also nicht nur Überexpression einiger Komponenten) lateraler Inhibition stört die Koexistenz von Proliferation und Differenzierung im Neuroepithel (keine koexistierenden Phasen 1 und 2) ohne jedoch die (Gradienten der) Neurogenese selbst zu steuern. In diesem Kontext sind Notch- und Numb-*knock out* nicht *knock out* von Agonisten und Inhibitor sondern *knock out* des Gleichen: nämlich lateraler Inhibition.

### Asymmetrische Zellteilung

Eine mittlerweile gut untersuchte Mutation mit corticalem Phänotyp ist das LIS1. Das LIS1-Gen wurde bei einer genetischen Charakterisierung von Kindern mit Mueller-Dieker-Syndrom identifiziert (Reiner *et al.*, 1993). Betroffene Individuen weisen eine reduzierte Gyrfizierung der corticalen Hemisphären auf. Das LIS1-Protein interagiert direkt mit Dynein, Dynactin und NudE/F. Dieser Komplex reguliert indirekt die Dynamik des Mikrotubuli-Netzwerks und dessen Interaktion mit  $\gamma$ -Tubulin (Feng *et al.*, 2000). Es ist also an Zellteilungs- und Migrationsprozessen beteiligt, was das Proliferationsdefizit und die gestörte neuronale Migration in LIS1-*knock out*-Mäusen und den corticalen Phänotyp im Menschen erklärt (Hirotsume *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2000; Faulkner *et al.*, 2000).

Eine andere Mutation mit primär corticalem Phänotyp ist *minibrain*. In *Drosophila* führt die *minibrain*-Mutation zu einer reduzierten Proliferation der Vorläuferzellen und zu drastisch verkleinerten zentralen Hemisphären (Tejedor *et al.*, 1995). Im Menschen ist das *minibrain*-Gen auf Chromosom 21 lokalisiert und wurde als Suszeptibilitätslocus für das Down-Syndrom diskutiert (Song *et al.*, 1996). Eine balancierte Überexpression in der Maus induziert den neurologischen Phänotyp der Trisomie 16 in der Maus (Smith & Rubin, 1997; Smith *et al.*, 1997). (Trisomie 16 entspricht der Trisomie 21 im Menschen - das distale Chromosom 16 ist syntetisch mit Chromosom 21). Falls *minibrain* selbst das Schlüsselgen für den neurologischen Phänotyp von Trisomie 21 ist, könnte dieser auf eine verminderte Proliferation der Neuroepithelzellen und damit verringerte Neuronenzahl zurückzuführen sein: In der Maus konnte gezeigt werden, dass Trisomie 16 die Neurogenese verzögert und die Zahl der Vorläuferzellen um 26% verringert, was letztlich die Neuronenzahl reduziert (Haydar *et al.*, 2000). Im Neuroepithel korreliert die Expression von *minibrain*-mRNA und -Protein mit dem Beginn der Neurogenese (Hammerle *et al.*, 2002). Dies impliziert eine Beteiligung beim Umschalten von Proliferation zu Neurogenese und passt gut zu dem beobachteten Trisomie 21-Phänotyp. *minibrain*-mRNA und -Protein (eine Serin/Threonin-Kinase) sind in mitotischen Zellen asymmetrisch verteilt (Hammerle *et al.*, 2002). Das ist insofern interessant, da auch für TIS21, dem bis dato besten Marker für diesen Umschaltprozess, eine asymmetrische Verteilung in der Mitose *in vitro* beobachtet wurde (Lilla Farkas, persönliche Mitteilung).

In dieser Übersicht wurde deutlich, dass alle besprochenen Prozesse auch tatsächlich an der Kontrolle der Neuronenzahl beteiligt sind. Zudem fällt am Beispiel der *patterning*-Gene auf, dass

Gene oft Funktionen in mehreren dieser Prozesse haben (z.B. *patterning*, Proliferationskontrolle und Symmetrie der Zellteilung). Beides zeigt eindrucksvoll, dass die Neuronenzahl durch das Zusammenspiel der verschiedenen Kontrollmechanismen und verschiedener Gene gesteuert wird. Von keinem der besprochenen Gene ist bekannt, ob es in einem der Kriterien - Expression, Proteinaktivität, subzelluläre Lokalisation - auf zellulärer Ebene dem Umschalten von Proliferation zu Neurogenese entspricht - Hinweis darauf, dass viele *upstream* des eigentlichen Schlüsselschritts Proliferation – Neurogenese wirken bzw. diesen nicht spezifisch sondern nur zusammen mit anderen Genen kontrollieren. Allerdings gibt es Indizien, die dafür sprechen, dass zumindest einige Gene in ihrer Expression diesen Kriterien entsprechen: TIS21 (*TPA-induced sequence 21*) ist der Prototyp eines solchen Gens (Abschnitt 1.8) und ein Marker für Neurone-generierende Neuroepithelzellen. Es ist unwahrscheinlich, dass ein solcher Marker bzw. Gen bei der Steuerung des Umschaltens keine Funktion hat. Allerdings ist auch nicht zu erwarten, dass ein Gen diesen Prozess alleine kontrolliert.

**Tab. 1. Verschiedene Gene beeinflussen die Proliferation und Differenzierung im Neuroepithel.**

Klasse	Typ/Signalweg	Gen	Spezies	Manipulation	ZNS Effekt	Literatur	
Wachstums-/ Proliferations- kontrolle	Insulin- Signalweg	IGFR-1	Maus	<i>knock out</i>	Hypoplasie	Liu <i>et al.</i> , 1993	
		IGF-1	Maus	<i>knock out</i>	Hypoplasie		
		PTEN	Maus	<i>knock out</i>	erhöhte Proliferation	O'Kusky <i>et al.</i> , 2000	
		FRAP/mTOR	Maus	<i>loss of function</i> -Allel	reduzierte Proliferation	Groszer <i>et al.</i> , 2001	
	Wachstums- faktoren	Wachstums- faktoren	FGF2	Maus	<i>knock out</i>	reduzierte Proliferation	Raballo <i>et al.</i> , 2000
			EGFR	Maus	<i>knock out</i>	erhöhte Proliferation	Vaccarino <i>et al.</i> , 1999
			EGF	Maus	exogene Zugabe <i>in vitro</i>	reduzierte Proliferation	Threadgill <i>et al.</i> , 1995
	Zellzyklus- regulatoren	Zellzyklus- regulatoren	p27	Maus	<i>knock out</i>	erhöhte Proliferation	Nakayama <i>et al.</i> , 1996
				Maus	Überexpression <i>in vivo</i>	reduzierte Proliferation Differenzierung	Levine <i>et al.</i> , 2000 Mitsuhashi <i>et al.</i> , 2001
			Microcephalin	Mensch	<i>loss of function</i> -Allel	Hypoplasie des Cortex	Jackson <i>et al.</i> , 2002
Patterning	Wachstums- faktoren	FGF8	Maus	Inhibierung	Reduktion des anterioren Telencephalons	Fukuchi-Shimogori & Grove, 2001	
				Überexpression <i>in vivo</i>	Expansion des Anterioren Telencephalons		
	Homeobox- Transkriptions- faktoren	Pax6	Maus	<i>knock out</i>	Reduktion des anterioren Telencephalons verlangsamter Zellzyklus verringertes Anteil symmetrischer Teilungen	Bishop <i>et al.</i> , 2000 Estivill-Torres <i>et al.</i> , 2002	
					Emx2	Maus	<i>knock out</i>
	winged-helix- Transkriptions- faktoren	BF-1	Maus	<i>knock out</i>	reduzierte Proliferation	Xuan <i>et al.</i> , 1995	
	Wnt-Signalweg	Wnt-1 Wnt-3a	Maus	Überexpression <i>in vivo</i>	erhöhte Proliferation	Megason & McMahon, 2002	
					β-Catenin	Maus	Überexpression <i>in vivo</i>
Laterale Inhibition	Notch-Delta- Signalweg	Notch-3	Maus	Überexpression <i>in vivo</i>	verzögerte Differenzierung	Lardelli <i>et al.</i> , 1996	
		Numb Numbllike	Maus	<i>knock out</i>	reduzierte Proliferation	Petersen <i>et al.</i> , 2002	
	Notch- Effektoren	Hes1 Hes5	Maus	<i>knock out</i> Überexpression <i>in vivo</i>	verfrühte Differenzierung verzögerte Differenzierung	Ohtsuka <i>et al.</i> , 2001	
Asymmetrische Zellteilung	Spindel- orientierung	LIS1	Maus	<i>knock out</i>	reduzierte Proliferation gestörte Zellwanderung	Faulkner <i>et al.</i> , 2000	
			Mensch	<i>loss of function</i> -Allel	reduzierte Gyrfizierung Hypoplasie des Cortex	Reiner <i>et al.</i> , 1993	
	asymmetrische Zellteilung/ asymmetrisch verteilte <i>cell fate</i> <i>determinants</i>	minibrain	Drosophila	<i>loss of function</i> -Allel	Reduziertes Cerebrum	Tejedor <i>et al.</i> , 1995	
			Maus	<i>knock out</i>	Haploinsuffizienz induziert ZNS-Hypoplasie bei erhöhter Neuronendichte	Fotaki <i>et al.</i> , 2002	
			Mensch	Trisomie 16 Trisomie 21	verringerte Neuronenzahl verringerte Neuronenzahl	Smith <i>et al.</i> , 1997 Song <i>et al.</i> , 1996	

## 1.8 TIS21 - ein Marker für Neurone-generierende Zellteilungen

Um den Übergang von Proliferation zu Neurogenese mit dem in Abschnitt 1.9 beschriebenen Ansatz untersuchen zu können, ist es notwendig, proliferierende und Neurone-generierende Neuroepithelzellen zu unterscheiden – man muss Beobachtungen immer in die *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ einordnen können. Beide Zellpopulationen koexistieren zeitlich und räumlich und sind morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Dazu sind molekulare Marker erforderlich. Ein solcher Marker sollte definitionsgemäß in einem der Kriterien - Expression, Proteinaktivität, subzelluläre Verteilung - dem Gradienten der Neurogenese entsprechen.

Wie erwähnt, ist TIS21 bislang der einzige solche Marker. Die Identifikation von TIS21 als Marker für Neurone-generierende Neuroepithelzellen ermöglicht es, spezifisch diejenigen Neuroepithelzellen zu erkennen, die von Proliferation zu Differenzierung übergehen (Iacopetti *et al.*, 1999). Die Autoren konnten zeigen, dass die TIS21-mRNA im Neuroepithel spezifisch in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen exprimiert ist. Dieser Befund ist auf zwei zentrale Beobachtungen gestützt: (i) die TIS21-mRNA geht dem Gradienten der Neurogenese exakt einen Zellzyklus voraus (Iacopetti *et al.*, 1994) und (ii) während Neuroepithelzellen und Neurone positiv für TIS21-Protein sind, ist die mRNA nur in Neuroepithelzellen zu finden. Die Neurone müssen das Protein also geerbt haben. Das impliziert eine Expression der TIS21-mRNA zeitlich vor der Neurone-generierenden Mitose und (mit (i)) die spezifische und exklusive Expression in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen. Unter Verwendung molekularer Marker konnte gezeigt werden, dass die TIS21-mRNA im Neuroepithel transient ausschließlich in der G1-Phase Neurone-generierender Zellteilungen exprimiert wird. Während die mRNA beim Übergang in die S-Phase degradiert wird, bleibt das Protein über die ganze Zellteilung hinweg stabil und wird auf das bzw. die Neurone weitergegeben (Iacopetti *et al.*, 1999) (Abb. 6A).

### Funktion

TIS21 (PC3, BTG2) wurde ursprünglich als NGF-(*nerve growth factor*)- bzw. Phorbolster-induziertes *immediate early gene* in PC12- bzw. NIH3T3-Zellen kloniert (Bradbury *et al.*, 1991; Fletcher *et al.*, 1991). Rouault und Mitarbeiter (Rouault *et al.*, 1992) konnten BTG1(*B-cell translocation gene 1*) als homologes Gen im Menschen identifizieren und einer neuen Gruppe antiproliferativer Gene zuordnen, die zusammen mit den Tob-Genen (Matsuda *et al.*, 1996) eine evolutionär konservierte Genfamilie von mindestens sechs homologen Genen bilden (Abb. 6C). Charakteristisch für diese Genfamilie sind in der BTG- und Tob-Gruppe konservierten Sequenzmotive Box A und Box B und für die BTG-Unterfamilie die konservierten C-Termini B (Abb. 6B & 38). Interessanterweise kommen Gene der Tob-Gruppe von *C. elegans* bis Mensch vor, während BTG-Gene auf Vertebraten beschränkt sind. Es finden sich keine orthologen Gene in Hefe



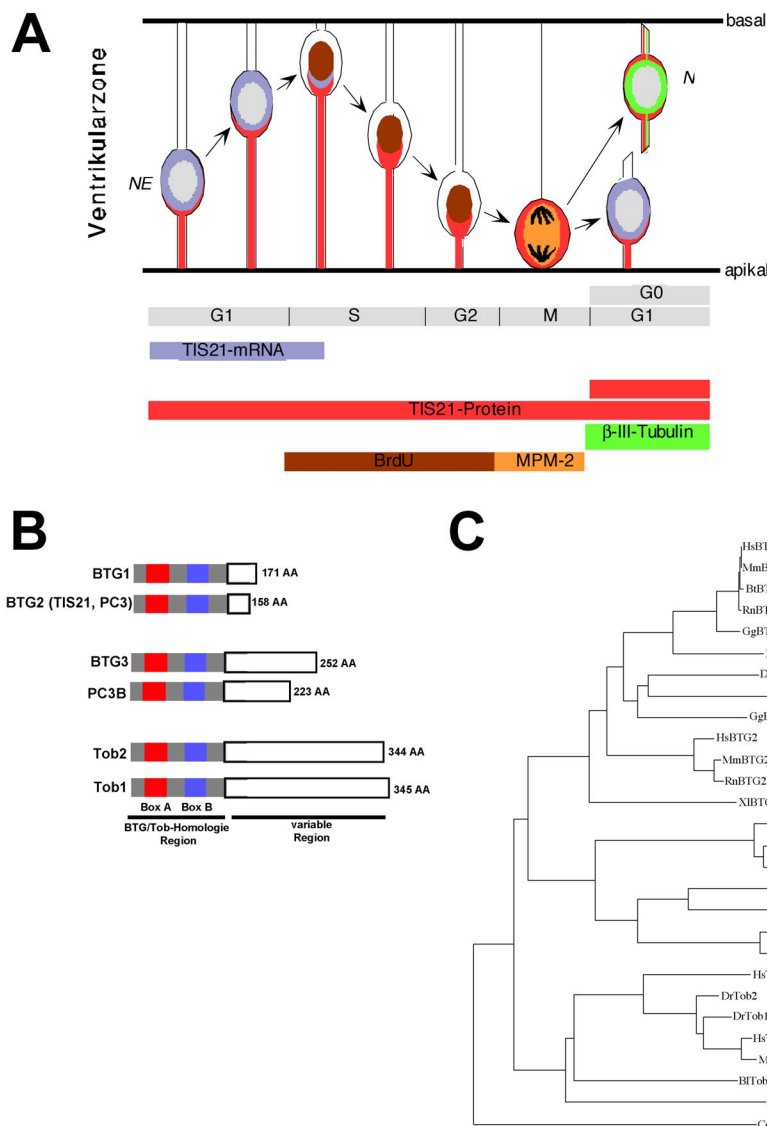
(Abb. 6C). BTG1 und BTG2 weisen eine jeweils evolutionär hoch konservierte, 2 kb große 3'UTR von noch unbekannter Funktion auf.

TIS21 ist ein Protein von 158 Aminosäuren Länge und 17 kd Molekulargewicht. Subzellulär ist es im Cytoplasma lokalisiert und scheint im Neuroepithel im apikalen Cytoplasma angereichert. TIS21 ist, wie die anderen Gene der BTG/Tob Familie, ein antiproliferatives Gen: Die Überexpression von TIS21 führt *in vitro* zu einer Verlangsamung des Zellzyklus (Montagnoli *et al.*, 1996; Rouault *et al.*, 1996) – in erster Linie durch eine Verzögerung am G1/S-Kontrollpunkt (Montagnoli *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 1998). Der Zellzyklus im Neuroepithel wird, wie erwähnt, mit Einsetzen der Neurogenese langsamer, und zwar durch eine Verlängerung der G1-Phase. Die Expression entsprechend der neurogenetischen Gradienten korreliert ebenfalls mit einer Zellzyklusverlangsamung. Es könnte sein, dass TIS21 selbst über eine Interaktion mit der Zellzyklusmaschinerie und eine Verlangsamung des Zellzyklus den Übergang zu neuronaler Differenzierung im Neuroepithel beeinflusst. Neben der Expression in der Neurone-generierenden Teilung *in vivo* entspricht die Induktion in PC12-Zellen durch NGF bzw. P19-Zellen mit Retinsäure vor deren terminaler Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp *in vitro* dieser Vorstellung (Bradbury *et al.*, 1991; V. J. Kidd, persönliche Mitteilungen). Tatsächlich konnte ein Effekt von TIS21 auf das Zellteilungsmuster von Neuroepithelzellen nachgewiesen werden: Die Überexpression erhöht die Zahl der asymmetrischen Teilungen *in vitro* (Malatesta *et al.*, 2000). Es gibt Hinweise, dass Gene der BTG/Tob-Genfamilie auch in anderen Geweben Differenzierungsprozesse steuern. Die Expression von TIS21 korreliert mit der Differenzierung von Osteoblasten (Raouf & Seth, 2002), die im *Tob-knock out* überproliferieren (Yoshida *et al.*, 2000). In *C. elegans* ist Tob für die Bildung männlicher Keimzellen notwendig (Chen *et al.*, 2000). Weitere Hinweise auf eine Funktion der BTG/Tob-Gene bei der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung ist eine Assoziation mit der Tumorentwicklung als potentielles Tumorsuppressorgen. Der Verlust von BTG1 ist mit einem B-Zelllymphom assoziiert (Rouault *et al.*, 1992), Lim und Mitarbeiter (Lim *et al.*, 1995) konnten zeigen, dass TIS21 in Krebszellen aus Lunge und Thymus herunterreguliert ist. Es gibt Vermutungen über eine Verbindung von TIS21 zu Brustkrebs (Duriez *et al.*, 2002) und einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Verlust der TIS21-Expression und Prostatakarzinomen (Ficazzola *et al.*, 2001).

### Molekulare Interaktion und Wirkungsmechanismus

Insbesondere vor diesem Hintergrund ist interessant, dass die TIS21-Expression nicht nur durch Wachstumsfaktoren und Mitogene induziert wird, sondern auch ein *primary target gene* des Tumorsuppressors p53 ist (Rouault *et al.*, 1996; Kannan *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene inhibiert TIS21 die Expression von CyclinD1 (Rb-abhängig) und CyclinE (Rb-unabhängig) (Guardavaccaro *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 1998). Über welche molekularen Interaktionspartner diese Effekte vermittelt werden, ist unbekannt. Eine direkte Interaktion wurde u.a. mit Caf1, PRMT-1 (eine Protein-Arginin-Methyltransferase) und PICK1 nachgewiesen. Caf-1 ist eine Komponente des

CCR4-Komplexes (in Hefe) und reguliert Transkription und mRNA-Stabilität (Tucker *et al.*, 2001). Der orthologe Komplex in Vertebraten interagiert mit TIS21 über die konservierte Box B und reguliert über ein LXXLL-Motiv die transkriptionale Aktivität von ER $\alpha$  (*estrogen receptor  $\alpha$* ) (Rouault *et al.*, 1998; Prevot *et al.*, 2001). TIS21 würde demnach als Repressor von ER $\alpha$  die CyclinD1-Level reduzieren und so den Zellzyklus verlangsamen. TIS21 steigert außerdem die Aktivität von PRMT-1 und kann auf diese Weise das Methylierungsmuster von Proteinen beeinflussen (Lin *et al.*, 1996). Diese Interaktion scheint zumindest *in vitro* bei der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen eine Rolle zu spielen (Berthet *et al.*, 2002). Interessant ist die Interaktion von TIS21 mit der PDZ-Domäne von PICK1 (Lin *et al.*, 2001). PICK1 ist ein mit Proteinkinase C-interagierendes Protein. PDZ-Domänen sind fundamentale Bausteine in Plasmamembran-/junction-assoziierten Proteinkomplexen wie z.B. der besprochene ZO-1(*Zona occludens-1*)/ASIP/Par-6-Komplex (Ohno, 2001). PICK1 könnte somit die beobachtete polare Verteilung von TIS21 bewirken.

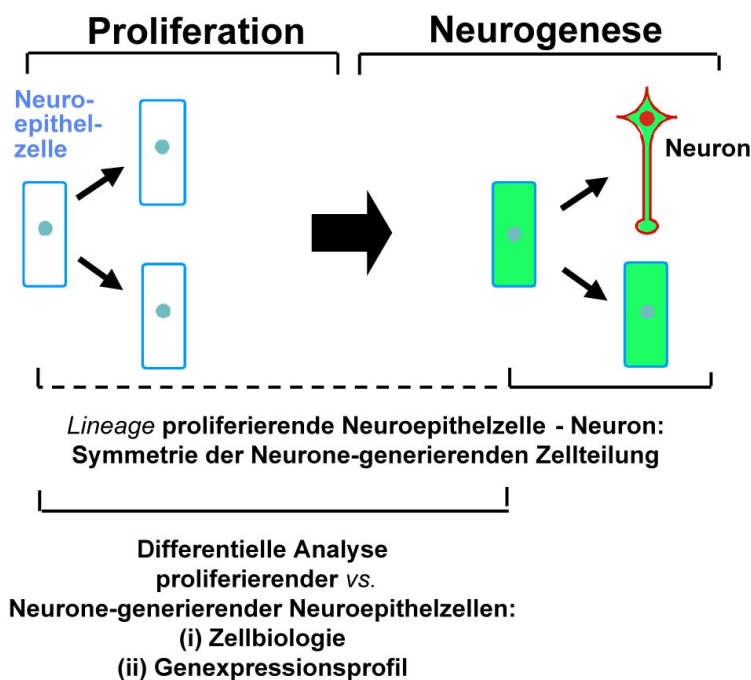


**Abb. 6. TIS21 – ein Mitglied der BTG/Tob-Familie – ist ein Marker für Neurone-generierende Neuroepithelzellen.** (A) Expression von TIS21-mRNA und Protein während der Neurone-generierenden Zellteilung. Die TIS21 mRNA und Protein werden in der G1-Phase vor der Neurone-generierenden Mitose exprimiert. TIS21-Protein persistiert die Zellteilung hindurch und wird zumindest auf das Neuron weitergegeben (eine Subpopulation von BrdU-, MPM2- und  $\beta$ -III-Tubulin positive Zellen ist immunoreaktiv für TIS21). Die TIS21-mRNA dagegen wird beim Übergang zur S-Phase degradiert (BrdU-, MPM2 und  $\beta$ -III-Tubulin positive Zellen sind negativ für TIS21-mRNA). (Abb. aus Iacopetti *et al.*, 1999). (B) Schematische Darstellung der BTG/Tob-Proteinfamilie. Die Sequenzmotive Box A und Box B sind charakteristisch für BTG/Tob-Proteine und hoch konserviert. (C) Stammbaum der BTG/Tob-Proteinfamilie. (Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Bt: *Bos taurus*; Rn: *Rattus norvegicus*; Gg: *Gallus gallus*; Xl: *Xenopus laevis*; Dr: *Danio rerio*; Bt: *Branchiostoma lanceolatum*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ce: *Caenorhabditis elegans*).

### 1.9 TIS21-GFP-markierte Neuroepithelzellen – ein Ansatz zur Untersuchung der Proliferationskontrolle im Neuroepithel

Eine Möglichkeit, die genetische Kontrolle der Neuronenzahl einer Spezies zu untersuchen, ist ein rein mechanistischer Ansatz (zu alternativen Ansätzen siehe Abschnitt 4.7): „Das *timing* des Umschaltens zur ersten, nicht mehr proliferativen Zellteilung determiniert im wesentlichen die Neuronenzahl verschiedener Gehirnregionen innerhalb einer und zwischen verschiedenen Spezies“ – würde man die zugrunde liegenden zellbiologischen Mechanismen des Umschaltens und die daran beteiligten Gene erforschen, könnte man die genetische Regulation der Neuronenzahl verstehen und mögliche evolutionäre Veränderungen in diesen Genen als genomisches Korrelat zunehmender Encephalisierung identifizieren.

Dazu muss (i) die *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ charakterisiert und die letzte nicht mehr proliferierende Teilung identifiziert werden, um dann (ii) die am Umschalten zwischen den einzelnen Zellteilungstypen in der *lineage* beteiligten zellbiologischen Mechanismen und Gene zu untersuchen (Abb. 7).



**Abb. 7. Strategie zur Untersuchung der Proliferationskontrolle im Neuroepithel.** Über eine Charakterisierung der *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ und die Identifizierung der zellbiologischen Prozesse und Gene, die einzelne Übergänge innerhalb dieser *lineage* steuern, soll ein mechanistisches Verständnis von Proliferationskontrolle im Neuroepithel erlangt werden. Mit GFP-markierten Neurone-generierenden Neuroepithel-zellen können (i) die Symmetrie der Neurone-generierenden Teilung analysiert und (ii) durch eine differenzielle Analyse der Zellbiologie (hier: Verteilung apikaler Membran bei der Zellteilung & Zellzyklusdauer) proliferierender vs. Neurone-generierender Neuroepithelzellen mögliche Steuerungsmechanismen untersucht werden. Ferner eröffnet sich die Möglichkeit, über das Genexpressionsprofil beider Zellpopulationen die an diesem Prozess beteiligte Gene zu finden.

Dieser experimentelle Ansatz basiert auf der selektiven Markierung Neurone-generierender Neuroepithelzellen, realisiert durch die Expression von GFP unter Kontrolle des TIS21-Gens in transgenen bzw. *knock in*-Mäusen.

Damit kann (i) eine videomikroskopische Darstellung der Neurone-generierenden Zellteilungen realisiert werden, um zu klären, ob Neurone durch symmetrische oder asymmetrische Teilungen generiert werden. Somit wären die bei der letzten Zellteilung in der *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ entstehenden Zelltypen bekannt, Voraussetzung um Steuerungsmechanismen (siehe ii) mit *cell fate decisions* zu korrelieren. Die selektive Markierung Neurone-generierender Neuroepithelzellen würde (ii) die Möglichkeit einer differentiellen Analyse der proliferierenden<sup>3</sup> vs. Neurone-generierenden Zellpopulationen in Bezug auf zellbiologische Steuerungsmechanismen des Übergangs von Proliferation zu Neurogenese (asymmetrische Verteilung von apikalen Membrankomponenten bei Zellteilungen, Zellzykluslänge) und differentiell exprimierte Gene eröffnen.

Ferner sollte der homozygote *TIS21-GFP-knock in*, als *TIS21-knock out*-Modell, Einblicke in die physiologische Funktion von TIS21 und dessen mögliche Beteiligung an der Steuerung von Neurogenese über eine Zellzyklusverlangsamung liefern.

Darüber hinaus wurde versucht, mittels si-*(small interfering)*-RNA spezifisch die Expression von Genen im Neuroepithel postimplantatorischer Mäuseembryonen zu unterdrücken. Man würde so prinzipiell nachweisen, dass es möglich ist mit siRNA RNAi (*RNA interference*) im Säuger *in vivo* zu induzieren und ein geeignetes Testsystem schaffen, um die physiologische Funktion von Kandidatengenen, z.B. aus einem differentiellen *gene expression profiling* GFP-positiver vs. GFP-negativer Neuroepithelzellen, relativ schnell zu untersuchen.

---

<sup>3</sup> Genaugenommen betrachtet man den Unterschied zwischen Neurone-generierenden Zellteilungen vs. „nicht Neurone-generierenden Zellteilungen“ - unabhängig davon, ob es sich bei letzteren um die ersten, nicht mehr proliferierenden Teilungen handelt. Falls der Neurone-generierenden Zellteilung bereits eine asymmetrische Teilung vorausgeht, ist es erforderlich, sich in der *lineage* „rückwärts“ vorzuarbeiten.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Elektroporator	Biorad Gene Pulser
Entwickler	Kodak M35 X-OMAT-Processor
Gelkammern	EMBL
Heizblock	Eppendorf Thermostat 5320
Mikroskope	Leica TCS Zeiss Axiophot Olympus SZX Biorad Radiance 2100 Multiphoton
PCR-Gerät	Stratagene Robocycler Gradient 96
PH-Meter	Beckman $\Phi$ 32 pH-Meter
Photometer	Pharmacia Ultrospec III
Speedvac	Savant
Sterilbank	SteriGard Hood, The Baker Company
UV-Crosslinker	Stratalinker 2400
Wasserbad	Grant
Zentrifugen	Heraeus Sepatech Omnifuge 2.0 RS Beckmann J2-MC Heraeus Biofuge Pico

#### 2.1.2 Chemikalien

Für Routinearbeiten wurden Standard-Chemikalien in p.A.-Qualität der Firmen Merck, Roth, Riedel-de Haen oder Sigma verwendet. Für die Zellkultur wurden ausschließlich entsprechend ausgewiesene Chemikalien eingesetzt.

DIG-Detektions-System	Roche
DNA-Standards	MBI Fermentas Roche
Easy Hyb Granules	Roche

Enzyme	GibcoBRL MBI Fermentas Merck Roche
G418	GibcoBRL
Ganciclovir	Roche
Gelatine	Sigma
Glutamin	GibcoBRL
LIF	GibcoBRL
Mitomycin C	Sigma
Natriumpyruvat	GibcoBRL
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	GibcoBRL
Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL
Trizol	GibcoBRL
Trypsin/EDTA	GibcoBRL

### 2.1.3 Kits

ALF-DNA-Sequencing-Kit	Pharmacia Biotech
DIG-PCR-Labeling-Kit	Roche
MEGAscript-Kit	Ambion
Plasmid-Maxi-Kit	GibcoBRL
Qiaex-II-Gel-Extraction-Kit	Qiagen
Qiaquick-Gel-Extraction-Kit	Qiagen
Qiaquick-PCR-Purification-Kit	Qiagen
TOPO-Cloning-Kit	Invitrogen

### 2.1.4 Filme

Amersham Hyperfilm

### 2.1.5 Bakterienstämme

TOP10 (Invitrogen): F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

### 2.1.6 Versuchstiere

Für alle Untersuchungen wurde biologisches Material aus C57Bl6 Inzucht-Stämmen eingesetzt. Der genetische Hintergrund der generierten transgenen Mauslinien ist C57Bl6.

Für die angegebenen Embryonalstadien gilt: E0 ist Mitte des Tag/Nacht-Zyklus, 00:00 h, am Tag der Detektion des *vaginal plugs*.

### 2.1.7 Zelllinien

129-Tacona (Eurogentec)	Embryonale Stammzelllinie Maus (Stamm 129)
MEFNeoR (Eurogentec)	Primäre embryonale Fibroblasten Maus (transgene Linie homozygot für Neomycin-Resistenz)
R1 (Nagy <i>et al.</i> , 1993)	Embryonale Stammzelllinie Maus (Stamm 129)
Vero	Zelllinie aus der Niere grüne Meerkatze

### 2.1.8 Vektoren

1704	HSV-Amplicon mit IRES-lacZ-Kassette
ES20 (J.-P. Rouault)	Genomischer Klon des TIS21-Gens
pBluescriptKS+ (Stratagene)	Klonierungsvektor
pCMV- <i>cre</i>	<i>cre</i> -Expressionsvektor mit CMV-Promoter
pEGFP-1 (Clontech)	EGFP-Expressionsvektor ohne eigenen Promoter
pEGFP-N2 (Clontech)	EGFP-Expressionsvektor mit CMV-Promoter
pEYFP-Nuc (Clontech)	Expressionsvektor für kernlokalisiertes EYFP mit CMV-Promoter

pIC19R/MC1-TK	Vektor mit HSV-Thymidinkinase-Gen
pMC1-Neo-pA (Stratagene)	Neomycin Expressionsvektor mit Thymidinkinase Promoter
pSVpaXΔ	β-Galaktosidase-Expressionsvektor

### 2.1.9 Antikörper

Tab. 2. Verwendete Antikörper.

Antikörper	Art	Verdünnung	Quelle
α-BrdU	Maus monoklonal IgG	1:500 (a)	Sigma
α-Cadherin	Kaninchen polyklonal IgG	1:300 (a)	DAKO
α-CD133 (13A4)	Ratte monoklonal IgG	1:200 (d)	Weigmann <i>et al.</i> , 1997
α-CD19-PE (6D5)	Ratte monoklonal IgG2a	1:20 (d)	DPC Biermann
α-CD34-PE (MEC14.7)	Ratte monoklonal IgG2a	1:20 (d)	DPC Biermann
α-CD3-PE (KT3)	Ratte monoklonal IgG2a	1:20 (d)	DPC Biermann
α-CD45-PE (30-F11)	Ratte monoklonal IgG2b	1:40 (d)	Becton Dickinson
α-CD4-PE (YTS191.1)	Ratte monoklonal IgG2b	1:20 (d)	DPC Biermann
α-CD8-PE (C6)	Ratte monoklonal IgG2a	1:20 (d)	DPC Biermann
α-DIG-AP	Schaf polyklonal IgG	1:20000 (c)	Roche
α-GFP	Kaninchen polyclonal IgG	1:200 (a)	Molecular Probes
α-Kaninchen-Cy3	Ziege polyklonal IgG	1:300 (a)	Jackson
α-Kaninchen-HRP	Ziegel polyklonal IgG	1:2000 (b)	Jackson
α-Maus-LSCR	Ziege polyklonal IgG	1:300 (a)	Jackson



$\alpha$ -Sca-1 (D7)	Ratte monoklonal IgG2a	1:40 (d)	Becton Dickinson
$\alpha$ -TIS21 (1511)	Kaninchen polyklonal IgG	1:2000 (b)	Iacopetti <i>et al.</i> , 1999
$\alpha$ -TIS21 (K4)	Kaninchen polyklonal IgG	1:200 (a)	Iacopetti <i>et al.</i> , 1999
$\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase	Maus monoklonal IgG	1:1000 (a)	Sigma
$\alpha$ - $\beta$ -III-Tubulin	Maus monoklonal IgG	1:300 (a)	Sigma

(a: Immunfluoreszenz; b: Western-Blot; c: Southern-/Northern-Blot-Detektion; d: Verdünnung zur Oberflächenmarkierung bei FACS).

### 2.1.10 Oligonukleotide

P1: 5'-GTG GTA TGG CCG GCG CGG CCC GGG GAA AGT CCG GCA GAG  
P2: 5'-CTC CTC GCC CTT GCT CAC CAT ACC GGT GGC TGA GGA AGT AGC  
P3: 5'-GCT ACT TCC TCA GCC ACC GGT ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG  
P4: 5'-GGA TTT TGG CCA TTT CGG CCT ATT GGT TAA AAA ATGAGC TG  
P5: 5'-CGC GCG TCG ACC AGG TAG GGA AGC TGG TGG  
P6: 5'-CGC CTT AAG ATA CAT TGA TGA GTT TGG  
P7: 5'-GCG CGA CGT CGA CTA GTG AGC ACA CGT CGG GGT C  
P8: 5'-GAG CGC AGT CGA CAC TAG TGG ATC CCC CGG GCT G  
P9: 5'-GCG CGT CGA CGT GAA GCC AGG CCA AG  
P10: 5'-GCC GCT GCC GCT GCC GCT GCC GCT GGA GAC GGC CAT CAC  
P11: 5'-GCC AGC GGC AGC GGC AGC GGC GTG AGC AAG GGC GAG G  
P12: 5'-CGC TTT ACT TGT ACA GCT CGT C  
P13: 5'-CGC GAC GTC GAC TAG TAT AGG AGC CAC CCG ACC CTG GCA C  
P14: 5'-GCG CGG AAT TCT AGC TGG AGA CGG CCA TC  
P15: 5'-GCG CGA ATT CCA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AG  
P16: 5'-GGG TCA GTT ATC TAG ATC CGG TGG  
P17: 5'-GAG TGG TAT GAA AGG CGC AGC  
P18: 5'-CCT TGA GTC TCT GCT CGC TCA  
P19: 5'-CTG AAG CAC TGC ACG CCG TAG  
P20: 5'-GGG GTA ACA TCA GTT CAG CAT TGG G  
P21: 5'-GGA TCC TCT GTA TCC ACC CTA C  
P22: 5'-ACC GGT GGC TGA GGA AGT AGC TG  
P23: 5'-TCC AGG TAG GGA AGC TGG TGG  
P24: 5'-GAG CAT GTG GGA AAA GGG ACA GAA G  
P25: 5'-GCC GTT TAC GTC GCC GTC CAG CTC

P26: 5'-TTA AGT CCC CGT CTC CC

P27: 5'-GCG CGC CCG GGA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT CAG  
TGT GGT TTT GCA AGA GGA AGC

P28: 5'-GCG CGA CTA GTA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT CCG  
AAC AAA CGA CCC AAC ACC

P29: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA TCG TAA TCA CCC GAG TGT GA

P30: 5'-AAT TAC CCT CAC TAA AGG GAG CCC TAA TCC GAG CCA GTT TA

P31: 5'-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGT GAG CAA GGG CGA GGA

P32: 5'-TAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG TAC AGC TCG TCC ATG CCG A

### 2.1.11 Puffer und Medien

10x DNA-Probenpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7.6 2.5 g/l Bromphenolblau 2.5 g/l Xylencyanol 60% Glycerin in dH <sub>2</sub> O
10x MOPS	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 20 mM EDTA pH 7.0
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	250 mM Tris/Cl, pH 8.8 1.9 M Glycin 10% SDS
10x TBE	0.89 M Tris 0.89 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8.0
20x SSC	3 M NaCl 300 mM tri-Natrium-Citrat pH 7.0
2x ES-Freezing-Medium	50% FCS (hitzeinaktiviert, 56 °C, 30 min) 30% ES-Medium 20% DMSO

2x RNA-Probenpuffer	250 $\mu$ l deionisiertes Formamid 83 $\mu$ l 37% Formaldehyd 50 $\mu$ l 10x MOPS 50 $\mu$ l Glycerin 10 $\mu$ l 2.5% Bromphenolblau 57 $\mu$ l DEPC-H <sub>2</sub> O
4x SDS-PAGE-Trennpuffer	1.5 M Tris/Cl, pH 8.8 0.4% SDS
4xSDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0.5 M Tris/Cl, pH 6.8 0.4% SDS
50x TAE	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8.0
5x Protein-Probenpuffer	400 mM Tris/Cl, pH 6.8 50 mM EDTA 15% SDS 0.01% Bromphenolblau
Blockierlösung	5% Milchpulver in PBST
Denaturierungslösung	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
DEPC-H <sub>2</sub> O	0.001% v/v DEPC autoklavieren
EF-Medium	DMEM 10% FCS (hitzeinaktiviert, 56 °C, 30 min) 1x nicht essentielle Aminosäuren 1 mM Natriumpyruvat 1x $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung 2 mM L-Glutamin 1x Penicillin/Streptomycin

ES-Medium	DMEM 20% FCS (hitzeinaktiviert, 56 °C, 30 min) 1x nicht essentielle Aminosäuren 1 mM Natriumpyruvat 1x b-Mercaptoethanol 2 mM L-Glutamin 1x Penicillin/Streptomycin 0.9 U/ml LIF
G418-Lösung	20 mg/ml aktives G418 in dH <sub>2</sub> O
Ganciclovir-Lösung (100.000x)	543 mg Ganciclovir-Natrium in 10 ml dH <sub>2</sub> O lösen bei -20 °C lagern
Gelatine-Lösung	0.1% Gelatine in dH <sub>2</sub> O autoklavieren
LB	10 g/l NaCl 10 g/l Bacto-Trypton (Difco) 5 g/l Bacto-Hefeextract (Difco)
LB-Agar	15 g/l Bacto-Agar (Difco) in LB
Lysepuffer A	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 50 mM EDTA 8% Sucrose 0.5% Triton-X-100
Lysepuffer B	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 100 mM NaCl 1% SDS
Lysepuffer C	100 mM Tris/HCl, pH 8.6 5 mM EDTA 200 mM NaCl 0.2% SDS
Lysepuffer D	150 mM NaCl 20 mM Tris/Cl, pH 7.4 10 mM EDTA 0.3% Tween-20 1x PMSF 1x Leupeptin 1x Aprotinin

Mercaptoethanol-Lösung (100x)	0.1% in PBS, bei -20 °C lagern
Mitomycin C-Lösung	2 mg Mitomycin C in PBS lösen bei -20 °C lagern
Moviol	6.9 g Glycerin und 2.4 g Moviol in 6 ml dH <sub>2</sub> O lösen, mit 12 ml 0.2 M Tris/HCl pH 8.5 versetzen und bei 50 °C 30 min inkubieren. Die Lösung durch Zentrifugation (5000g, 15 min, R <sub>0</sub> ) klären.
Neutralisierungslösung	0.5 M Tris/HCl, pH 7.5
PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST	0.2% Tween-20 in PBS
Penicillin/Streptomycin (100x)	10.000 U/ml Penicillin 10.000 U/ml Streptomycin in PBS
Slice-Medium	NB-Medium 1x N2 1x B27 10% Mausserum ( <i>immediately centrifuged</i> ) 1x Penicillin/Streptomycin
TE	10 mM Tris/Cl, pH 7.4 1 mM EDTA
Transferpuffer 1	0.3 M Tris 20% MeOH pH 10.4
Transferpuffer 2	0.025 M Tris 20% MeOH pH 10.4
Transferpuffer 3	0,025 M Tris 0.04 M 6-Aminohexansäure pH 9.4
Trypsin/EDTA	0.5 g/l Trypsin 0.2 g/l EDTA in HBSS

Vero-Medium	DMEM 10% FCS (hitzeinaktiviert, 56 °C, 30 min)
Waschlösung 1	2x SSC 0.1% SDS
Waschlösung 2	0.5x SSC 0.1% SDS
<i>Whole embryo culture</i> -Medium	DMEM 10% MS ( <i>immediately centrifuged</i> ) 1x Penicillin/Streptomycin

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Plasmid-Mini-Präparation

Bakterien einer 1.5 ml ü.N.-Kultur wurden sedimentiert (15000g, 30 sec, RT), in 200 µl Lysepuffer A + 15 µl Lysozym resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Nach 2 min Denaturierung bei 95 °C und Zentrifugation (15000g, 10 min, RT) wurde die DNA aus dem Überstand mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach Waschen mit 70% EtOH wurde das Pellet im Vakuum getrocknet, in 30 µl TE aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2 Plasmid-Maxi-Präparation

(alle nachfolgenden Materialien: Concert Maxi-Präparationssystem, GibcoBRL)

Die Bakterien einer 200 ml ü.N.-Kultur wurden sedimentiert (5000g, 10 min, 4 °C) in 10 ml Puffer E1 resuspendiert und durch 5 min Inkubation in 10 ml Puffer E2 lysiert. Nach Neutralisation mit 10 ml Puffer E3 und Zentrifugation (15000g, 10 min, RT) wurde der Überstand auf eine mit 30 ml Puffer E4 äquilibrierte Säule geladen. Nach Waschen mit 60 ml Puffer E5 wurde die DNA mit 15 ml Puffer E6 eluiert und durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde sedimentiert (15000g, 30 min, 4 °C), mit 5 ml 70% EtOH gewaschen und in 500 µl TE aufgenommen.

### 2.2.3 PCR

PCR-Produkte für Klonierungen wurden mit Pfx-DNA-Polymerase (fehlerkorrigierend, antikörperblockiert, GibcoBRL) amplifiziert.

PCR-Mix

10x Reaktionspuffer	5 $\mu$ l
10x PCR-Enhancer-Solution	5 $\mu$ l
40x dNTP	1.3 $\mu$ l
Primer (100 pM)	0.5 $\mu$ l
Template-DNA (1 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Pfx-DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
ad dH <sub>2</sub> O	50 $\mu$ l

PCR-Programm

PCR-Zyklus	Temperatur	Zeit
1	94 °C	3 min
25 x	94 °C	30 s
	55 °C	1 min
	68 °C	1 min/kb
26	68 °C	7 min

**2.2.4 Restriktionsanalyse**

Zur Restriktionsanalyse wurde 1  $\mu$ g DNA in 20  $\mu$ l Reaktionsvolumen mit 3 U/ $\mu$ g Enzym eine Stunde inkubiert. 5  $\mu$ l des Reaktionsansatzes wurden in 0.7-2.0% TBE-Agarosegelen mit 0.1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid aufgetrennt.

**2.2.5 DNA-Sequenzierung**

Zur DNA-Sequenzierung wurde das ALF Express System unter Verwendung des Cy5-dATP Labeling Kits und Long-Range-Sequenziergelen eingesetzt (Pharmacia).

**2.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten**

PCR-Produkte wurden direkt in TOPO-Vektoren (Invitrogen) kloniert bzw. über Restriktionsschnittstellen in Standard-Vektoren eingefügt. Als Plasmid vorliegende DNA-Fragmente wurden über Restriktionsschnittstellen in Standard-Vektoren kloniert.

Bei Verwendung von TOPO-Vektoren wurden nach gelelektrophoretischer Aufreinigung (0.7-2% TBE-Agarosegele, Qiaspin-Gelextraction-Kit, Qiagen) typischerweise 20 ng PCR-Produkt und 1  $\mu$ l TOPO-Vektor in 5  $\mu$ l Reaktionsvolumen ligiert (5 min, RT). 2  $\mu$ l des inaktivierten Reaktionsansatzes (65 °C, 10 min) wurden zur Transformation von chemisch kompetenten TOP10-Bakterien (Invitrogen) eingesetzt.

Bei Klonierungen über Restriktionsschnittstellen wurde das PCR-Produkt gereinigt (PCR-Purification-Kit, Qiagen) und mit Restriktionsenzymen geschnitten (1  $\mu\text{g}$  DNA, 30  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen, 3 U/ $\mu\text{g}$  Enzym, 3 h). Als Plasmid vorliegende Insert- bzw. Vektor-DNA wurde mit Restriktionsenzymen gespalten (3  $\mu\text{g}$  DNA, 30  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen, 3 U/ $\mu\text{g}$  Enzym, 3 h) und ggf. modifiziert (T4-DNA-Polymerase in Restriktionspuffer + 2 mM dNTP, 1 U/ $\mu\text{g}$ , 20 min, 11 °C). Vektor-DNA wurde dephosphoryliert (CIAP in Restriktionspuffer, 1 U/ $\mu\text{g}$ , 30 min, 37 °C). Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgereinigt (0.7-2% TBE-Agarosegele, Qiaspin-/Qiaex II-Gelextraction-Kit). 100 ng Vektor wurden mit einem dreifachen molaren Überschuß an Insert ligiert (20  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen, 2 U, 1h, RT). Chemisch kompetente TOP10-Bakterien wurden mit 2  $\mu\text{l}$  inaktiviertem Ligationsansatz (65 °C, 10 min) transformiert.

### 2.2.7 Klonierung der Transgene und Targeting-Vektoren

#### TG1

Ein 1721 bp Sal I-Msc I-Fragment des proximalen TIS21-Promoters (bp -1738 bis +20) aus ES20 (J.-P. Rouault) wurde über Sal I-Sma I Restriktionsschnittstellen in pEGFP-1 kloniert. Das entstandene Plasmid ist PTIS21/1GFP. Zur Isolierung des Transgens TG1 wurde PTIS21/1GFP mit Sal I-Afl II geschnitten und zur Pronukleusinjektion vorbereitet (Abschnitt 2.2.24).

#### TG2

Eine Maus Cosmid-Library (Library 121, RZPD) wurde mit einem 664 bp Bam HI-Bam HI-Fragment (bp -1738 bis -1074) *gescreent*. Es wurden sechs positive Klone mit >23 kb 5' genomischer Sequenz identifiziert (MPMGc121G03391Q2, MPMGcE11577Q2, MPMGc121D08200Q2, MPMGc121I07176Q2, MPMGcP1642Q2 und MPMGc121N01428Q2). Die Klonierung eines 16731 bp Sma I-Sma I-Fragments (bp -16746 bis -11) des TIS21-Promoters aus MPMGc121D08200Q2 über Sma I in CX0 lieferte PTIS21/4GFP. CX0 enthält die bp -11 bis +68 des TIS21-Gens, fusioniert mit der GFP-Expressionskassette aus pEGFPNuc. CX0 ist das Produkt einer Fusions-PCR mit den Primersets und Templates P1, P2, ES20 bzw. P3, P4 und pEGFPNuc, kloniert in pCRIITA (Invitrogen). pEGFPNuc entstand durch Ersetzen des Bsr GI-Afl II-Fragments in pEGFP-N2 (Clontech) durch das entsprechende aus pEYFPNuc (Clontech). Zur Isolierung des Transgens TG2 wurde PTIS21/4GFP mit Sfi I geschnitten und zur Pronukleusinjektion vorbereitet (Abschnitt 2.2.24).

#### TG3

5870 bp des TIS21-Promoters (bp -5885 bis -11) wurden als Eco RI-Sma I-Fragment aus MPMGc121D08200Q2 über Sma I in CX0 kloniert. Das Sfi I Insert aus CX0 wurde über Eco RV in



CX1 kloniert. Das resultierende Konstrukt ist PTIS21/5GFP. CX1 wurde durch Klonierung des Spe I-Inserts aus C11 in die Spe I-Schnittstelle von pBSKS generiert. Zur Isolierung des Transgens TG3 wurde PTIS21/5GFP mit Sal I geschnitten und zur Pronukleusinjektion vorbereitet (Abschnitt 2.2.24).

### KI1

Aus pMC1NeopA wurde mittels PCR das Neomycin-Resistenzgen amplifiziert (Primer: P27, P28). Das von loxP-Sequenzen flankierte Produkt wurde über Sma I-Spe I in pBSKS kloniert. Das resultierende Plasmid ist C1. 1137 bp des proximalen TIS21-Promoters (bp -1070 bis +68) fusioniert mit einer GFP-Expressionskassette wurden aus PTIS21/4GFP amplifiziert (Primer P5 und P6) und über Sal I-Sma I in C1 inseriert. Das Produkt ist C6. TIS21-Intron und -Exon 2 (3601 bp, bp +210 bis +3812) wurden mit PCR amplifiziert (Primer: P7, P8; Template: ES20) und über Sal I in einen mit Eco RV-Sma I-geöffneten pBSKS-Vektor kloniert. In das entstandene Konstrukt (C4) wurde über Eco RI ein 4765 bp TIS21-Fragment (bp +3810 bis +8575) eingefügt. Das Insert des so generierten Plasmids (C11) wurde über Sal I in CX2 kloniert: Es entstand CB1. CX2 wurde durch Insertion des Xho I-Bam HI-Inserts aus pIC19R/MCI-TK in pBSKS konstruiert. Insertion des Spe I-Fragments aus CB1 in C6 lieferte den Targeting-Vektor C13. Der Targeting-Vektor wurde mit Not I linearisiert und in ES-Zellen elektroporiert (Abschnitt 2.2.20).

### KI2

TIS21-Intron (für C14) plus ORF des TIS21-GFP-Fusionsproteins wurden durch Fusions-PCR (Primer und Templates: P9, P10 und ES20 bzw. P11, P12 und pEGFP-1) amplifiziert und über Sal I-Sma I in C1 eingefügt. Es entstand Vektor C7. Vector C8 (incl. TIS21-Promoter und -Intron für C15) wurde durch Austausch des Sal I-Nhe I-Fragments mit dem Produkt einer PCR (Primer: P5, P14; Template ES20) in C7 generiert. Die TIS21-3'UTR, amplifiziert durch PCR mit den Primern P13, P8 und Template ES20 (bp +1752 bis +3812), wurde über Sal I in einen Eco RV-Sma I-geschnittenen pBSKS-Vektor kloniert. In das entstandene Konstrukt (C5) wurden über Eco RI 4765 bp des TIS21-Gens (bp +3810 bis +8575) inseriert. Das Insert des so generierten Plasmids (C12) wurde über Spe I in CX2 kloniert. Durch Klonierung des Inserts des entstandenen Plasmids CB2 über Spe I in C7 bzw. C8 wurden die Targeting-Vektoren C14 und C15 generiert. Der Targeting-Vektor C14 wurde mit Not I linearisiert und in ES-Zellen elektroporiert (Abschnitt 2.2.20).

### KI3

TIS21-Intron und -ORF (bp +210 bis +1751) sowie der GFP-ORF wurden mittels PCR amplifiziert (Primer und Templates: P9, P14 und ES20 bzw. P15, P16 und pEGFPNuc). Durch Klonierung des TIS21-Intron und -ORF über Sal I-Eco RI in pBSKS wurde das Plasmid C2 generiert. In C2 wurde über EcoRI-Sma I der GFP-ORF eingefügt. In den entstandenen Vector C9 wurde die IRES-Sequenz aus 1704 über Eco RI-Nco I inseriert. Das Produkt (C16) wurde über Sal I-Sma I in C1 kloniert. In

den so generierten Vektor C18 wurde über Spe I das Insert aus CB2 eingefügt. Es entstand Targeting-Vektor C20. Für C21 wurde TIS21-Promoter, -Intron und -ORF durch PCR amplifiziert (Primer: P5 und P14, Template ES20), Sal I-Eco RI restringiert und mit dem Eco RI-Sma I Insert aus C16 über Sal I-Sma I in C1 kloniert. Aus dem entstandenen Vektor C19 wurde durch Einfügen des Inserts aus CB2 über Spe I der Targeting-Vektor C21 generiert. Der Targeting-Vektor C20 wurde mit Not I linearisiert und in ES-Zellen elektroporiert (Abschnitt 2.2.20).

### 2.2.8 Präparation von genomischer DNA

Ca. 0.5 cm einer Schwanzbiopsie bzw. 50 mg einer Gewebebiopsie wurden mit 720  $\mu$ l Lysepuffer B + 30  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (10 mg/ml, Merck) ü.N. bei 55 °C inkubiert. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l gesättigter NaCl wurde 2 min durchmischt und zentrifugiert (15000g, 10 min, RT). Die DNA wurde aus 750  $\mu$ l des Überstandes mit 600  $\mu$ l Isopropanol gefällt und sedimentiert (15000g, 3 min, RT). Nach Waschen mit 70% EtOH wurde das Sediment getrocknet (ca. 15 min, 37 °C). Die DNA wurde in 250  $\mu$ l TE unter leichtem Schütteln gelöst (30 min, 55 °C).

### 2.2.9 Genotypisierung mittels PCR

Die genomische Template-DNA (Abschnitt 2.2.8) wurde vor Ansetzen des Reaktionsgemischs 5 min bei 95 °C denaturiert. Amplifiziert wurde mit Taq-DNA-Polymerase.

#### PCR-Mix

10x Reaktionspuffer	3 $\mu$ l
DMSO	3 $\mu$ l
40x dNTP	0.75 $\mu$ l
Primer (100 pM)	0.3 $\mu$ l
Template DNA (1 ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.3 $\mu$ l
ad dH <sub>2</sub> O	30 $\mu$ l

#### PCR-Programm

PCR-Zyklus	Temperatur	Zeit
1	94 °C	3 min
35 x	94 °C	30 s
	55 °C	1 min
	72 °C	30 sec
36	72 °C	7 min

Die Produkte wurden in einem 2% TBE-Agarosegel aufgetrennt.

### 2.2.10 Markierung von DNA-Sonden

Die zur Hybridisierung von Northern- bzw. Southern-Blots eingesetzten Sonden wurde mit dem PCR-DIG-Labeling-Kit (Roche) generiert. Für die PCR wurde 0.1 ng linearisiertes Template eingesetzt.

#### PCR-Mix

10x Reaktionspuffer	5 $\mu$ l
10x DIG-PCR-MIX	5 $\mu$ l
Primer (100 pM)	0.3 $\mu$ l
Template DNA (1 ng/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
High-Expand-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
ad dH <sub>2</sub> O	50 $\mu$ l

#### PCR-Programm

PCR-Zyklus	Temperatur	Zeit
1	94 °C	1:30 min
25 x	94 °C	30 s
	55 °C	1 min
	72 °C	1 min
26	72 °C	7 min

### 2.2.11 Genotypisierung mittels Southern-Blot

(alle nachfolgenden Materialien: DIG-Detektionssystem, Roche)

Zur Genotypisierung mittels Southern-Blot wurden 3-10  $\mu$ g DNA ü.N. mit 30 U Restriktionsenzym gespalten (30  $\mu$ l Reaktionsvolumen) und in einem 0.8% TBE-Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde zweimal 20 min in Denaturierungspuffer und zweimal 20 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Die DNA wurde ü.N. in 20x SSC auf eine in dH<sub>2</sub>O äquilibrierte Nylonmembran transferiert und durch UV-Vernetzung fixiert (1200  $\mu$ J/cm<sup>2</sup>, Stratagene Crosslinker). Die Membran wurde in Easy Hyb bei 68 °C 1 h blockiert und ü.N. mit DIG markierter Sonde (30 ng/ml in Easy Hyb) hybridisiert. Unspezifische Hybridisierungen wurden durch zwei Waschschriffe entfernt: zweimal 5 min Waschlösung 1 (RT) und zweimal 15 min Waschlösung 2 (68 °C). Die Membran wurde in Maleinsäurepuffer äquilibriert und 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Nach Inkubation mit  $\alpha$ -DIG-AP (1:20000 in Blockierungslösung) wurde zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion der in Detektionspuffer äquilibrierten Membran erfolgte mit CDP-Star. Die Expositionszeiten lagen typischerweise bei 5-30 min.

### 2.2.12 RNA-Präparation

100 mg Gewebe wurden in 1 ml Trizol (GibcoBRL) homogenisiert und 5 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 $\mu$ l Chloroform und 2 min Inkubation bei RT wurde 15 min bei 12000g zentrifugiert. Die RNA wurde nach 10 min Inkubation bei RT aus der wässrigen Phase durch Zugabe

von 0.5 Vol Isopropanol gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 12000g wurde das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und nach Trocknen in 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.13 Northern-Blot

Es wurden 10  $\mu$ g total-RNA bei 65°C 10 min denaturiert und auf einem 1% MOPS-Agarosegel mit 2% Formaldehyd aufgetrennt. Die RNA wurde nach zweimal 20 min Waschen in 20x SSC ü/N in 20x SSC auf eine Nylonmembran transferiert und durch UV-Vernetzung (1200  $\mu$ J/cm<sup>2</sup>) immobilisiert. Nach Waschen mit 2x SSC wurde der Blot mit DIG-Easy-Hyb bei 50°C 1 h vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 50°C mit 25 ng/ml DIG-markierter DNA-Probe. Es wurde zweimal 5 min bei RT mit Waschlösung 1 und zweimal 15 min bei 50°C mit Waschlösung 2 gewaschen. Die Detektion erfolgte wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben.

### 2.2.14 Proteinpräparation

Embryonale Gewebe wurden in Lysepuffer D auf Eis homogenisiert. Nach 5 min Zentrifugation mit 1000g bei 4°C wurde der Überstand in Probenpuffer aufgenommen.

### 2.2.15 Western-Blot

Proteinproben wurden 5 min bei 95°C denaturiert. Es wurden 30  $\mu$ g Protein auf 15% Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Der Transfer auf 0.45  $\mu$ m Nylonmembranen wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Der Blot-Aufbau (beginnend von der Anode): Whatman-Papier in Transferpuffer 1/Whatman-Papier in Transferpuffer 2/Nylonmembran/Gel/Whatman-Papier in Transferpuffer 3. Vor dem Transfer wurde die Nylonmembran in MeOH äquilibriert. Der Transfer wurde 45 min bei 250 mA durchgeführt. Die Membran wurde 30 min in Blockierlösung blockiert, 1 h mit Primärantikörper inkubiert und dreimal 10 min in PBST gewaschen und 1 h mit Sekundärantikörper inkubiert. Nach dreimal 10 min Waschen in PBST wurde der Blot mit ECL-Lösung benetzt. Die Detektion erfolgte mit Röntgenfilmen.

### 2.2.16 Immunhistochemische Färbungen von Kryostatschnitten

Zeitlich angepaarte Weibchen wurden durch cervicale Dislokation getötet. Der Uterus wurde entnommen und die Embryonen wurden unter einem Stereomikroskop in kaltem PBS freipräpariert. Nach Entfernen der extraembryonalen Hüllen und des Amnions wurden die Embryonen ü.N. bei 4°C

in 4% Paraformaldehyd/4% Sucrose in PBS fixiert. Die fixierten Embryonen wurden in 30% Sucrose in PBS ü.N. bei 4°C inkubiert und in Einbettmedium (Leica) tiefgefroren (-70°C). 10 µm Kryostatschnitte der eingebetteten Embryonen wurden auf Histobond-Objektträger (Marienfeld) transferiert und 1 h bei RT getrocknet. Nach 5 min Waschen in PBS wurden die Schnitte in 0.3% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert (10 min, RT). Reaktive Aldehydgruppen wurden in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS gequench (10 min, RT). Zur Detektion von BrdU wurde zusätzlich 30 min mit 2 N HCl bei 37 °C inkubiert und alle Antikörperinkubationen ohne Triton-X-100 durchgeführt. Die Schnitte wurden in 5% FCS/5% BSA/0.1% Triton-X-100 in PBS blockiert und mit Primärantikörper in Blockierlösung 3 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Es wurde einmal mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit Sekundärantikörper in Blockierlösung + 1 µg/ml DAPI (2 h, RT) wurden die Schnitte dreimal mit PBS und einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Präparate wurden in Moviol eingebettet und dunkel bei 4 °C gelagert.

### **2.2.17 Kultivierung von Vero-Zellen**

In N<sub>2</sub> eingefrorene Vero-Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml Vero-Medium resuspendiert, 5 min bei 200g sedimentiert und in Vero-Medium bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Konfluente Vero-Zellen wurden 2 mal mit PBS gewaschen, 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 10 ml Vero-Medium 5 min bei 200g sedimentiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:5-1:10 ausgesät bzw. in DMEM/50% FCS/10% DMSO eingefroren.

### **2.2.18 Transfektion von Vero-Zellen**

Die Transfektion wurde an 50-80% konfluenten Zellen mit FuGENE-6-Transfektionsreagenz (Roche) durchgeführt. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und auf 0.25 ml Medium/cm<sup>2</sup> eingestellt. Zur Präparation des FuGENE-6/DNA-Komplexes wurden 6 µl FuGENE-6 in 100 µl Optimem/2 µg DNA eingesetzt. Die Transfektionslösung wurde zu 2 ml des vorgelegten Zellkulturmediums gegeben und für 24 h ohne weiteren Mediumwechsel inkubiert.

### **2.2.19 Kultivierung von Feeder- und ES-Zellen**

In N<sub>2</sub> eingefrorene Neomycin-resistente Feeder-Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml EF-Medium resuspendiert, 5 min bei 200g sedimentiert und in EF-Medium bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> in

Gelatine-beschichteten Kulturschalen<sup>4</sup> kultiviert. Konfluente Zellen wurden 2 mal mit PBS gewaschen 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 10 ml EF-Medium 5 min bei 200g sedimentiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:5 ausgesät bzw. nach Zugabe von 1 Volumen 2x ES-Freezing-Medium eingefroren. Generell wurden Feeder-Zellen mit nicht mehr als sechs Passagen verwendet. Konfluente Feeder-Zellen wurden durch 3 h Inkubation mit EF-Medium + 1:100 Mitomycin C-Lösung inaktiviert. Nach zweimal Waschen mit PBS wurden die Zellen für mindestens eine weitere Stunde inkubiert.

ES-Zellen wurden mit Ausnahme der Genotypisierung ausschließlich auf Neomycin-resistenten Feeder-Zellen kultiviert. In N<sub>2</sub> eingefrorene ES-Zellen wurden bei 37°C aufgetaut, in 10 ml ES-Medium resuspendiert, 5 min bei 200g sedimentiert und in ES-Medium bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> konfluenten, inaktivierten Neomycin-resistenten Feeder-Zellen kultiviert. Es erfolgte täglicher Mediumwechsel. Subkonfluente Zellen wurden passagiert. Nach zweimal Waschen mit PBS wurden die Zellen 5 min bei 37 °C trypsinisiert. Durch Zugabe von 10 Volumen Zellkulturmedium wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden 5 min bei 200g sedimentiert, resuspendiert und in Dichten von 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> ausgesät. Alternativ wurden die Zellen nach Resuspension und Zugabe von 1 Vol eiskaltem 2x ES-Freezing-Medium in einer Dichte von 10<sup>6</sup>/ml eingefroren.

### 2.2.20 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Die Zellen von zwei subkonfluenten 10 cm Kulturschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 5 min bei 37 °C trypsinisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 Volumen ES-Medium gestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 200g, 4 °C) wurden die Zellen in einer Dichte von 7x 10<sup>6</sup>/ml in PBS resuspendiert. In 5 Elektroporationsküvetten wurden je 800 µl Zellsuspension mit 20 µg linearisierter DNA 5 min auf Eis inkubiert und bei 250 V, 500 µF elektroporiert. Die Zellsuspension wurde weitere 5 min auf Eis inkubiert und in 20 ml ES-Medium aufgenommen. Die insgesamt 100 ml wurden auf zehn 10-cm Kulturschalen verteilt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel. Nach 24 h wurde mit der Positiv-Selektion durch Zusatz von 200 µg/ml aktivem G418 begonnen, nach weiteren 48 h mit der Negativ-Selektion (ES-Medium 200 µg/ml G418 + 2 µM Ganciclovir). Neun Tage nach der Elektroporation wurde mit der Isolation potentiell rekombinanter Klone begonnen. Die Isolation der Klone wurde in PBS unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt (Stereomikroskop). Morphologisch intakte Kolonien wurden mit ca. 10 µl PBS in 40 µl Trypsin-EDTA überführt (vorgelegt in 96-well-Platten). Nach Isolation von 48 Kolonien wurde 5 min bei 37 °C inkubiert und die Zellen vorsichtig dissoziiert. Es wurden 150 µl ES-Medium + G418 zugegeben. 50 µl der Zellsuspension wurden zur Genotypisierung (Abschnitt 2.2.21) in Gelatine-beschichtete 48-well-Platten, 150 µl zur Amplifikation in 96-well-Platten (mit Feeder-Zellen) transferiert. Nach 5

<sup>4</sup> Gelatine-Beschichtung: Zellkulturschalen wurden 30 min bei RT mit Gelatine-Lösung inkubiert und nach Abnehmen der Lösung an der Luft getrocknet.

Tagen wurden die 96-*well*-Platten 2 mal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen und 5 min bei 37 °C mit 30  $\mu$ l Trypsin-EDTA inkubiert. Nach vorsichtiger Dissoziation wurden 70  $\mu$ l eiskaltes ES-Medium zugegeben. Die Suspension wurde mit 100  $\mu$ l eiskaltem 2x ES-Freezing-Medium vermischt und die Zellen bei 70 °C tiefgefroren.

#### **2.2.21 Genotypisierung von ES-Zellklonen**

Konfluente ES-Zellen einer 48-*well*-Platte wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit je 475  $\mu$ l Lysepuffer C + 25  $\mu$ l Proteinase K-Lösung (10 mg/ml, Merck) ü.N. bei 55 °C inkubiert. Die DNA wurde mit 500  $\mu$ l Isopropanol gefällt, sedimentiert (15000g, 3 min, RT) und mit 500  $\mu$ l 70% EtOH gewaschen. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l TE unter leichtem Schütteln gelöst (30 min, 55 °C). Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (2.2.9) und Southern-Blot (2.2.11).

#### **2.2.22 Amplifikation von ES-Zellklonen**

Die positiven Klone in 96-*well*-Platten wurden bei 37 °C aufgetaut und direkt in 24-*well*-Platten mit Feeder-Zellen transferiert und in ES-Medium + G418 kultiviert. Einmal täglich wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Subkonfluente Klone wurden passagiert (2.2.19) und auf 6 Well Platten mit Feeder-Zellen transferiert. Subkonfluente Klone wurden in drei Aliquots eingefroren (2.2.19).

#### **2.2.23 Injektion von ES-Zellklonen in Blastocysten**

5 Tage vor der Injektion wurde ein Aliquot ES-Zellen aufgetaut und auf einer 6-*well*-Platte in ES-Medium kultiviert (2.2.19). 36 h vor Injektion wurden die Zellen passagiert (2.1.19) und in eine 6 cm Kulturschale ausgesät. Am Tag der Injektion, 2 h nach Mediumwechsel, wurden die Zellen passagiert (2.2.19) und zweimal 20 min auf Gelatine-beschichteten 6 cm Zellkulturschalen präplattiert. Die Zellen wurden sedimentiert (200g, 5 min, 4 °C) und in kaltem, gepuffertem ES-Medium/ohne Mercaptoethanol/ohne LIF/+20 mM HEPES, pH 7.2 resuspendiert. Bis zur Injektion wurden die Zellen auf Eis gehalten.

#### **2.2.24 Pronukleusinjektion von DNA**

30  $\mu$ g des als Plasmid vorliegenden Transgens wurden präparativ verdaut (100  $\mu$ l Reaktionsvolumen, 3 U Enzym/ $\mu$ g DNA, 3 h) und in einem 0.8% TBE-Agarosegel (unter

Vermeidung von Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Transgen-DNA wurde mit Qiaex II-Gelextraction-Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert und durch Zugabe von 1/10 Vol Natrium-Acetat, pH 4.8 und 2.5 Vol EtOH bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach Waschen mit 70% EtOH wurde die DNA in Injektionspuffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) aufgenommen. Zur Pronukleusinjektion wurde die Konzentration auf  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  eingestellt.

### 2.2.25 Videomikroskopie

Für videomikroskopische Aufnahmen wurden Embryonen E9.5-E13.5 verwendet. Zeitlich angepaarte Weibchen wurden durch cervicale Dislokation getötet. Der Uterus wurde entnommen und die Embryonen unter einem Stereomikroskop in PB1 präpariert. Alle Manipulationen wurden bei RT durchgeführt. Extraembryonale Hüllen und Amnion wurden entfernt. Jüngere Embryonen (E9.5-E10.5) wurden direkt in  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  2.5% LMP-Agarose in PBS eingebettet, bei Embryonen älter als E10.5 wurde das Gehirn isoliert. Nach Erkalten der Agarose wurde das Gewebe mit einem Vibratom (VT1000S, Leica) geschnitten (PBS, RT, Schichtdicke ca.  $300\text{ }\mu\text{m}$ ). Die Orientierung der Schnittebene war stets orthogonal zur longitudinalen Achse des Neuralrohrs (coronale Schnitte), um später die in radialer Richtung verlaufenden Migrationen optimal verfolgen zu können.

Die Schnitte wurden in Slice-Medium aufgenommen und in eine Laminin-beschichtete POC-Inkubationskammer (Saur) überführt (Einstellungen: Temperatur Deckel  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Temperatur Boden  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die Videomikroskopie wurde an einem inversen Multiphotonmikroskop (Radiance 2100 Multiphoton, Biorad) mit Objektivheizung (Bioptechs; Einstellungen:  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt. Während des Experiments wurde kontinuierlich begast (20%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 75%  $\text{N}_2$ ) und die Gewebeschnitte konstant mit Medium überströmt (zirkulierende Perfusion mit einer peristaltischen Pumpe, Biorad; Einstellung: Stufe 0.5).

Vor Start der Videomikroskopie wurden die Schnitte 2-4 h kultiviert, um eine Adhäsion auf dem Substrat zu ermöglichen. Der Beobachtungszeitraum selbst lag bei 16 h. Aufnahmeparameter wie folgt:  $100\text{ }\mu\text{m}$  Z-Stapel, Abstand der Einzelschnitte 3-10  $\mu\text{m}$ , Auflösung  $256\times 256$ - $521\times 521$  Pixeln, die Scangeschwindigkeit 133-500 lps, Averaging 1-2 Frames, Zeitabstand der Aufnahmen 3-10 min.

Von den Zeitserien der Z-Stapel wurden 4D-Rekonstruktionen errechnet (Software: Volocity, Improvion). Die Zellmigration und Teilungen wurden visuell am Monitor verfolgt, die Trajektorien der Zellkerne manuell vom Monitor auf Overhead-Folien übertragen und ausgewertet. Dabei wurden Zeitpunkt und Position markiert, sobald sich der Zellkern mehr als einen Durchmesser von seiner ursprünglichen Position entfernt hatte. Aus diesen Positions- und Zeitangaben wurden die Geschwindigkeiten berechnet.



### 2.2.26 BrdU-Markierung

Zur Markierung mit BrdU wurden für Puls-Zeiten bis 8 h 1.25 mg BrdU/h intraperitoneal in 1 h Zeitabständen injiziert, bei längeren Puls-Zeiten wurde die gleiche Menge in 2 h Intervallen zugeführt (die Stocklösung war 12.5 mg/ml BrdU in PBS).

### 2.2.27 FACS-Analyse

Blutproben: Blutproben wurden durch Herzpunktur anästhesierter Mäuse entnommen und zur Verhinderung von Koagulation sofort mit 5 mM EDTA versetzt.

Knochenmark: Knochenmark wurde aus dem Oberschenkelknochen mittels einer Kanüle mit eiskaltem PBS + 5 mM EDTA herausgespült.

Die Zellen aus Knochenmark und Blutproben wurden durch 5 min Zentrifugation bei 200g sedimentiert und 2 mal mit PBS gewaschen. Die Zelldichte wurde auf  $5 \times 10^6$ /ml in PBS eingestellt. 200  $\mu$ l Zellsuspension wurden 30 min bei 4°C mit markiertem Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Für CD133 wurde ein  $\alpha$ -Ratte-Cy3-Sekundärantikörper 30 min bei 4°C inkubiert und nochmals mit PBS gewaschen.

Die Zellsuspension wurde mit 2 ml FACS-Lyselösung (BD) versetzt und 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Suspension wurde direkt zur FACS-Analyse eingesetzt. (Nach Stewart & Stewart, 2001).

### 2.2.28 Präparation von esiRNA

$\beta$ -Galaktosidase- und GFP-cDNA wurde durch PCR mit den Primern P29/P30 bzw. P31/P32 aus pSVpaX $\Delta$  bzw. pEGFP-Nuc mit T3- und T7-Promoter-Sequenzen fusioniert. Die cDNAs wurden unter Verwendung des MEGAscript-Kits (Ambion) in ssRNA transkribiert. Nach *annealing* wurden 100  $\mu$ g dsRNA mit 0.2  $\mu$ g RNaseIII 1h bei 20 °C verdaut und nach Zugabe von 5 Volumen PN Puffer (Qiagen) auf eine Qiaquick-Säule geladen. Der Durchlauf, mit ca. 15-40 bp großen Fragmenten dsRNA, wurde mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt, in 70% Ethanol gewaschen und in 1  $\mu$ M EDTA, 10  $\mu$ M Tris/Cl (pH 8.0) aufgenommen (Konzentration: 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l).

### 2.2.29 Elektroporation und *whole embryo culture*

E10 Mäuseembryonen wurden in D-PBS bei RT präpariert. Decidua und Reicherts Membran wurden entfernt und der Dottersack geöffnet. Die Embryonen wurden in einem Agaroseblock fixiert und mit einer Glaskapillare injiziert (Micromanipulator: Narishige MN-153; Pumpe: PV820 World Precision Instruments). Nach intraventrikulärer Injektion mit 0.3-0.6  $\mu\text{l}$  (ca. 1/10 des ventrikulären Volumens des anterioren Neuralrohres) PBS mit 1-4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Plasmid-DNA und 0.1-0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  esiRNA wurden die Embryonen mit fünf 30 V Pulsen (Rechteckspannung von 50 ms Dauer in 1-s Intervallen) elektroporiert (Elektroden: Platin, 7 mm Durchmesser, 1 cm Abstand; Elektroporator: ECM830, BTX) und in 0.5 ml *whole embryo culture*-Medium 24 h in 60% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 35% N<sub>2</sub> kultiviert (Inkubator: Ikemoto; Rotation: 40 U/min; Gasfluss: 50 ml/min).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Generierung *TIS21*-GFP-transgener Mauslinien

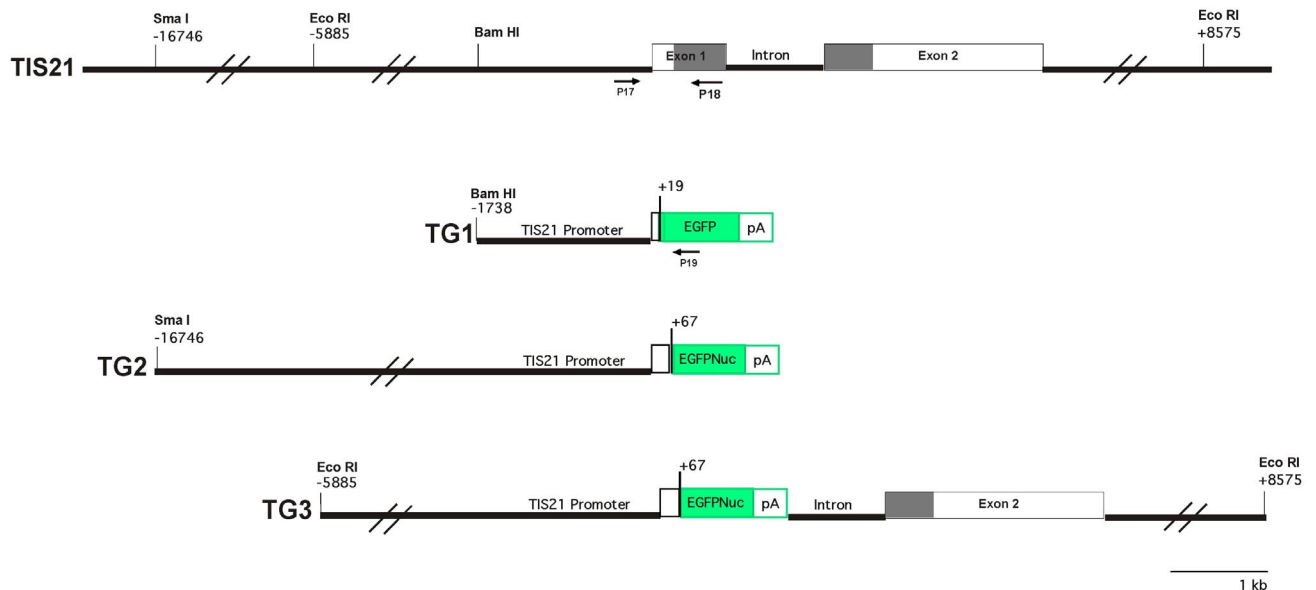
Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist die selektive Markierung von Neurone-generierenden (=TIS21-mRNA-positiven) Neuroepithelzellen durch GFP. Dies kann u.a. durch transgene Mauslinien, die GFP unter der Kontrolle regulatorischer Sequenzen des TIS21-Gens exprimieren, oder durch einen *knock in* von GFP in den TIS21-Genlocus, realisiert werden. Der konventionelle transgene Ansatz ist, insbesondere bei bekannten funktionellen Promotern, die zeitlich schnellere Alternative und wurde parallel zu den in Abschnitt 3.2 beschriebenen, im Ergebnis „sichereren“ *TIS21*-GFP-*knock in*-Ansätzen verfolgt. Im Folgenden steht *TIS21*-GFP für eine funktionelle genomische Sequenz, die GFP unter der Kontrolle des TIS21-Promoters exprimiert und bezieht sich sowohl auf Transgen-Konstrukte als auch *knock in*-Allele. Beide exprimieren GFP unter Kontrolle des TIS21-Promoters - entweder unter dem transgenen oder dem endogenen.

Mit Generierung *TIS21*-GFP-transgener Mauslinien würde man (i) die Expression von GFP in Neurone-generierenden Zellen erreichen und (ii) einen funktionellen Promoter identifizieren, der zur Expression von Genen in dieser Zellpopulation bzw. zum *screening upstream* von TIS21 liegender Gene eingesetzt werden kann (siehe hierzu Abschnitt 4.7).

#### Die Transgene

Für den Erfolg des transgenen Ansatzes ist es wichtig, dass das Transgen möglichst alle regulatorischen Elemente des Markergens enthält. Nur so kann das Reporter gen die Expression des Markers vollständig widerspiegeln. Für TIS21 waren solche Elemente zu Beginn der Arbeit unbekannt. Fletcher *et al.*, 1991 konnten zwar mit den ersten 400 bp 5' zum Transkriptionsstart *in vitro* die Induzierbarkeit des endogenen TIS21-Gens durch Wachstumsfaktoren und Mitogene nachvollziehen. Ein *in vivo* funktioneller TIS21-Promoter war zu Beginn der Arbeit jedoch noch nicht identifiziert. Die Chance, ein *in vivo* funktionelles Transgen zu erhalten, erhöht sich mit der Länge der darin enthaltenen genomischen Sequenzen (Giraldo & Montoliu, 2001). Um einen möglichst großen Abschnitt genomischer Sequenz abzudecken, wurden insgesamt 30 kb 5' und 8 kb 3' genomische Sequenzen des TIS21-Gens kloniert. Aus diesen Sequenzen wurden die Transgene TG1, TG2, und TG3 konstruiert (Klonierung: Abschnitt 2.2.7; Struktur: Abb. 8). In den Transgenen wird die GFP-Expression ausschließlich von genomischen Sequenzen des TIS21-Gens kontrolliert. Dies sollte zu einer möglichst „präzisen“ Reporter gen-Expression führen, auch wenn durch eine Fusion mit starken viralen basalen Promotern eine höhere Expression erzielt werden könnte. TG1 enthält 2 kb 5', TG2 17 kb 5' und TG3 6 kb 5' plus 8 kb 3' genomischer Sequenzen (bezogen auf den TIS21-Transkriptionsstart). Alle Transgene beinhalten den *in vitro* funktionellen, induzierbaren TIS21-Promoter (Fletcher *et al.*, 1991) und codieren für ein ungespleißtes Transkript. Das 3'-Ende

der mRNA wird von einem SV40-Polyadenylierungssignal, nicht von der endogenen TIS21-3'-UTR terminiert.



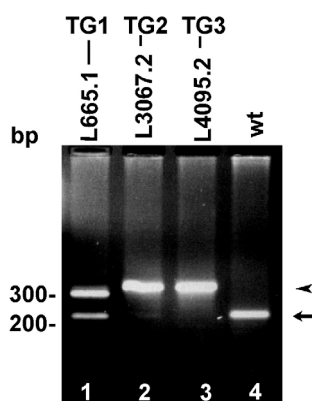
**Abb. 8. Struktur des TIS21-Gens und der TIS21-GFP-Transgene TG1, TG2 und TG3.** Die Transgene exprimieren GFP unter Kontrolle genomischer Fragmente des TIS21-Gens. TG1 codiert für GFP, TG2 und TG3 codieren für GFP mit SV40-Kernlokalisierungssignal (Nuc). In allen Konstrukten wird die Transkription der ungespleißten GFP mRNA durch den basalen TIS21-Promoter initiiert und durch ein SV40-Polyadenylierungssignal (pA) terminiert. TG1 enthält die ersten 19 bp der TIS21-5'-UTR, TG2 und TG3 die vollständige 5'-UTR (67 bp), d.h. nur der TIS21-ORF wurde durch den ORF von GFP ersetzt. (P17, P18, P19: PCR-Primer; offene Leseraster sind gefüllt dargestellt; Angabe der Positionen in bp relativ zum TIS21-Transkriptionsstart).

Vor Generierung der Mauslinien wurde die Expression der Transgene *in vitro* getestet, um zu überprüfen, ob die Expressionslevel prinzipiell für eine spätere Detektion *in vivo* ausreichen. Das ist möglich, da in Zellkultur die Expression von endogenem TIS21 durch Mitogene (z.B. TPA) und Wachstumsfaktoren (z.B. NGF) bzw. Serum induziert werden kann (Bradbury, 1991; Fletcher *et al.*, 1991). Die Transgene sollten deshalb zumindest in Serum-stimuliertem Zustand deutliche GFP-Expression zeigen. Als Testsystem bieten sich Vero-Zellen an: Sie lassen sich einfach und mit hoher Effizienz transfizieren. Für diesen Test ist, bei einem positiven Ergebnis, der Spezies-Unterschied zwischen dem TIS21-Gen aus der Maus und der Vero-Zelllinie aus der grünen Meerkatze irrelevant. Vero-Zellen wurden mit Transgenen transfiziert und nach 24 h auf GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Unter Normalbedingungen (in 10% Serum) zeigten TG1, TG2 und TG3 signifikante GFP-Expression (Daten nicht gezeigt). Auf einen Nachweis der Induzierbarkeit *in vitro*, analog endogenem TIS21, wurde verzichtet. Im Folgenden werden wir aber davon ausgehen, dass die ersten 400 bp dem minimalen induzierbaren TIS21-Promoter entsprechen und diesen, in allen Transgenen enthaltenen Promoter, als *in vitro* funktionell bezeichnen (Fletcher *et al.*, 1991).

### Generierung der transgenen Mauslinien TG1, TG2 und TG3

Die Transgene wurden zur Pronukleusinjektion eingesetzt. Je Konstrukt wurden Embryotransfers in mindestens vier Ammenmütter durchgeführt. Ca. 50% der transferierten Embryonen wurden geboren und genotypisiert. Eine Genotypisierung genomischer DNA der *founder*-Generation repräsentativer Linien für TG1, TG2 und TG3 ist in Abb. 9 gezeigt. In dieser PCR wurde eine Kombination aus drei Primern eingesetzt, die spezifisch das ins Genom integrierte Transgen (P17, P19) und endogenes TIS21 (P17, P18) detektiert. Im Wildtyp wird die TIS21-Bande, in Transgenen zusätzlich die Transgen-Bande amplifiziert. Die in der Arbeit vorgestellten Daten für TG1, TG2, TG3 stammen, soweit nicht anders angegeben, von den in Abb. 9 gezeigten Linien L665.1, L3067.2 und L4095.2.

Insgesamt waren in der *founder*-Generation für TG1 10%, TG2 25%, und TG3 30% der Tiere transgen. Der Anteil transgener Nachkommen entsprach dem Mendelschen Verhältnis - es konnte kein nachteiliger Effekt der Transgene auf die Lebensfähigkeit der Tiere festgestellt werden. Von TG1, TG2 und TG3 transgenen Tieren exprimierten ca. 43%, 46% bzw. 50% GFP. Das Expressionsmuster konnte bei TG1 in 3, bei TG2 in 6 und bei TG3 in 3 unabhängigen Transgen-Integrationen mit Expression untersucht werden. Alle Linien wurden in einem C57Bl6-Hintergrund etabliert.



**Abb. 9. Genotypisierung transgener Mauslinien mittels PCR.** Hier ist je eine repräsentative Linie für TG1, TG2 und TG3 gezeigt: L665.1 (1), L3067.2 (2) bzw. L4095.2 (3). Die PCR (Primer: P17, P18, P19; Abb. 8) detektiert neben den integrierten Transgenen (➤) (318 bp) auch das TIS21-Gen (➡) (211 bp). Abhängig von der Kopienzahl des Transgens wird die Amplifikation der endogenen TIS21-Bande (1) kompetiert: L665.1 hat nur eine integrierte Kopie, die PCR liefert die Bande für TG1 und endogenes TIS21, L3067.2 und L4095.2 sind Multicopy-Integrationen, die Transgen-Bande überwiegt. Die Produkte von TG2 und TG3 sind wegen der längeren 5'-UTR 48 bp größer als das von TG1 (Abb. 8).

### 3.2 Generierung von *TIS21*-GFP-*knock in*-Mauslinien

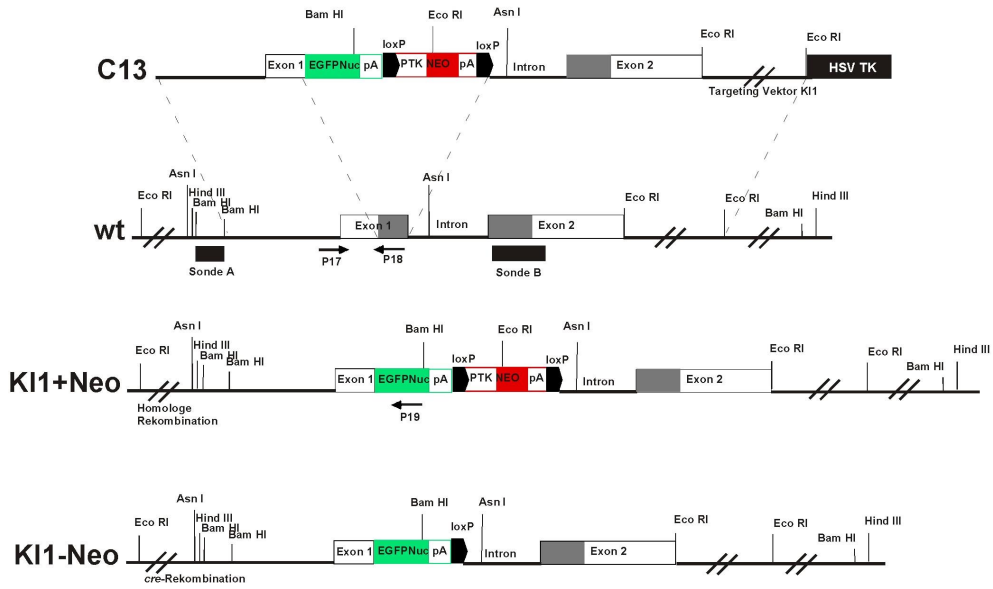
Um GFP in TIS21-mRNA positiven Zellen zu exprimieren, wurde parallel zu dem transgenen Ansatz (Abschnitt 3.1) ein *knock in* von GFP in das TIS21-Gen verfolgt. Durch die Expression von GFP unter Kontrolle des endogenen TIS21-Locus ist dieser Ansatz gegenüber konventionellen transgenen Linien unabhängig von der Kenntnis regulatorischer Sequenzen bzw. deren Existenz in den Transgenen. Der *knock in* ist demnach die „sicherere“, aber auf Grund des erforderlichen *gene targeting* in ES-Zellen auch zeitintensivere Alternative.

Die gene targeting-Strategie

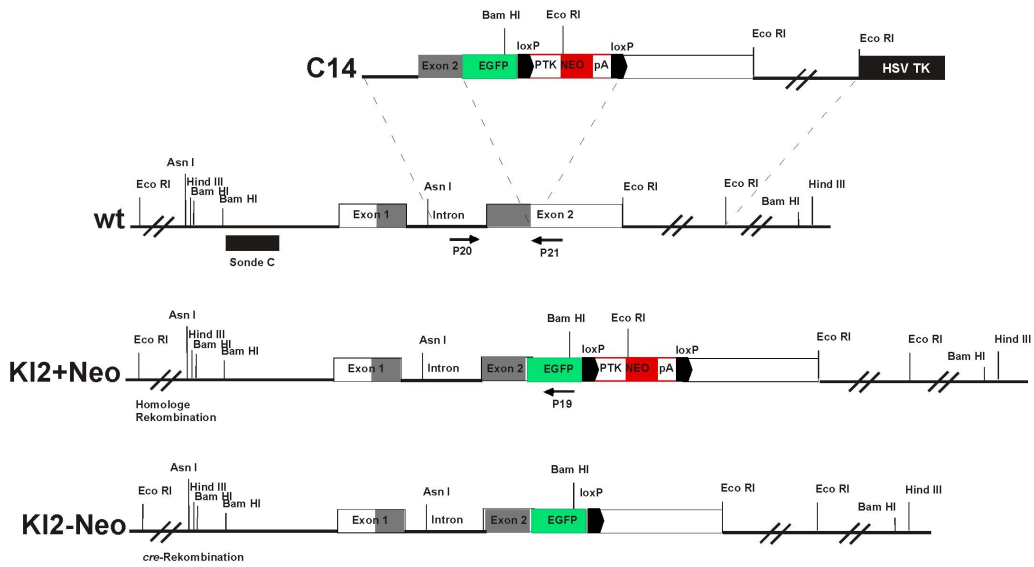
Für den *knock in* eines Reportergens in den Genlocus eines Markers bieten sich drei Möglichkeiten: (i) Ersetzen des ORF des Markers durch den Reporter – hierbei geht das Marker-Genprodukt verloren, d.h. homozygote Tiere entsprechen einem *knock out* für das Marker-Gen, (ii) die Insertion in bzw. anschließend an den ORF des Markers – es entsteht ein Fusionsprotein - und (iii) die Insertion einer IRES-Sequenz zwischen Marker und Reporter – die resultierende bicistronische RNA kann in beide Proteine translatiert werden. Die entsprechenden Varianten für den *knock in* von GFP in den TIS21-Genlocus sind in Abb. 10 dargestellt. Die Targeting-Vektoren C13, C14, C20 ergeben nach homologer Rekombination die *knock in*-Allele KI1, KI2, KI3. KI1 codiert für GFP und entspricht im Homozygoten einem TIS21-*knock out*. KI1 ist deshalb von besonderem Interesse, da ein potentieller *knock out*-Phänotyp funktionelle Daten für TIS21 KI2 liefern könnte. KI2 codiert für ein TIS21-GFP-Fusionsprotein und bietet die Möglichkeit, *in vivo* die Lokalisation des TIS21-Proteins zu verfolgen. KI3 codiert für TIS21 und GFP. In Bezug auf die Expression von GFP sind KI1 und KI3 konzeptionell nicht identisch. Die Transkription der mRNA in KI1 wird durch ein SV40-Polyadenylierungssignal beendet, in KI3 behält das Transkript seine ursprüngliche Struktur, inklusive Intron und TIS21-3'-UTR. Man könnte so einen Effekt der unterschiedlichen mRNA-Strukturen auf das GFP-Expressionsmuster untersuchen. Die von loxP-Sequenzen flankierte Neomycin-Kassette kann mittels *cre*-Rekombination entfernt werden, um eine mögliche Interferenz des in der Kassette enthaltenen Promoters auf die Transkription des modifizierten TIS21-Allels zu eliminieren. Alle Vektoren sind für eine Positiv/Negativ-Selektion ausgelegt. Die Neomycin-Kassette vermittelt G418-Resistenz und ermöglicht eine Selektion auf genomische Integration, die HSV-TK-Kassette auf homologe Rekombination. Bei homologer Rekombination bleibt die Kassette episomal und geht nach kurzer Zeit verloren. Bei nicht-homologer Integration erhöht sie die Sensitivität gegenüber Ganciclovir, hemmt so die Zellteilung und führt letztendlich zu einer Anreicherung homolog rekombinierter Klone.

**Abb. 10. (Seite 64). Strategie des gene targeting in das TIS21-Gen.** Targeting-Vektoren (C13, C14, C20), wt und rekombinierte TIS21-Allele (KI1, KI2, KI3). (A) KI1: GFP mit Kernlokalisierungssignal (Nuc) ersetzt den TIS21-ORF in Exon 1. Das SV40-Polyadenylierungssignal (pA) terminiert die Transkription der ungespleißten mRNA. (B) KI2: GFP wird 3' des TIS21-ORF insertiert. Das entstehende offene Leseraster codiert für ein TIS21-GFP Fusionsprotein. Hierbei wird das TIS21-Stopcodon deletiert und ein 8 AS Ser-Gly-Linker eingefügt. Die mRNA wird analog der wt TIS21-mRNA prozessiert. (C) KI3: 3' des TIS21-ORF wird eine IRES-GFP-Kassette insertiert. Das analog der TIS21-mRNA prozessierte Transkript codiert für TIS21 und GFP mit Kernlokalisierungssignal. Die Vektoren enthalten eine loxP-flankierte Neomycin- (PTK-Neo) und eine HSV-TK-Kassette (HSV-TK). Die Sonden A-C und Primer P17-P21 wurden zur Genotypisierung eingesetzt. (Offene Leseraster sind gefüllt dargestellt. Angabe der Positionen in bp relativ zum TIS21-Transkriptionsstart).

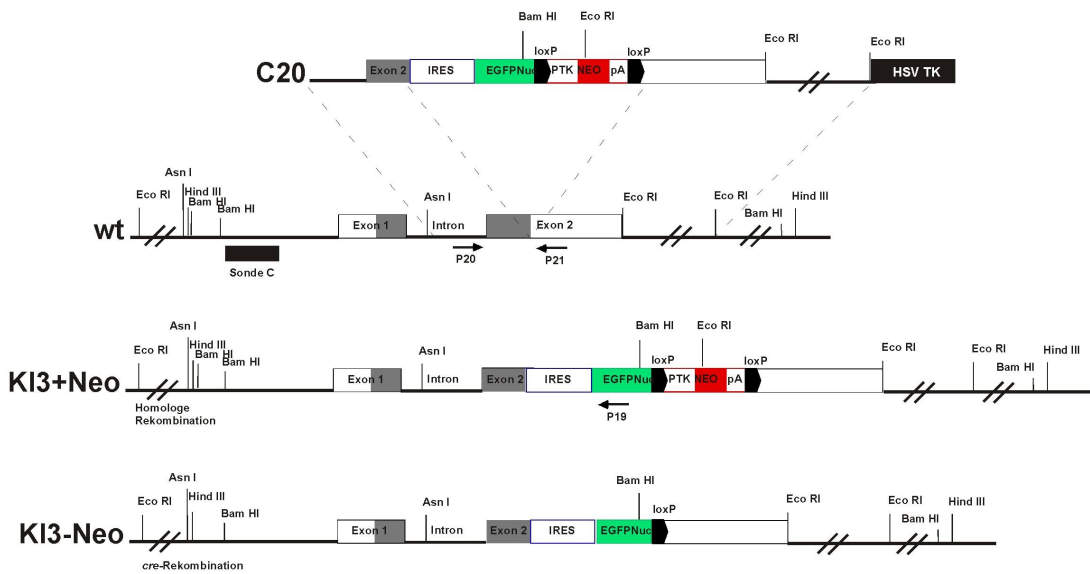
**A**



**B**



**C**



Die Allele KI1, KI2, und KI3 wurden in Zellkultur auf ihre Funktionalität überprüft. C13, C15 und C21 wurden in Vero-Zellen transfiziert und auf die Expression von GFP, *TIS21*-GFP bzw. TIS21 und GFP im Western-Blot ( $\alpha$ -TIS21: 1511-Antikörper;  $\alpha$ -GFP: Clontech) und Immunfluoreszenz ( $\alpha$ -TIS21: K4;  $\alpha$ -GFP: Clontech) untersucht. C15 und C21 entsprechen C14 bzw. C20, jedoch mit komplettem TIS21-Intron, -Exon 1 und basalem Promoter (siehe Abschnitt 2.2.7). Wie erwartet, exprimiert C13 GFP aber kein TIS21-Protein, C15 ein TIS21-GFP-Fusionsprotein und C21 TIS21- und GFP-Protein (Daten nicht gezeigt).

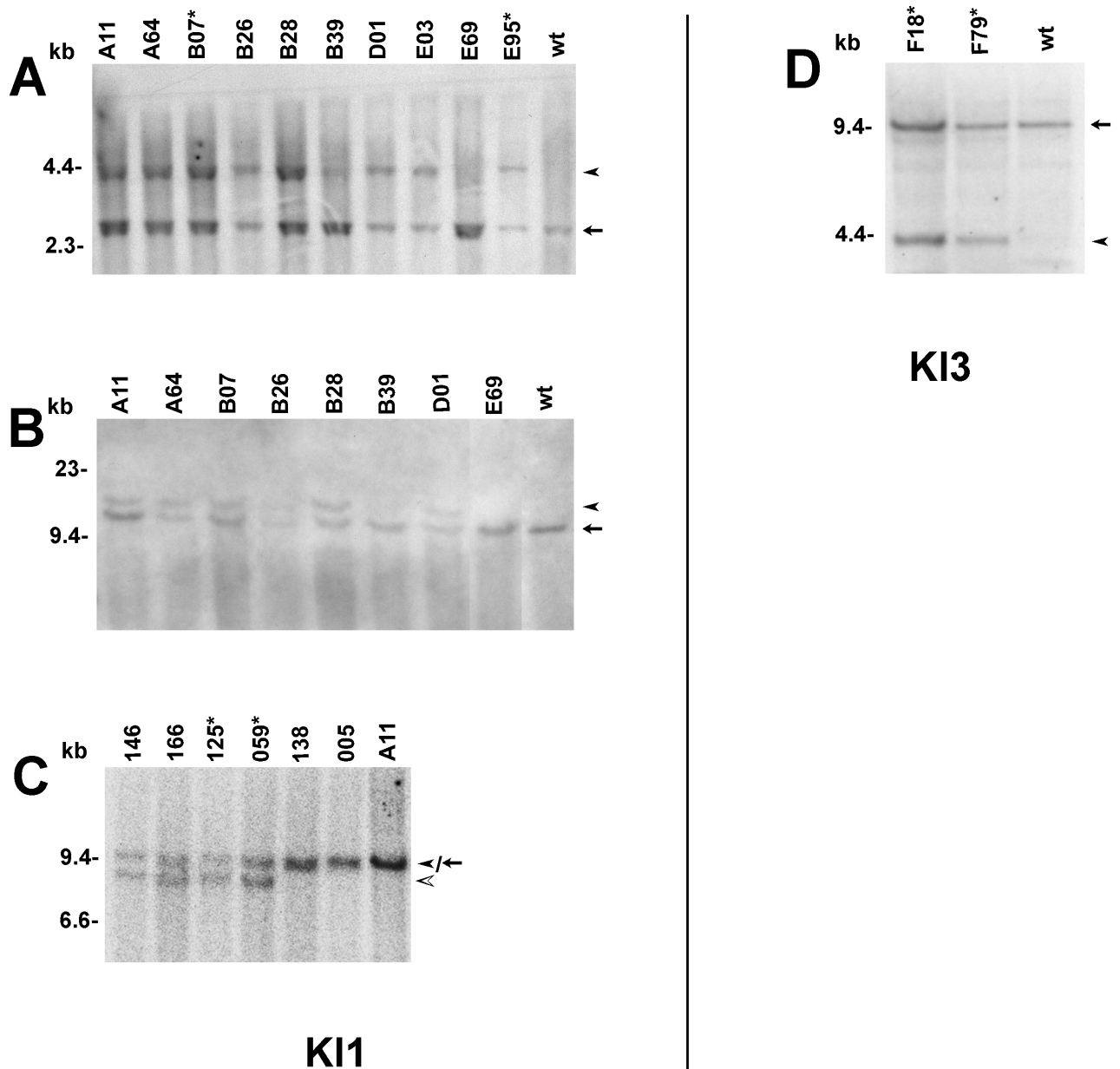
### Homologe Rekombination in ES-Zellen

C13, C14 und C20 wurden in ES-Zellen elektroporiert, C13 in R1-ES-Zellen, C14 und C20 in 129-Tacona-ES-Zellen. Nach Positiv/Negativ-Selektion mit G418 und Ganciclovir wurden ES-Zellklone isoliert und mit PCR und Southern-Blot auf homologe Rekombination untersucht.

### KI1

Von 500 Klonen konnten acht positive identifiziert werden (Abb. 11). Die erfolgreiche Rekombination über beide homologen Arme der Targeting-Vektoren wurde durch Restriktion mit *Asn I* und Detektion mit Sonde A überprüft (Abb. 11A & 11B: Klone A11, A64, B07, B26, B28, D01 & E95). Klon A11 wurde *in vitro* einer *cre*-Rekombination unterzogen. Nach Elektroporation mit einem *cre*-Expressionsplasmid wurden die Klone ausgewählt, die auf Grund der verlorenen Neomycin-Resistenz G418 sensitiv wurden. Die Exzision der Neomycin-Kassette konnte im Southern-Blot bestätigt werden (Abb. 11C: Klone 146, 166, 125 & 059). Die Klone 125, 59, B7 und E95 wurden in C57Bl6 Blastocysten injiziert. Die Rate der hoch-chimären Tiere (90% und mehr) lag bei 71%. Die Tiere waren zu 100% männlich. Die hoch-chimären Männchen wurden mit C57Bl6 gekreuzt. Eine Keimbahn-Transmission konnte für alle Klone in der ersten Verpaarung erreicht werden (siehe beispielhaft einen Southern-Blot F2-Generation, Abb. 12). Zur schnellen Detektion eines TIS21-*knock out*-Phänotyps wurden heterozygote Tiere der F1-Generation miteinander verpaart. Abb. 12 zeigt auch: TIS21-homozygote Tiere sind lebensfähig – zum TIS21-*knock out* mehr in den Abschnitten 3.12, 3.13 & 3.15. Die im weiteren Verlauf der Arbeit vorgestellten Daten für KI1 wurden aus den Linien LE95 bzw. L125 gewonnen. Um einen milden *knock out*-Phänotyp zu detektieren, wurde zur Homogenisierung des genetischen Hintergrunds mit C57Bl6-Mäusen rückgekreuzt. Der Anteil an wt, hetero- und homozygoten Nachkommen entsprach den Mendelschen Verhältnissen.





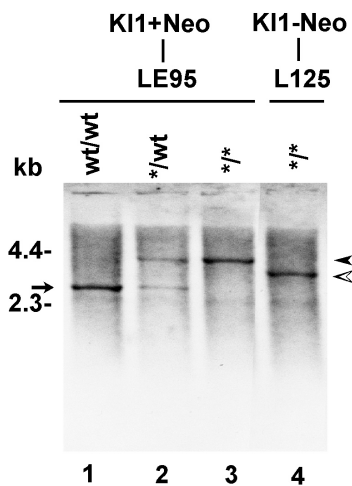
**Abb. 11. Homologe Rekombination in ES-Zellen. Southern-Blot genomischer DNA.** (A-C) KI1: C13 ist in den TIS21-Locus integriert und unterließ eine *cre*-medierte Rekombination *in vitro*. (A) Asn I-Restriktion und Detektion mit Sonde A (Abb. 10) zeigen eine erfolgreiche Rekombination 5' des heterologen Bereiches (wt: 2683 bp, →; KI1+Neo: 4833 bp, >). (B) Hind III-Restriktion und Detektion mit Sonde C zeigen (i) eine erfolgreiche Rekombination 5' und 3' der heterologen Sequenzen und (ii) die Integration als Einzelkopie (wt: 13127 bp; KI1+Neo: 15274 bp). Die Klone B39 und E69 sind nicht homolog rekombiniert, der Vektor ist an unbestimmter Stelle ins Genom integriert. Von den ES-Klonen A11, B07 und E95 wurden Mauslinien etabliert. Aus Klon A11 wurde *in vitro* vor Injektion die Neomycin-Kassette durch *cre*-vermittelte Rekombination entfernt (C). (C) Bam HI-Restriktion und Detektion mit Sonde B von A11 vor und den A11-Subklonen 146-005 nach Exzision der Neomycin-Kassette (wt: 10120 bp; KI1+Neo: 10316 bp; KI1-Neo: 9146 bp, >). (Die MW-Differenz zwischen wt und KI1+Neo kann hier nicht aufgelöst werden). (D) KI3: C20 ist homolog in den TIS21-Locus rekombiniert: Bam HI-Restriktion und Detektion mit Sonde C zeigt eine erfolgreiche Rekombination 5' des heterologen Bereichs der Klone F18 und F78 (wt: 10120 bp; KI3+Neo 4229 bp, >). Mit (\*) markierte Klone wurden in Blastocysten injiziert. Die Lage der Sonden ist in Abb. 10 angegeben.

## KI2

In 300 Klonen konnte kein homolog rekombinierter Klon identifiziert werden.

KI3

Von 300 Klonen konnten zwei homolog rekombinierte Klone identifiziert werden. Die erfolgreiche Rekombination wurde durch Restriktion mit Bam HI und Detektion mit Sonde C überprüft (Abb. 11D: Klon F18, F79). Die Blastocysteninjektion lieferte 46% hoch-chimäre Tiere. Von beiden Klonen konnte eine Keimbahn-Transmission erreicht werden. (Auf eine Charakterisierung dieser Mäuse wurde in dieser Arbeit verzichtet, da mit dem *knock in* KI1 eine funktionelle Reporterlinie generiert werden konnte).



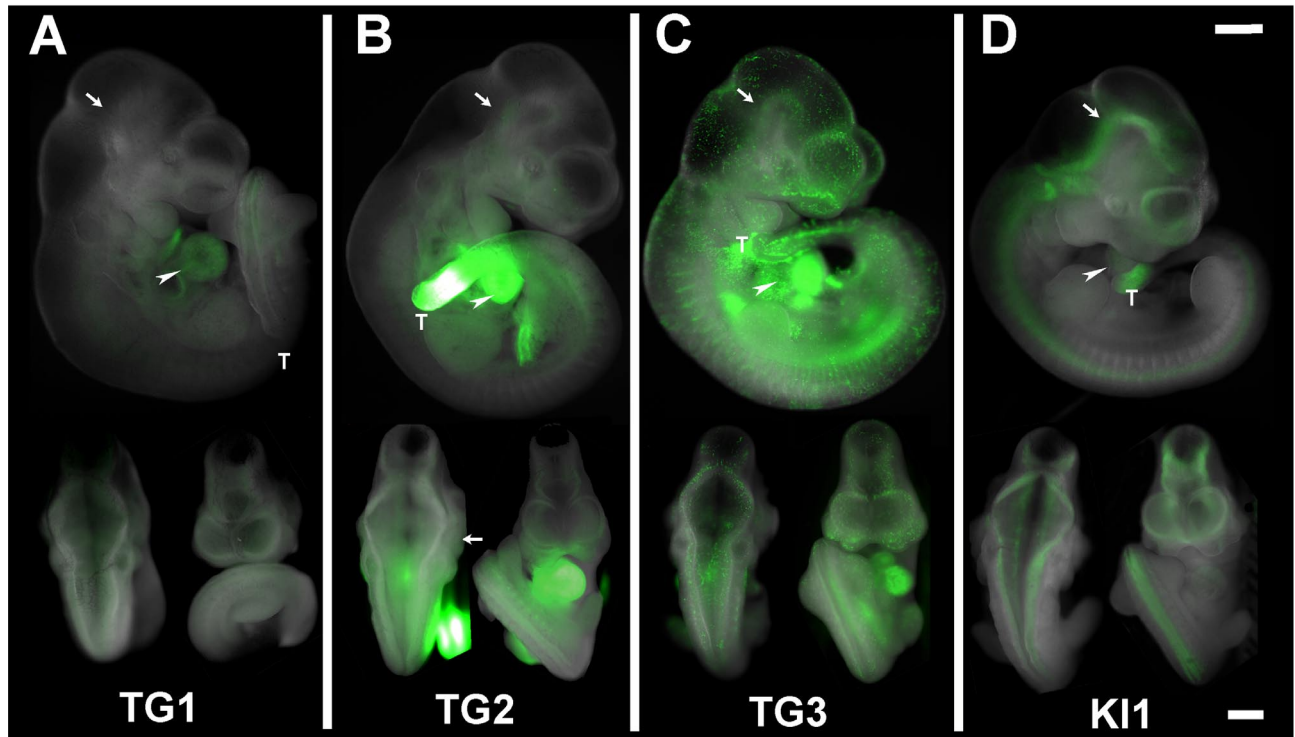
**Abb. 12. Keimbahn Transmission der rekombinierten KI1-Allele.** Southern Blot genomischer DNA der F2 Generation der Linien LE95 (KI1+Neo, 1-3) und L125 (KI1-Neo, 4) nach *Asn I* Restriktion und Detektion mit Sonde A (wt: 2683 bp, →; KI1+Neo: 4833 bp, > ; KI1-Neo: 3663 bp, >>). In der hier gezeigten Genotypisierung der adulten F2 Generation gibt es auch homozygote Tiere (3, 4) (siehe hierzu Abschnitt 3.10, 11, 13).

**3.3 TG1, TG2, TG3 und KI1 exprimieren GFP *in vivo***

Die Expressionsmuster wurden generell an heterozygoten Tieren aus Kreuzungen mit C57Bl6 wt untersucht. (Ausnahme: KI1-homozygote Tiere in den Abschnitten 3.12, 3.13 & 3.15 sind Kreuzungen innerhalb der *knock in*-Linien mit 50% 129/50% C57Bl6-Hintergrund).

Wie erwähnt, exprimieren die *TIS21*-GFP-Allele TG1, TG2, TG3 und KI1 GFP *in vitro*. Exprimieren Transgene und *knock in* auch *in vivo*? Um die Frage nach genereller GFP-Expression zu klären, bietet sich eine Untersuchung der embryonalen Expression bei E10.5 an. Zu diesem Zeitpunkt ist *TIS21* im Embryo exprimiert (Iacopetti *et al.*, 1994; Iacopetti *et al.*, 1999). Embryonen der *TIS21*-GFP-Linien sollten demnach GFP exprimieren. In *wholemout*-Fluoreszenzbildern von E10.5 Embryonen wird deutlich: (i) TG1, TG2, TG3 und KI1 exprimieren GFP *in vivo* und (ii) die Expression unterscheidet sich qualitativ (Abb. 13A-D). Alle Transgene exprimieren in zumindest einer Region. Demnach ist der Promoter in seiner Eigenschaft überhaupt zu exprimieren *in vivo* funktionell. Im Fall des *knock in* ist der Expressionslevel des *TIS21*-Gens in Kombination mit der GFP-Expressions-kassette ausreichend, um GFP *in situ* zu detektieren. Im Vergleich von Embryonen der Linien E95 und 125 erreicht KI1 ohne Neomycin-Kassette (=Klon 125) eine deutliche höhere Expression als KI1 mit Neomycin-Kassette (=Klon E95) (Daten nicht gezeigt). Offenbar wirkt sich die Neomycin-Kassette negativ auf die, vom endogenen *TIS21*-Promoter getriebene Transkription

von GFP aus. Alle weiteren Daten zu KI1 beziehen sich daher auf Linie L125, d.h. auf KI1 ohne Neomycin-Kassette.



**Abb. 13. TG1, TG2, TG3 und KI1 exprimieren GFP *in vivo* unterschiedlich.** GFP-Expression (grün) im *wholemout* heterozygoter Embryonen (E10.5) in lateraler (oben), dorsaler (unten links) und ventraler Ansicht (unten rechts). Im *wholemout* sollte die Expression im ventralen Neuralrohr (→), Herz (►) und *tailbud* (T) erkennbar sein – das Signal in anderen Expressionsdomänen (siehe Tab. 3 & 4) ist aus technischen Gründen nicht zu detektieren. (A) TG1: die Expression ist auf das Herz beschränkt. (B) TG2 exprimiert schwach im Neuralrohr, im Herz und deutlich im *tailbud*. (C) TG3 exprimiert entlang des Neuralrohres, im Herz und nicht im *tailbud*. Auffällig ist die starke Expression in Endothelzellen der Blutgefäße. (D) KI1 exprimiert im Neuralrohr, (schwach) im Herz und im *tailbud*. (A-D jeweils gleiche Vergrößerungen; Balken in D: 500  $\mu$ m, laterale bzw. ventrale und dorsale Ansicht in unterschiedlichen Vergrößerungen).

### 3.4 TG1, TG2, TG3 und KI1 zeigen Unterschiede im Expressionsmuster

Der Vergleich der GFP-Expression von TG1-, TG2-, TG3- und KI1-Linien mit der endogenen TIS21-mRNA bzw. der Linien untereinander zeigt (i) die unterschiedlichen Expressionsmuster der TIS21-GFP Allele und lässt (ii) Vermutungen über Existenz und Lage regiospezifischer *enhancer*-Elemente im TIS21-Gen zu.

Für alle Vergleiche der Expression von GFP mit dem TIS21-Transkript (Abschnitt 3.4-3.7) gilt: Sowohl das TIS21-Protein als auch GFP haben eine längere Halbwertszeit als die TIS21-mRNA (siehe hierzu Abschnitt 4.1). Die endogene TIS21-mRNA ist, als Marker für Neurone-generierende Neuroepithelzellen, entlang des Neuralrohres in Rückenmark und Gehirn entsprechend den a/p und d/v Gradienten der Neurogenese exprimiert (Iacopetti *et al.*, 1994; Iacopetti *et al.*, 1999). Neurone-

generierende Abschnitte des Neuralrohres sind durch die Existenz von jungen Neuronen (identifiziert durch die Expression von  $\beta$ -III-Tubulin, einer Neurone-spezifischen Isoform des  $\beta$ -III-Tubulin-Gens) (Banerjee *et al.*, 1990) in der Ventrikularzone bzw. den neuronalen Schichten zu erkennen. Innerhalb dieser Zonen aktiver Neurogenese ist die TIS21-mRNA-Expression auf Neuroepithelzellen begrenzt – Neurone exprimieren die TIS21-mRNA nicht. Junge Neurone wandern radial in basaler Richtung aus der Ventrikularzone in die neuronalen Schichten - die Mehrheit der  $\beta$ -III-Tubulin-positiven Zellen in den neuronalen Schichten ist demnach örtlich von deren GFP-positiven Vorläuferzellen in der Ventrikularzone getrennt. Deshalb sollte (i) GFP überwiegend in der Ventrikularzone, nicht aber in neuronalen Schichten exprimiert sein und (ii) die GFP-Expression in der Ventrikularzone räumlich und zeitlich mit  $\beta$ -III-Tubulin-Immunoreaktivität in den radial angrenzenden neuronalen Schichten korrelieren (bzw. dieser zeitlich um einen Zellzyklus vorausseilen).

In den in Abb. 13-15 dargestellten Stadien ist die endogene TIS21-mRNA, entsprechend des Fortschritts der Neurogenese in diesem Stadium im ZNS bei E10.5 in der Ventrikularzone des ventralen Neuralrohrs, bei E13.5 im Riechepithel, in der Retina und in der Ventrikularzone von Mes-/Metencephalon, Diencephalon, Telencephalon und im Riechepithel (Michelini, 2000) und der Retina (Iacopetti *et al.*, 1994) exprimiert. Andere, nicht neuroepitheliale Expressionsdomänen mit TIS21-Genaktivität sind Herz, Blutzellen und *tailbud* (in dieser Arbeit gezeigt<sup>5</sup>).

In Abb. 13-15 wird das unterschiedliche GFP-Expressionsmuster der transgenen und *knock in*-Linien deutlich. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand gibt die *knock in*-Linie die Expression der endogenen TIS21-mRNA sehr gut wieder und kann somit allgemein zum Vergleich herangezogen werden.

### TG1

TG1 exprimiert nicht im Neuralrohr und nicht in der Retina (Abb. 14K, 15A, 15E, 15K, 15O & 15S), aber im Riechepithel (Abb. 14E) und im Herz (Abb. 13A & 14A).

### TG2

TG2 exprimiert im Neuralrohr in vereinzelt Zellen im ventralen Rückenmark (Abb. 15B), stark im ventralen Mes-/Metencephalon (in Abb. 13B schlechter, in Abb. & 15F besser zu sehen) aber nicht in Di- und Telencephalon (Abb. 15L, 15P & 15T). Die Expression in Mes-/Metencephalon ist hier auf Neuroepithelzellen der Ventrikularzone und junge, in die neuronalen Schichten migrierende Neurone begrenzt (Abb. 15F). Die Expression schließt auch Riechepithel (Abb. 14F) und vereinzelt

---

<sup>5</sup> Einige der embryonalen und adulten Expressionsdomänen waren vor dieser Arbeit unbekannt und wurden aus dem Expressionsmuster von KI abgeleitet (Tab. 3, 4 & 7). Wie im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt, korreliert die Expression von KI sehr gut mit der von endogenem TIS21. Dabei gelten die in Abschnitt 4.1 diskutierten Einschränkungen.

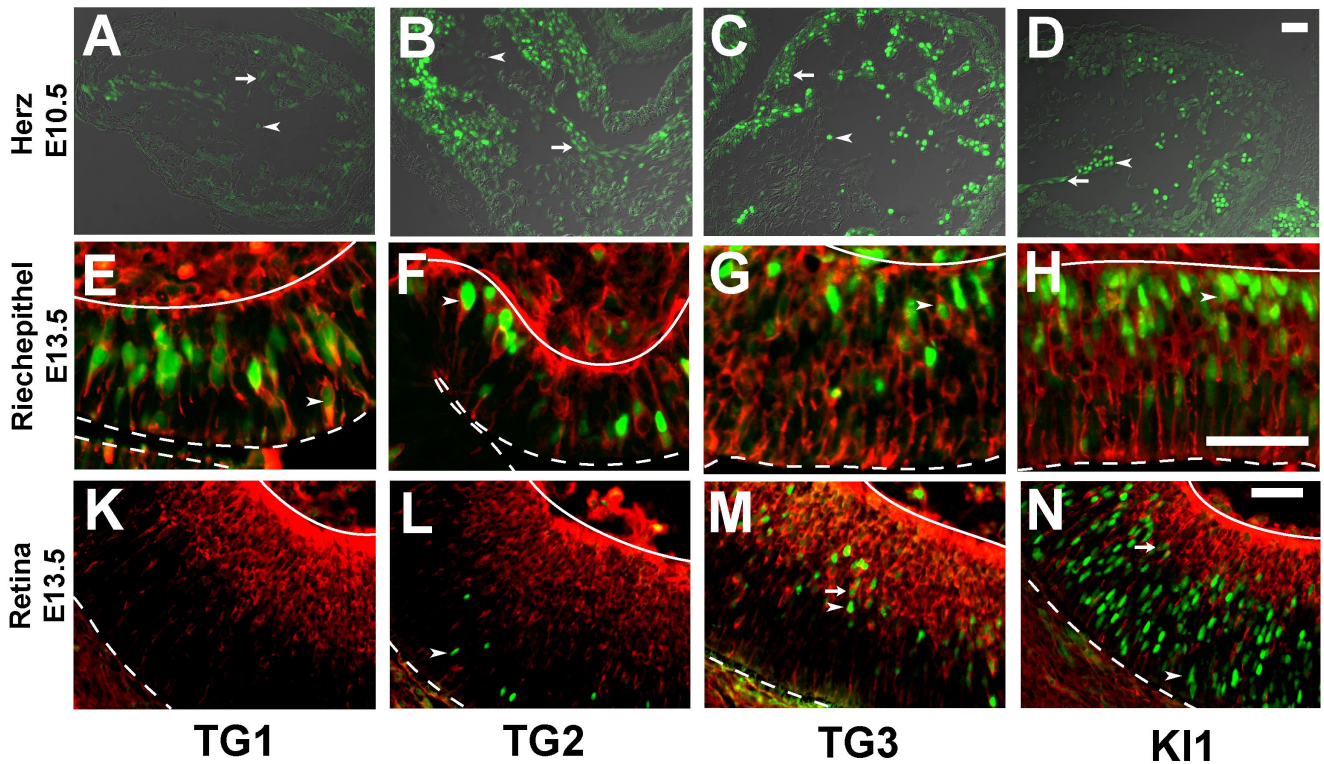
Zellen in der Retina (Abb. 14L) ein. GFP-Expression ist auch in Herz und *tailbud* (Abb. 13B & 14B) detektierbar.

### TG3

TG3 ist im Neuralrohr, im lateralen Rückenmark (Abb. 15C), im Mes-/Metencephalon (schlechter in Abb. 13C, besser in Abb. 15G zu sehen), in Diencephalon (Abb. 15M) und anterior bis ins mediale Telencephalon (Abb. 15Q) exprimiert. Das laterale Telencephalon ist negativ (Abb. 15U). Innerhalb positiver Regionen des ZNS ist die Expression auf Neuroepithelzellen in der Ventrikularzone begrenzt. Teilweise werden auch die TIS21-Expressionsdomänen im Riechepithel (Abb. 14G) und in der Retina (Abb. 14M) abgedeckt. Herz und Blutzellen exprimieren GFP (Abb. 13C & 14C). Der *tailbud* ist negativ (Abb. 13C).

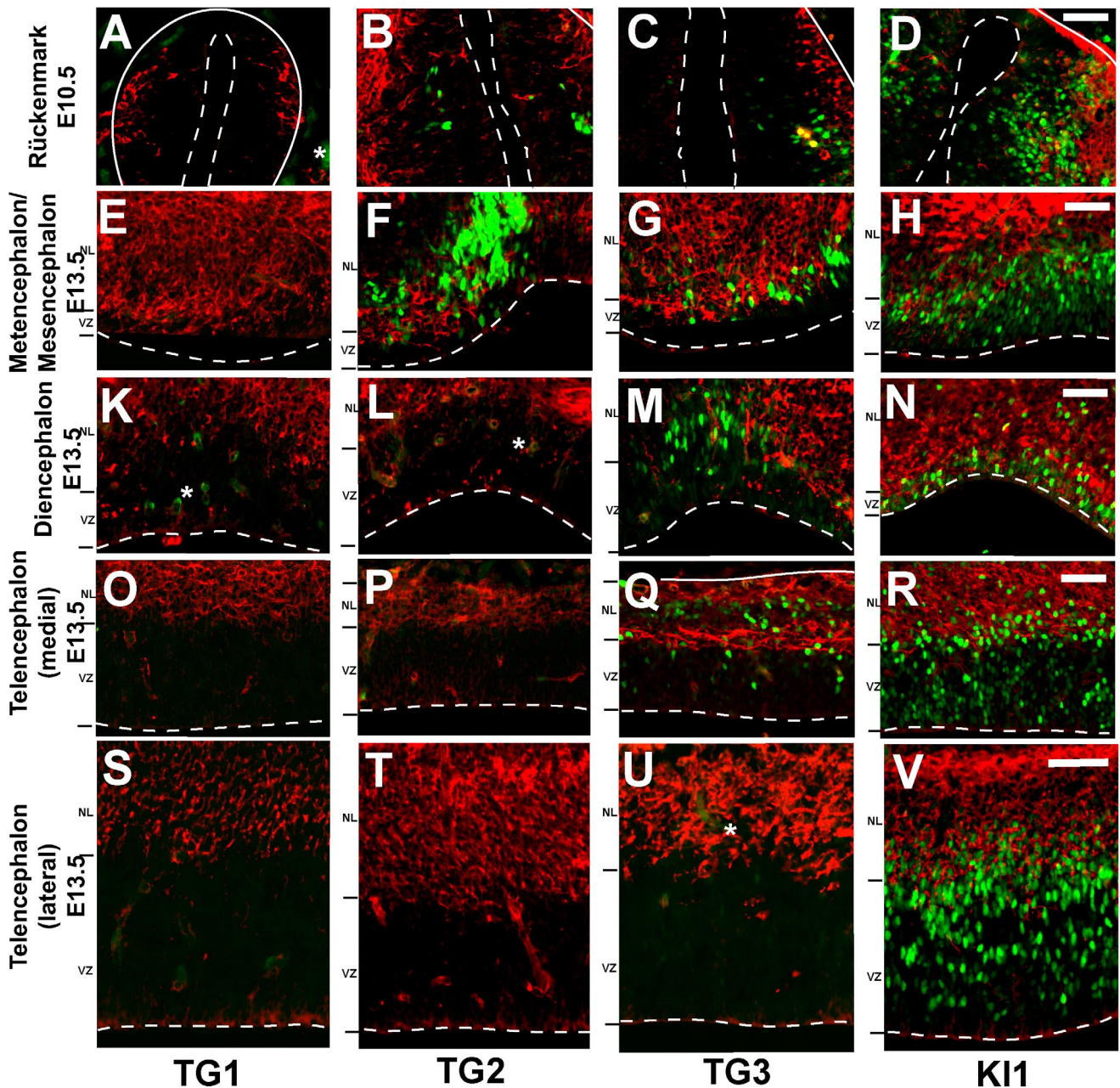
### KI1

Die Expression von KI1 ist mit dem bekannten TIS21-Expressionmuster nahezu identisch. Im *wholemout* zeigt sich die Expression im ventralen Neuralrohr als GFP-positiver Streifen, der sich vom Rückenmark bis ins Telencephalon erstreckt (Abb. 13D). Im Rückenmark (Abb. 15D), Met-/Mesencephalon (Abb. 15H), Diencephalon (Abb. 15N), medialem und lateralem Telencephalon (Abb. 15R & V) ist GFP in der Ventrikularzone exprimiert. Die Expression verliert sich in den neuronalen Schichten. Neben dem Neuralrohr wird GFP auch in anderen Neurone-generierenden Systemen exprimiert: in der basalen Hälfte des Riechepithels (Abb. 14H) und in der Retina (Abb. 14N). Herz, Blutzellen und *tailbud* sind ebenfalls positiv (Abb. 13D & 14D).



**Abb. 14. Expression von TG1, TG2, TG3 und KI1 in embryonalen Organen.** GFP-Expression (grün) in Kryostatschnitten heterozygoter Embryonen durch (A-D) Herz (E13.5), (E-H) Riechepithel (E13.5), (K-N) Retina (E13.5). In neuronalen Geweben (E-N) wurden Neurone durch Immunhistochemie gegen  $\beta$ -III-Tubulin markiert (rot). TG1 exprimiert in Myocardzellen (A) ( $\rightarrow$ ), in olfaktorischen Neuronen (E) ( $\triangleright$ ) aber nicht in der Retina (K). TG2 exprimiert in Myocardzellen (B), regional begrenzt in Subpopulationen olfaktorischer Neurone (F) und vereinzelt in Neuroepithelzellen der Retina (L) ( $\rightarrow$ ). TG3 exprimiert in Myocardzellen (C), regional begrenzt in Subpopulationen olfaktorischer Neurone (G) und vereinzelt in Neuroepithelzellen und Neuronen der Retina (M). KI1 exprimiert in Myocardzellen (D), in basalen Zellen des ganzen olfaktorischen Epithels, darunter auch in Subpopulationen olfaktorischer Neurone (H) und in Subpopulationen von Neuroepithelzellen und Neuronen in der Retina (N). TG3 und KI1 exprimieren in Blutzellen, TG1 und TG2 nicht (A-D) ( $\triangleright$ ). GFP und  $\beta$ -III-Tubulin Färbung sind subzellulär nicht identisch (GFP: Kern;  $\beta$ -III-Tubulin: Cytoskelett), d.h. die Fluoreszenzsignale einer für beide Marker positiven Zelle sind niemals kongruent, vielmehr weisen solche Zellen ein grünen Kern auf, umgeben von rotem Cytoplasma. ( --- apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; A-D, E-H, K-N jeweils gleiche Vergrößerung; Balken in D, H, N: 50  $\mu$ m).





**Abb. 15. Expression von TG1, TG2 , TG3 und KI1 in Neurone-generierenden Bereichen des embryonalen ZNS.** GFP-Expression (grün) in horizontalen Kryostatschnitten heterozygoter Embryonen mit immunohistochemischer Färbung gegen  $\beta$ -III-Tubulin (rot) durch (A-D) Rückenmark (E10.5), (E-H) Mes-/Metencephalon (E13.5), (K-N) Diencephalon (E13.5), (O-R) mediales und (S-V) laterales Telencephalon (E13.5). TG1 exprimiert nicht im Neuroepithel des ZNS (A, E, K, O, S). Die Expression von TG2 ist auf Mes-/Metencephalon und wenige Zellen des Rückenmarks begrenzt (B, F, L, P, T). TG3 exprimiert in ventralen bzw. medialen Arealen des Neuralrohrs, nicht im lateralen Telencephalon (C, G, N, Q, U). KI1 wird analog endogenem TIS21 in sämtlichen Neurone-generierenden Bereichen des Neuralrohrs exprimiert (D, H, N, R, V). Neurone entstehen aus Neuroepithelzellen in den germinalen Schichten des Neuroepithels. In Neurone-generierenden Abschnitten korreliert demnach die TIS21-mRNA- und also auch GFP-Expression in Neuroepithelzellen der Ventrikularzone (VZ) radial mit  $\beta$ -III-Tubulin Immunoreaktivität in den basal zur Ventrikularzone gelegenen neuronalen Schichten (NL). (\*Endothelzellen; ---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; A-R, S-V jeweils gleiche Vergrößerung; Balken in D, H, N, R, V: 50  $\mu$ m).

Das embryonale und adulte (soweit bekannt) Expressionsmuster der *TIS21*-GFP-Allele im Vergleich zu endogenem TIS21 ist in Tab. 3 & 4 zusammenfassend dargestellt. Die Daten zur Expression im Neuralrohr konnten (teilweise) für TG1 (n=3), TG3 (n=6) und KI1 (n=3) in unabhängigen Linien

reproduziert werden. Es fällt, insbesondere entlang des Neuralrohrs, die von TG1 zu KI1 sukzessive Ausdehnung der Expressionsdomänen entlang der a/p und d/v Achse auf (Tab. 3 & 4).

**Tab. 3. Embryonale Expressionsmuster von TG1, TG2, TG3 und KI1 im Vergleich mit endogener TIS21-mRNA.**

Organ	TG1	TG2	TG3	KI1	TIS21	Literatur
Telencephalon	-	-	+(a)	+	+	Iacopetti <i>et al.</i> , 1994
Diencephalon	-	-	+	+	+	
Mesencephalon	-	+(b)	+(d)	+	+	
Rhombencephalon	-	+(b)	+(d)	+	+	
Rückenmark	-	+(c)	+(d)	+	+	
Retina	-	+(e)	+(e)	+	+	
Riechepithel	+	+	+	+	+	Michelini, 2000
Cerebralganglien	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	Iacopetti <i>et al.</i> , 1994 Wang <i>et al.</i> , 1997
DRG	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	Iacopetti <i>et al.</i> , 1994
Herz	+	+	+	+	n.d.	-
Leber	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	Iacopetti <i>et al.</i> , 1994
Tailbud	-	+	-	+	n.d.	-
Blut	-	-	+	+	n.d.	-

(n.d.: nicht bestimmt; a: beschränkt auf mediale Bereiche; b: beschränkt auf ventrale Bereiche; c: vereinzelte Zellen ventral; d: beschränkt auf ventrale und laterale Abschnitte; e: vereinzelte Zellen; Daten aus E10.5-E13.5).

**Tab. 4. Expression von TG1, TG2, TG3, KI1 und endogener TIS21-mRNA im zentralem Nervensystem.**

Organ	Zelltyp	TG1	TG2	TG3	KI1	TIS21	Literatur
Neuralrohr	NE	-	+	+	+	+	Iacopetti <i>et al.</i> , 1994
	Neurone (a)	-	+	+	+	-	
	Neurone (b)	-	-	-	-	-	
Retina	NE	-	+(c)	+(c)	+	+	Michelini, 2000
	Neurone (d)	-	-	-	+	-	
Riechepithel	Vorläuferzellen	-	+	+	+	+	Wang <i>et al.</i> , 1997
	Neurone (d)	+	+	+	+	-	
Cerebralganglien	neuronale Zellen (e)	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	-
	Neurone (d)	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	
DRG	neuronale Zellen (e)	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	-
	Neurone (d)	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	

(n.d.: nicht bestimmt; NE: Neuroepithelzellen; a: junge Neurone, die TIS21-Protein und GFP aber keine TIS21-mRNA enthalten sollten (siehe hierzu Abschnitt 3.6); b: ältere Neurone in den neuronalen Schichten im embryonalen ZNS bzw. im adulten Gehirn; c: vereinzelte Zellen; d: eine Subpopulation vermutlich junger Neurone; e:  $\beta$ -III-Tubulin negative Zellen; Daten aus E10.5-E13.5 bzw. adulten Tieren).

Die qualitativen Unterschiede im Expressionsmuster von TG1, TG2, TG3 und KI1 sind auf das Fehlen regulatorischer Elemente in den Transgenen, die eine regiospezifische Expression *in vivo* steuern, zurückzuführen. Diese Elemente sind nicht mit dem *in vitro* induzierbaren, basalen Promoter identisch. Sonst müssten alle Transgene das volle TIS21-mRNA-Expressionsmuster abdecken (siehe Abschnitt 4.5).



### 3.5 Die Expression von TG2, TG3 und KI1 korreliert mit den Gradienten der Neurogenese

Die Expression der TIS21-mRNA korreliert mit den Gradienten der Neurogenese (Iacopetti *et al.*, 1994). Gleiches wird für die Expression von GFP in den TIS21-GFP-Linien erwartet, sofern sie das Expressionsmuster der endogenen TIS21-mRNA reflektieren. Ein direkter Vergleich mit den Gradienten der Neurogenese, wie sie durch neuronale Marker beschrieben werden, erscheint deshalb sinnvoll.

Die Neurogenese verläuft im ZNS näherungsweise in posterior-anterioren und ventro-dorsalen Gradienten. Die Neurogenese beginnt und endet in posterioren und ventralen Arealen früher, in anterioren und dorsalen später. Die Neurogenese beginnt bei E8.5 im ventralen Rückenmark, erreicht über Rhomb-, Mes-, Diencephalon das dorsale Telencephalon und endet dort bei E17. Das Umschalten von Proliferation zu Neurogenese geschieht zwischen E8.5-E10.5 entlang der a/p und von E8.5-E11.0 entlang der d/v Achse des Neuralrohres, d.h. bei E11.0 hat die Neurogenese das ganze Neuralrohr erfasst (siehe Tab. 5).

**Tab. 5. Gradienten der Neurogenese.**

Stadium	Fortschritt in a/p Achse	Fortschritt in d/v Achse
E8.5	ventrales Mesencephalon ventrales Rhombencephalon	
E9.0	ventrales cervicales Rückenmark	
E9.5	Diencephalon (prä- und postoptischen Kommissur)	
E10.0	posteriores Rückenmark	dorsales Mesencephalon dorsolaterales Rückenmark
E10.5	anteriores Telencephalon	dorsales Rückenmark
E11.0		dorsales Telencephalon

Diese Übersicht bezieht sich auf das Auftreten der ersten Neurone, also das Einsetzen der Neurogenese in einem bestimmten Areal und nicht den *peak*, der in später differenzierenden Strukturen relativ später erreicht wird: Im dorsalen Telencephalon z.B. beginnt die Neurogenese bei E11 und erreicht erst bei E16 das Maximum (siehe Abb. 3A). (Zur den neurogenetischen Gradienten siehe: McConnell & Sechrist, 1976; Nornes & Carry, 1978; McConnell & Sechrist, 1980; McConnell, 1981; Gardette *et al.*, 1982; Altman & Bayer, 1991; Oback, 2000).

Die Korrelation von GFP-Expression und Neurogenese wurde bei E10.5 in der a/p (Abb. 16) bzw. der d/v Achse (Abb. 17) in saggitalen und horizontalen Kryostatschnitten untersucht. Neurone wurden durch Immunhistochemie gegen  $\beta$ -III-Tubulin identifiziert. GFP sollte in Neuronengenerierenden und nicht in (noch) proliferierenden Abschnitten des Neuralrohres exprimiert werden.

Da TG1 keine Expression im Neuroepithel aufweist (siehe Abschnitt 3.4 , Tab 3 & 4), wird im Folgenden nur auf TG2, TG3 und KI1 eingegangen. Entsprechend der regionalen Unterschiede in der Expression von TG2 und TG3 (Abschnitt 3.4) ist nicht zu erwarten, dass die GFP-Expression den neurogenetischen Gradienten vollständig erfasst.

Interessant ist die Frage, ob trotz fehlender regulatorischer regiospezifischer Elemente innerhalb einer positiven Region GFP korrekt, d.h. entsprechend neurogenetischer Gradienten exprimiert wird.

## TG2

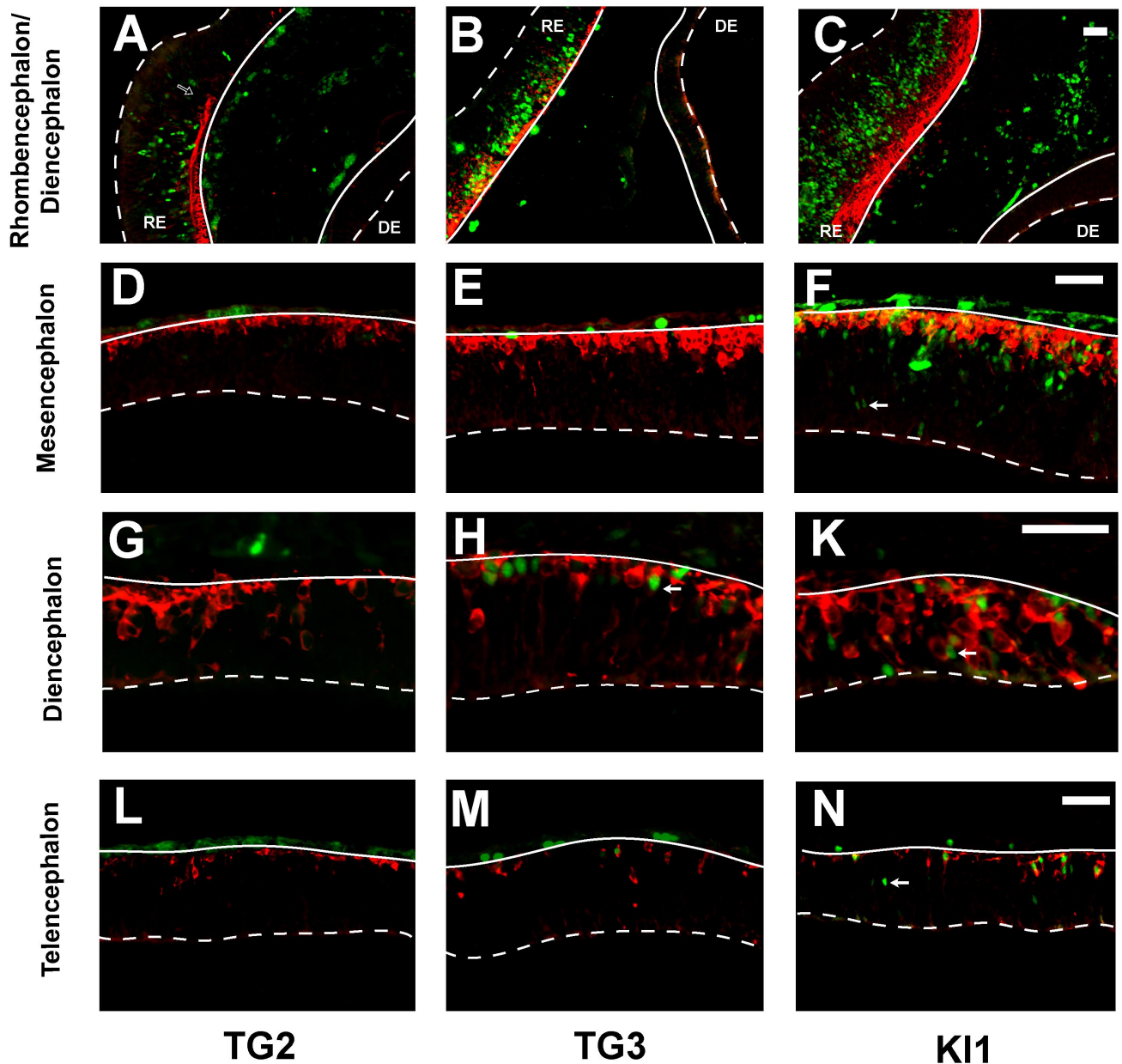
TG2 exprimiert in den in Abb. 16 & 17 untersuchten Bereichen nur im Rhombencephalon. In der a/p Achse geht die GFP-Expression anterior nicht über das rostrale Ende der  $\beta$ -III-Tubulin-Färbung hinaus (Abb. 16A). In der d/v Achse ist die GFP-Expression auf Neurone-generierende Bereiche begrenzt: GFP wird ventral nicht in der Bodenplatte exprimiert (Abb. 17A & 17D). Die Neuroepithelzellen der Bodenplatte werden bereits mit Beginn der Neurogenese postmitotisch und generieren keine Neurone (Kahane & Kalcheim, 1998).

## TG3

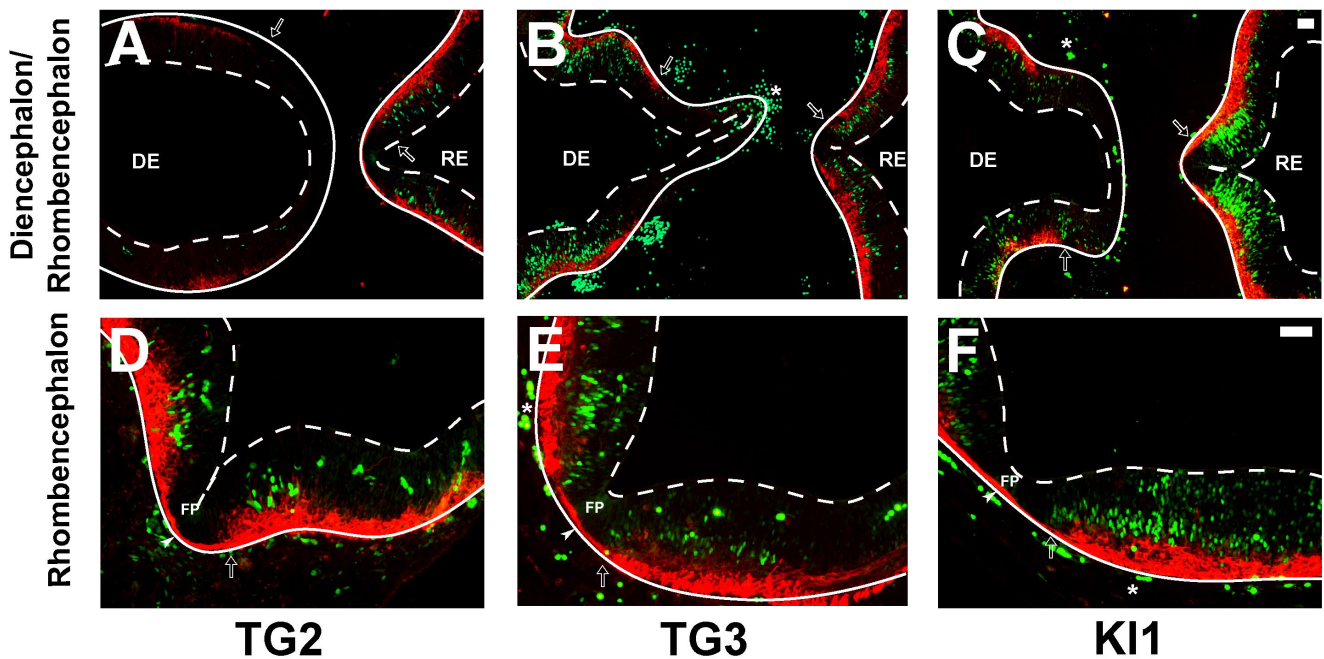
TG3 exprimiert in den in Abb. 16 & 17 gezeigten Arealen nur in Rhomb- und Diencephalon. Im Rhombencephalon sind mit fortgeschrittener Neurogenese viele GFP-positive Neuroepithelzellen zu erkennen (Abb. 16B). In Regionen mit einsetzender Neurogenese, z.B. im rostralen Diencephalon (Abb. 16B & 16H), exprimieren deutlich weniger Zellen GFP. In der d/v Achse stimmen GFP-Expression und  $\beta$ -III-Tubulin-Immunoreaktivität überein. Abschnitte mit aktiver Neurogenese, laterales Diencephalon und ventro-laterales Rhombencephalon sind GFP-positiv, Regionen ohne Neurogenese ventrales Diencephalon und die Bodenplatte im Rhombencephalon, exprimieren kein GFP (Abb. 17B & 17E).

## KI1

Die GFP-Expression in KI1 korreliert über das gesamte Neuralrohr mit der Entstehung von Neuronen. Entlang der a/p Achse ist der Anteil an GFP-positiven Neuroepithelzellen in Regionen mit aktiver Neurogenese deutlich höher als in Regionen, die erst später mit der Neurogenese beginnen: Rhombencephalon vs. Diencephalon (Abb. 16C), Mesencephalon (Abb. 16F) bzw. Telencephalon (Abb. 16N). In d/v Achse sind GFP- und  $\beta$ -III-Tubulin-Gradienten ebenfalls kongruent. Laterales Diencephalon und ventrales Rhombencephalon sind für beide Marker stark positiv das ventrale Diencephalon und die Bodenplatte des Rhombencephalons negativ (Abb. 17C & 17F).



**Abb. 16. Expression von GFP in TG2, TG3, und KI1 korreliert mit dem a/p Gradienten der Neurogenese im ZNS.** GFP-Expression (grün) in sagittalen Kryostatschnitten heterozygoter Embryonen (E10.5) mit immunhistochemischer Färbung gegen  $\beta$ -III-Tubulin (rot) durch (A-C) Rhomb-(RE)-/Di-(DE)-encephalon, (D-F) dorsales Mesencephalon, (G-K) Diencephalon (nahe der optischen Kommissur), (L-N) Telencephalon. In diesem Stadium erstreckt sich der Gradient der endogenen TIS21-mRNA über die ganze a/p Achse des Neuralrohrs (vgl. auch C, F, K, N). Die Expression von TG2 in Neuroepithelzellen der Ventrikularzone geht nicht über das anteriore Ende des neurogenetischen Gradienten im Rhombencephalon ( $\Rightarrow$ ) hinaus (A, D, G, L). TG3 exprimiert nur in Neurone-generierenden Bereichen des Rhombencephalons (B) und Diencephalons (H), nicht aber in Bereichen des Diencephalons, die noch keine Neurone generieren (B). Die Expression reicht nicht in dorsale Bereiche von Mes- und Telencephalon (E, M). Die Expression von KI1 korreliert entlang der ganzen a/p Achse mit den neurogenetischen Gradienten (C, F, K, N). ( $\rightarrow$  GFP-positive Neuroepithelzellen; ---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; A-C, D-F, G-N jeweils gleiche Vergrößerung; Balken in C, F, K, N: 50  $\mu$ m).



**Abb. 17. Expression von GFP in TG2, TG3, und KI1 korreliert mit dem d/v Gradienten der Neurogenese im Neuroepithel.** GFP-Expression (grün) in horizontalen Kryostatschnitten heterozygoter Embryonen (E10.5) mit immunhistochemischer Färbung gegen  $\beta$ -III-Tubulin (rot) durch (A-C) Rhomb-(RE)-/Di-(DE)-encephalon und (D-F) Rhombencephalon in höherer Vergrößerung. Die Expression von TG2 ist auf das ventrale Rhombencephalon begrenzt - es fehlen die lateralen und dorsalen Expressionsdomänen der TIS21-mRNA im Rhombencephalon und die Expression im Diencephalon (A). Ventral dringt die Expression nicht in die Bodenplatte (FP) vor (D) ( $\Rightarrow$  ventrale Grenze der Neurogenese). Die Bodenplatte generiert keine Neurone. TG3 exprimiert in Neurone-generierenden Bereichen des Rhomb-/und Diencephalons (B) und nicht in der Bodenplatte (E). KI1 exprimiert in Neurone-generierenden Bereichen des Rhomb-/und Diencephalons (C). In Abschnitten, die keine Neurone hervorbringen (C: ventrales Diencephalon, F: Bodenplatte des Rhombencephalons), wird kein GFP exprimiert. ( $\blacktriangleright$  Axonbündel; \* Blutzellen; ---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; A-C, D-F jeweils gleiche Vergrößerung; Balken in C, F: 50  $\mu$ m).

In TG2 und TG3 wird GFP entsprechend der Neurogenese-Gradienten innerhalb ihrer Expressionsdomänen entlang des Neuralrohres exprimiert: Obwohl sie nicht alle regulatorischen Elemente des TIS21-Gens enthalten (Abschnitt 3.4), ist die Expression innerhalb der exprimierenden Regionen für Neurogenese spezifisch. Die GFP-Expression von KI1 korreliert, wie erwartet, gut mit den Gradienten der Neurogenese. GFP wird ausschließlich in Regionen exprimiert, die Neurone generieren bzw. generieren werden. Eine Korrelation auf zellulärer Ebene, d.h. die Expression in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen innerhalb der neurogenetisch aktiven Areale, wird in Abschnitt 3.6 untersucht.

### 3.6 TG2, TG3 und KI1 markieren Neurone-generierende Neuroepithelzellen

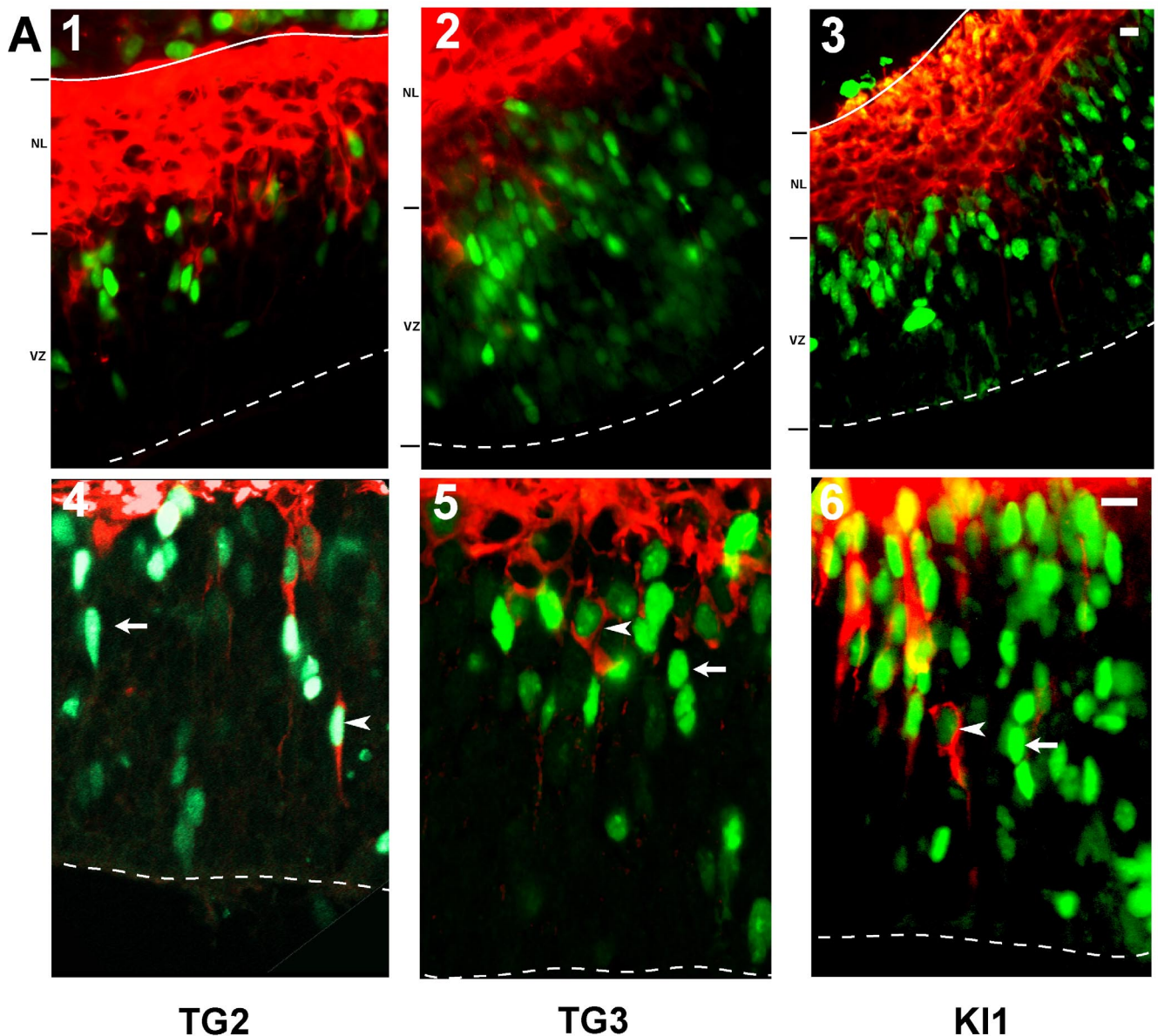
Wird GFP unter der Kontrolle des TIS21-Gens exprimiert, sollte GFP analog der TIS21-mRNA in der G1-Phase der Neurone-generierenden Teilung exprimiert und dann neutral auf die Tochterzellen weitergegeben werden. In Neuronen sollte sich die Fluoreszenz langsam verringern - die Halbwertszeit von GFP beträgt in Zellkultur ca. 26 h (Corish & Tyler-Smith, 1999) – und in älteren Neuronen verschwinden.

Neuroepithelzellen in Interphase und Mitose sowie junge Neurone sind GFP-positiv: ein Hinweis auf die Expression in der Neurone-generierenden Zellteilung

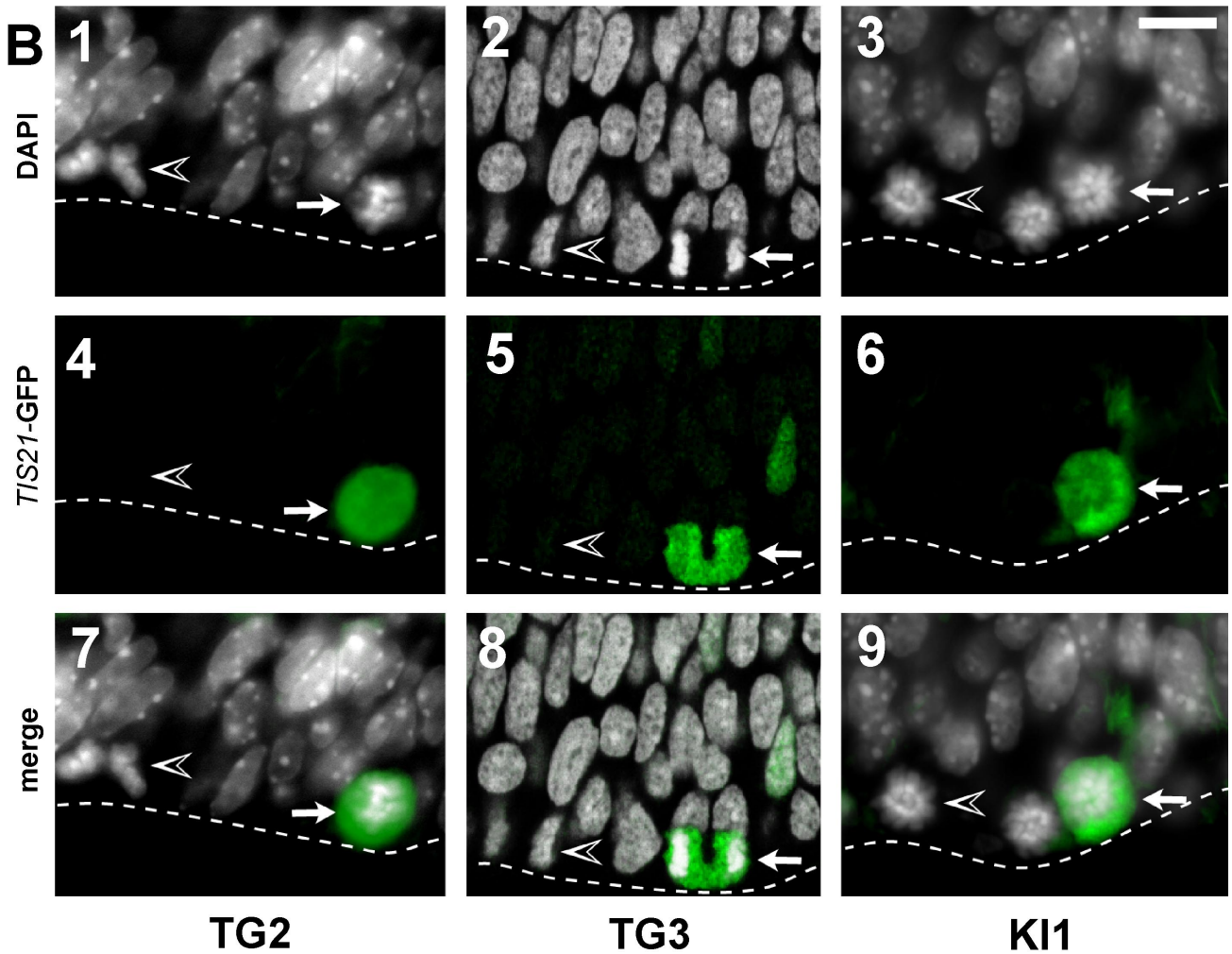
Sind tatsächlich Neurone-generierende Neuroepithelzellen markiert, sollten eine Subpopulation von Neuroepithelzellen in Interphase und Mitose und junge, jedoch nicht ältere Neurone GFP-positiv sein. Neuroepithelzellen können von jungen Neuronen in der Ventrikularzone durch  $\beta$ -III-Tubulin-Färbung unterschieden werden. Mitotische Zellen können bei DNA-Färbung mit DAPI bzw. Propidium-Jodid an kondensiertem Chromatin in Meta-, Ana-, bzw. Telophase erkannt werden.

In der Ventrikularzone exprimiert tatsächlich eine Subpopulation von Neuroepithelzellen in Interphase und Mitose GFP ( $\beta$ -III-Tubulin-negative/GFP-positive Zellen in Abb. 18A4-6 bzw. GFP-positive Mitosen in Abb. 18B1-9). Die Fluoreszenz hält in jungen migrierenden Neuronen an ( $\beta$ -III-Tubulin und GFP-positive Zellen) und verschwindet in älteren Neuronen in den weiter basal gelegenen neuronalen Schichten (Abb. 18A1-3).





**Abb. 18. TG2, TG3, und KI1 markieren Neurone-generierende Neuroepithelzellen: Eine Subpopulation von Neuroepithelzellen in Interphase und Mitose sowie junge Neurone sind GFP-positiv.** GFP-Expression (grün) in horizontalen Kryostatschnitten des Rhombencephalons heterozygoter Embryonen (E10.5) mit (A) immunhistochemischer Färbung gegen  $\beta$ -III-Tubulin (rot) und (B) (Seite 80) Chromatin-Färbung (grau). GFP ist stark in der basalen Hälfte der Ventrikularzone (VZ) und nicht den basalen neuronalen Schichten (NL) exprimiert (A1-A3). Eine Subpopulation von Neuroepithelzellen in Interphase (GFP-positiv/ $\beta$ -III-Tubulin-negative Zellen,  $\rightarrow$ ) und Mitose (B1-B9,  $\rightarrow$ ;  $\triangleright$  GFP-negative Mitosen) sowie junge, migrierende Neurone in der Ventrikularzone sind GFP-positiv (GFP-positiv/ $\beta$ -III-Tubulin-negative Zellen, A4-A6,  $\triangleright$ ). Ältere Neurone in den neuronalen Schichten haben die Expression verloren (A1-A3). (---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; A1-A2, A4-A6, B1-B9 jeweils gleiche Vergrößerung; Balken in A3, A6, B3: 10  $\mu$ m).



Der Anteil GFP-exprimierender Zellen ist in der basalen Hälfte der Ventrikularzone besonders hoch (Abb. 18A1-3). Dieses Phänomen kann durch zwei, in ihrem Ergebnis additive, Mechanismen erklärt werden. Erstens: In dieser Zone sind die Kerne von Neuroepithelzellen in der G1/S-Phase lokalisiert. Man erwartet deshalb für die TIS21- und näherungsweise für GFP die höchste Konzentration in dieser Region. Die TIS21-mRNA wird zellzyklusabhängig in der G1-Phase exprimiert und in der S-Phase degradiert, ihre Expression erreicht beim G1/S-Übergang ein Maximum. Das Maximum der GFP-Expression sollte identisch sein. In diesen Aufnahmen ist deshalb nur eine Subpopulation der Zellen, die in der G1/S-Phase positiv waren, auch in der G2-Phase und in der Mitose als GFP-positive Zellen zu detektieren. Zweitens: Nicht alle in der G1/S-Phase GFP-positive Zellen im Neuroepithel bzw. Zellkerne werden zur apikalen Oberfläche der Ventrikularzone migrieren. Doch was passiert mit diesen Zellen? Eine mögliche Erklärung wird in Abschnitt 3.8 & 3.9 gegeben.

Die Existenz von GFP in mitotischen Zellen zeigt: GFP wird innerhalb der *lineage* „Neuroepithelzelle – Neuron“ vor der Neurone-generierenden Zellteilung exprimiert. Die enge Korrelation mit den Gradienten der Neurogenese (Abschnitt 3.6) zeigt: GFP wird unmittelbar, d.h.

nicht mehr als einen Zellzyklus (12 h) vor der Neurone-generierenden Teilung exprimiert. GFP muss demnach zwangsläufig in der Neurone-generierenden Zellteilung exprimiert sein.

An dieser Stelle lassen sich die Ergebnisse zu den transgenen Linien TG1, TG2, TG3 zusammenfassen: In Regionen, in denen die Transgene TG2 und TG3 das Potenzial haben, zu exprimieren (Abschnitt 3.4, Tab. 3 & 4), exprimieren sie entsprechend der Gradienten der Neurogenese (Abschnitt 3.5, Abb. 16 & 17) in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen (dieser Abschnitt, Abb. 18), obwohl TG2 und TG3 nicht alle regulatorischen Elemente des TIS21-Gens enthalten, die für das volle TIS21-Expressionsmuster erforderlich sind.

### **3.7 KI1 markiert im gesamten ZNS Neurone-generierende Neuroepithelzellen während der ganzen neurogenetischen Periode**

KI1 zeigt in allen neurogenetisch aktiven Regionen des ZNS GFP-Expression (Abschnitt 3.4, Tab. 3 & 4). Die GFP-Expression korreliert mit den räumlichen Gradienten der Neurogenese (Abschnitt 3.5, Abb. 16 & 17) und markiert spezifisch Neurone-generierende Neuroepithelzellen (Abschnitt 3.6, Abb. 18). Generell sollte in KI1-Linien die GFP-Expression im gesamten zeitlichen Verlauf der Neurogenese ein Indikator für Neurone-generierende Zellteilungen im gesamten ZNS sein.

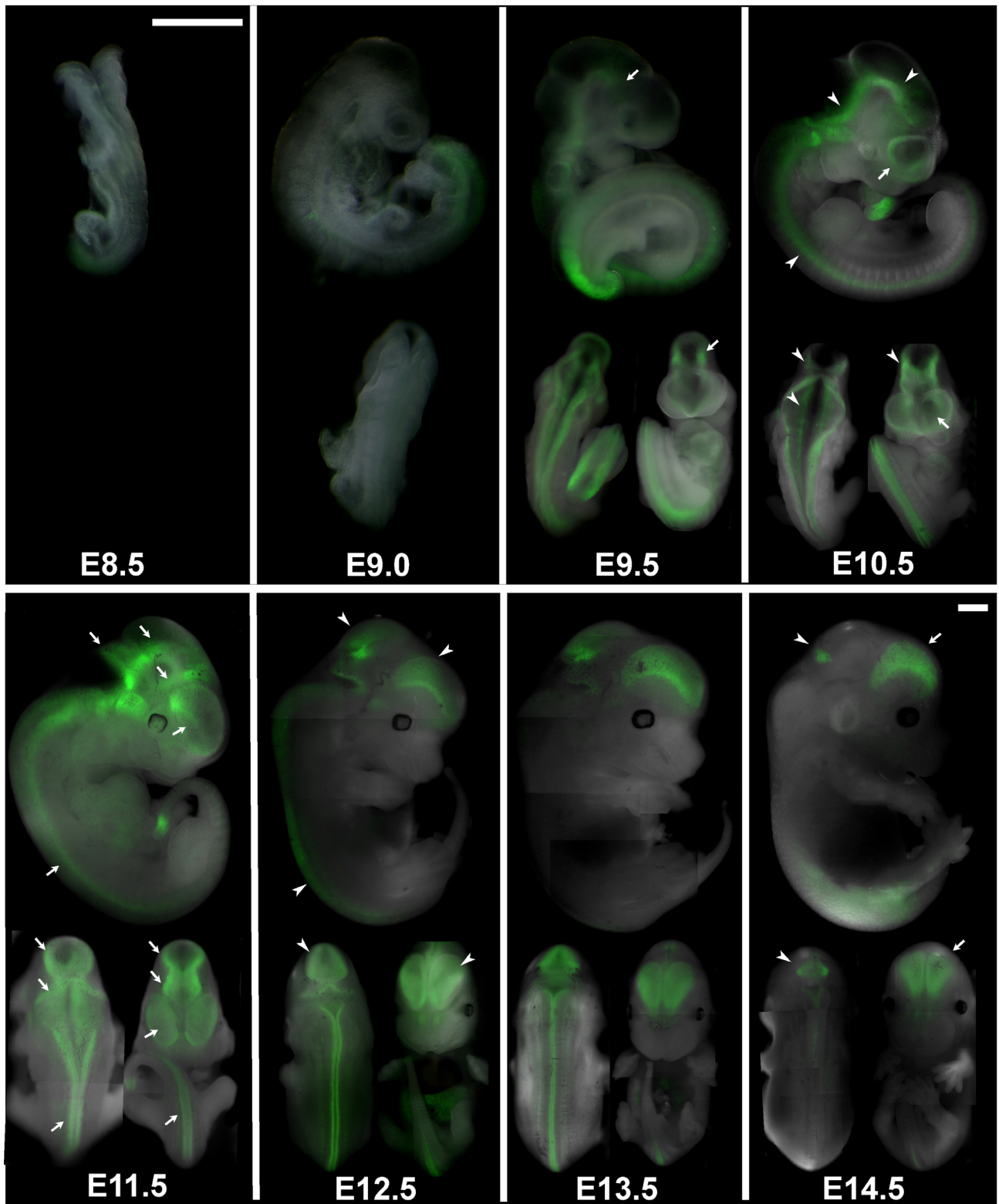
Dies soll demonstriert werden durch: (i) den zeitlichen Verlauf in einer Übersicht auf organischer Ebene im *wholemout* (Abb. 19), (ii) den zeitlichen Verlauf auf zellulärer Ebene an zwei ausgewählten Regionen (Rhomb- und Telencephalon) in einer Zeitserie im Schnitt (Abb. 20) und (iii) durch die quantitative Analyse der GFP-Expression im Neuroepithel ausgewählter Regionen in räumlich (Rhomb-/Telencephalon) und zu zeitlich (Telencephalon E10.5-E15.5) verschiedenen Stadien (Abb. 21).

#### Gradienten im *wholemout*

*Wholemout*-Fluoreszenzaufnahmen von KI1-Embryonen bieten eine Übersicht über die GFP-Expression im zeitlichen Verlauf der Neurogenese entlang des gesamten Neuralrohrs (Abb. 19). Auf Grund des geringen Fluoreszenzsignals einzelner Zellen sind die ersten GFP-positiven Neuroepithelzellen im *wholemout* nicht zu erkennen. Die Gradienten hier beschreiben deshalb Bereiche fortgeschrittener Neurogenese, nicht das Entstehen erster Neurone und sind gegenüber der Entstehung erster Neurone entlang der a/p und d/v Achsen (Abschnitt 3.5, Tab. 5, Abb. 16 & 17) leicht verzögert. E8.5-E9.0: Die Signale vereinzelter GFP-positiver Zellen im Neuroepithel sind im *wholemout* nicht zu erkennen. Deshalb beschreiben die Gradienten entlang der a/p und d/v Achse hier nicht das Entstehen erster Neurone, sondern Bereiche fortgeschrittener Neurogenese. E9.5: Die TIS21-GFP-Expression erstreckt sich über das gesamte Rückenmark rostral bis zum ventralen Mesencephalon. E10.5: Die GFP Expression ist rostral bis ins Telencephalon fortgeschritten. In



Mesencephalon und Rückenmark ist die Expression auf ventrale Bereiche begrenzt, dorsal ist die Expression deutlich geringer. E11.5-E12.5: Die Expression erstreckt sich über das gesamte Neuralrohr und erreicht im Met-/ Mesencephalon und im Telencephalon auch die dorsalen Areale. E13.5-E14.5: Cerebellum und die corticalen Hemisphären werden zu den Hauptexpressionsdomänen, die anderen Bereiche des ZNS verlieren die GFP-Expression. In dieser Übersicht korreliert die GFP-Expression präzise mit den bekannten Gradienten der Neurogenese (Gardette *et al.*, 1982; Altman & Bayer, 1991; Jacobson, 1991).



**Abb. 19. Expression von GFP im KI1<sup>+/wt</sup>-Embryo während der Neurogenese.** GFP-Expression in *wholemounds* heterozygoter Embryonen. Laterale (oben), dorsale (unten links) und ventrale Ansicht (unten rechts). (E9.5: → rostrale Expressionsgrenze im ventralen Mesencephalon; E10.5: → rostrale Expressionsgrenze im Telencephalon; > ventrale Expression in Mesencephalon und Rückenmark; E11.5-E12.5: → Expression über die gesamte a/p Achse des Neuralrohres; > Expression im dorsalen Met-/Mes- und Telencephalon; E13.5-E14.5: Expression in Cerebellum (>) und corticalen Hemisphären (→); E8.5-E14.5 in jeweils unterschiedlichen Vergrößerungen. Balken E8.5, E14.5: 500 μm).

GFP markiert die ersten Neurone-generierenden Teilungen und korreliert mit dem zeitlichen Verlauf der Neurogenese

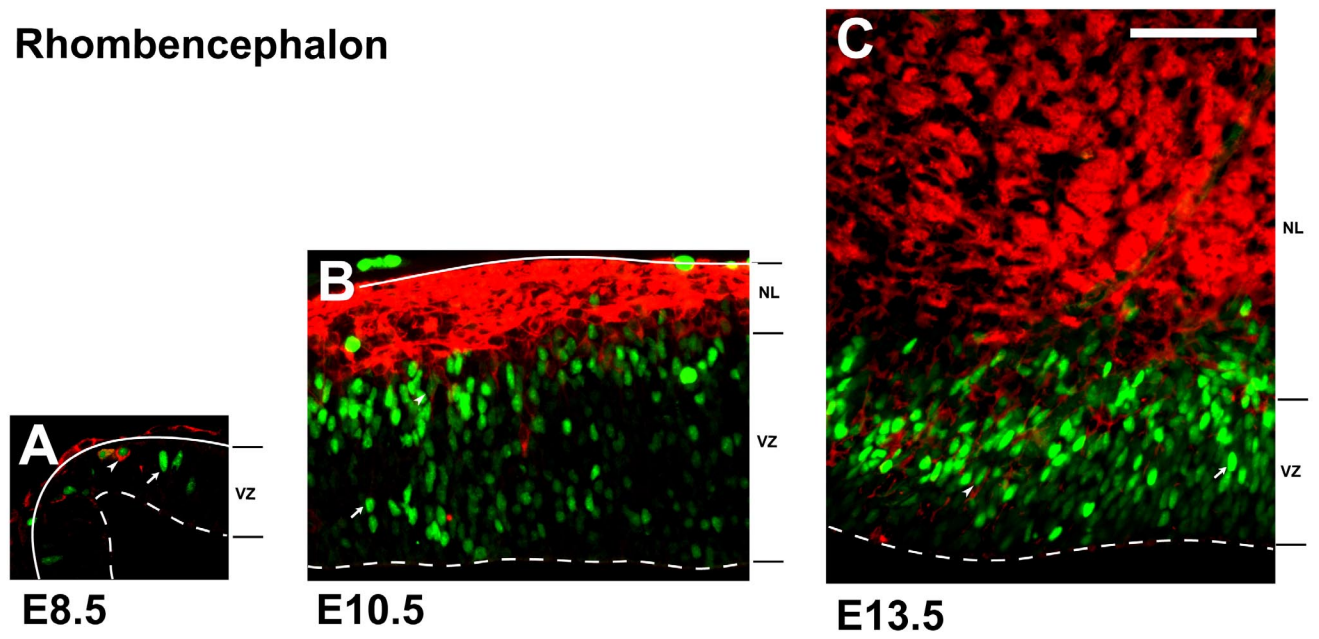
Die Korrelation von GFP und Neurogenese in verschiedenen Regionen des ZNS im zeitlichen Verlauf der Neurogenese ist für Rhomb- und Telencephalon in Kryostatschnitten mit  $\beta$ -III-Tubulin detaillierter untersucht worden (Abb. 20).

Im Rhombencephalon markiert GFP die ersten Neurone-generierenden Neuroepithelzellen und die ersten Neurone bei E8.5 (Abb. 20A). Der Anteil an Neurone-generierenden Zellen in der Ventrikularzone und die Zahl der Neurone ist noch sehr gering. Bei E10.5 ist die Neurogenese wesentlich weiter fortgeschritten. Der Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen in der Ventrikularzone ist mit der Zahl der Neurone (erkennbar an der Dicke der neuronalen Schicht) stark angestiegen (Abb. 20B). Bei E13.5 ist die neuronale Schicht stark expandiert, der Anteil GFP-positiver Zellen in der Ventrikularzone weiter sehr hoch. Die GFP-Expression ist auf die Ventrikularzone bzw. die Randzone zwischen Ventrikularzone und neuronaler Schicht begrenzt. Die neuronalen Schichten exprimieren GFP nicht. Dieser Befund wurde schon in vorherigen Abschnitten erwähnt und wird im Telencephalon besonders deutlich.

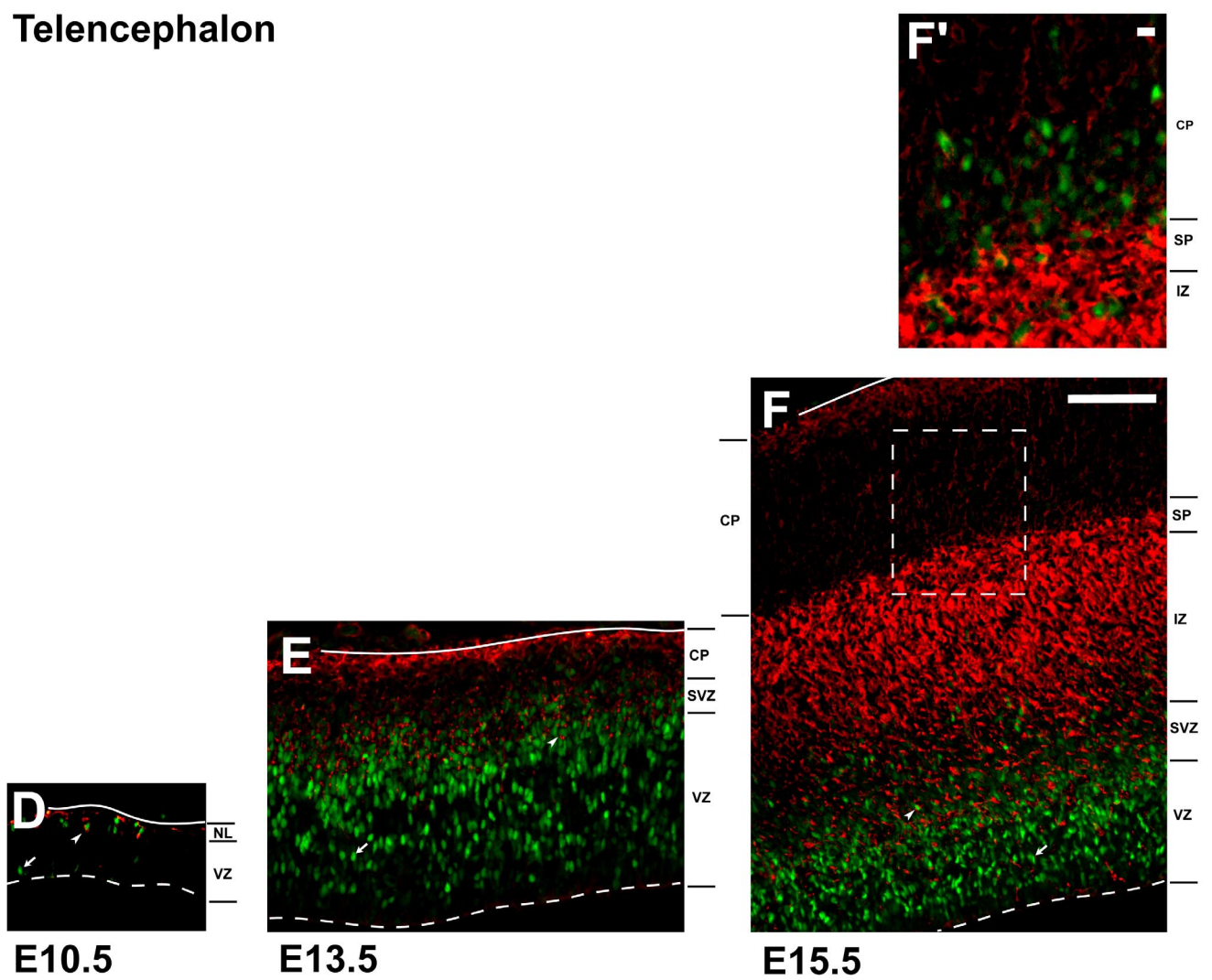
Im Telencephalon treten mit Beginn der Neurogenese bei E10.5 erste GFP-positive Neurone-generierenden Neuroepithelzellen und die ersten GFP-positiven Neurone auf (Abb. 20D). Bei diesen Neuronen handelt es sich vermutlich um Cajal-Retzius-Zellen. Diese Pionier-Neurone bilden die äußerste Schicht des Cortex (Schicht I). Bei E13.5 ist die Ventrikularzone radial stark expandiert. Der Anteil der GFP-positiven Zellen ist angestiegen (Abb. 20E). Das stimmt mit einem höheren Anteil Neurone-generierender Neuroepithelzellen überein (Takahashi *et al.*, 1996). Zu diesem Zeitpunkt werden hauptsächlich Neurone der Schicht IV gebildet. Bei E15.5 sind die neuronalen Schichten in radialer Dimension dramatisch gewachsen. Jetzt entstehen die Schichten III und II. Der hohe Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen entspricht der massiven Neuronenproduktion zu diesem Zeitpunkt (Abb. 20F). Hier wird noch einmal die radiale Begrenzung der GFP-Expression auf die primäre germinale Schicht des Neuralrohrs deutlich: Die Expression ist größtenteils auf neuronale Vorläufer begrenzt. Die neuronalen Schichten selbst sind weitgehend negativ. Die GFP-Expression in der Subventrikularzone (Abb. 20E & 20F) stammt zumindest teilweise von jungen Neuronen, die in die intermediäre Zone einwandern. Sie sind später auf ihrem Weg in die corticalen Schichten nochmals als GFP-positive Zellen zu erkennen (Abb. 20F').

**Abb. 20. (Seite 85). Expression von KII im Gehirn im zeitlichen Verlauf der Neurogenese.** GFP-Expression (grün) in heterozygoten Embryonen in horizontalen Kryostatschnitten durch Rhombencephalon (A-C) und Telencephalon (D-F) mit immunohistochemischer Färbung gegen  $\beta$ -III-Tubulin (rot). (A) E8.5: *TIS21*-GFP in Neuroepithelzellen ( $\rightarrow$ ) und Neuronen ( $\blacktriangleright$ ). (B) E10.5 & (C) E13.5: Der Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen in der Ventrikularzone (VZ) und die Ausdehnung der neuronalen Schichten (NL) nimmt zu. (D) E10.5: Einzelne Neuroepithelzellen ( $\rightarrow$ ) und Pionierneurone des Cortex ( $\blacktriangleright$ ) sind GFP-positiv. (E) E13.5 & (F) E15.5: Der Anteil GFP-exprimierender Neuroepithelzellen nimmt zu, bleibt räumlich auf Neurone-generierende Bereiche, VZ bzw. Subventrikularzone (SVZ), begrenzt. (F') Vergrößerung des Ausschnitts in F. (IZ: intermediäre Zone; SP: *subplate*; CP: Corticalplatte; ---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; A-C, D-F jeweils gleiche Vergrößerung. Balken in C, F: 50  $\mu$ m, in F': 10  $\mu$ m).

Rhombencephalon



Telencephalon

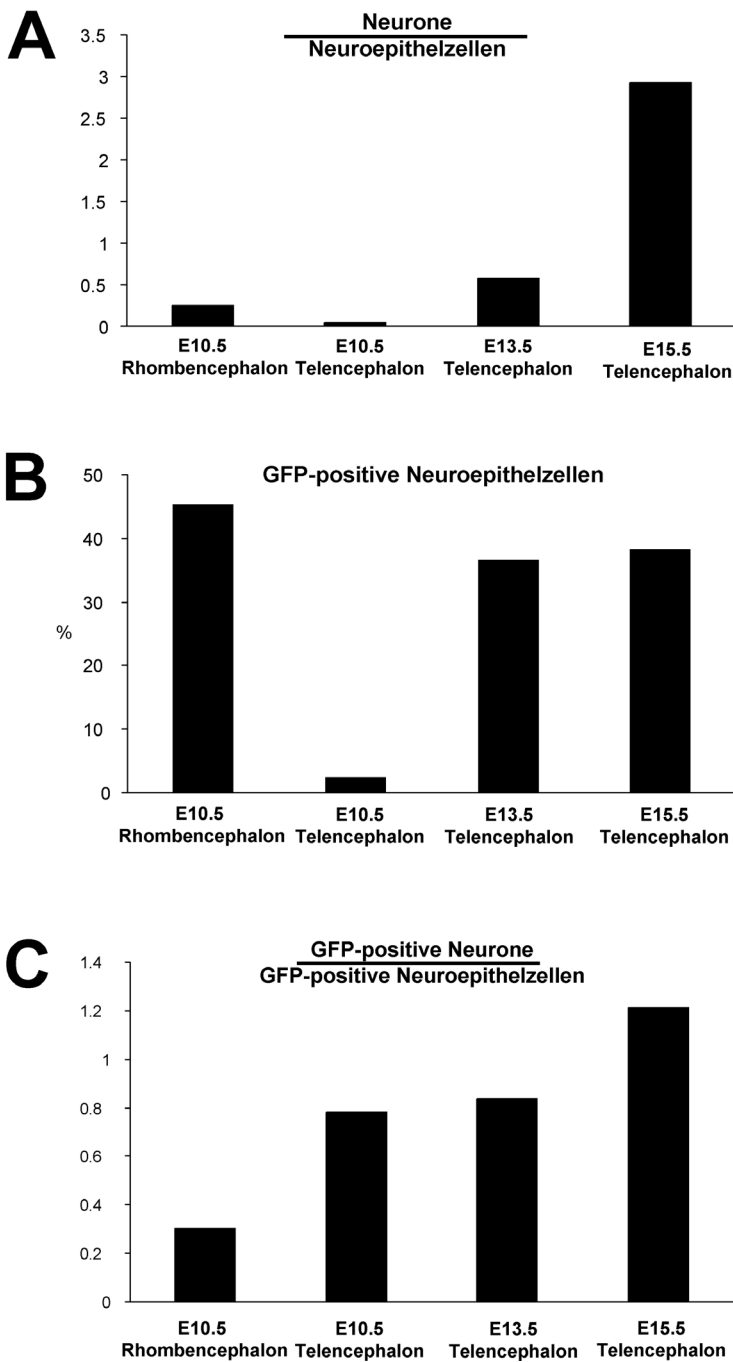


Quantitative Analyse Neurone-generierender Neuroepithelzellen im Verlauf der Neurogenese

Die Korrelation von GFP-Expression und Neurogenese lässt sich auch auf zellulärer Ebene quantitativ beschreiben. Die folgende quantitative Analyse der GFP-Expression vergleicht verschiedene Regionen in gleichen Stadien (Rhombencephalon vs. Telencephalon bei E10.5), und die jeweils gleiche Region zu unterschiedlichen Stadien (Telencephalon bei E10.5, E13.5 und E15.5). Das Verhältnis von Neuronen zu Neuroepithelzellen gibt die Population der Vorläuferzellen zur Gesamtheit der generierten Neurone an (Integral über die Zeit) und beschreibt näherungsweise den Fortschritt der Neurogenese (Abb. 21A). Der Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen (an der gesamten Neuroepithelzellpopulation) entspricht den potentiell Neurone-generierenden Neuroepithelzellen (Abb. 21B). Das Verhältnis von GFP-positiven Neuronen zu GFP-positiven Neuroepithelzellen beschreibt näherungsweise die *steady state*-Produktion von Neuronen aus Neurone-generierenden Neuroepithelzellen (Abb. 21C).

Ein Vergleich der Daten von E10.5 Rhomb- zu Telencephalon und E10.5-E15.5 Telencephalon in Abb. 21A & 21B zeigt: Der Anteil GFP-exprimierender Zellen in der Ventrikularzone korreliert mit dem Fortschritt der Neurogenese. Bei E10.5 ist das Rhombencephalon weiter fortgeschritten als das Telencephalon. Entsprechend ist der Anteil der GFP-positiven Zellen im Neuroepithel im Rhombencephalon höher als im Telencephalon. Gleiches gilt für die Zeitreihe im Telencephalon. Zu Beginn der Neurogenese bei E10.5 sind nur sehr wenige Neurone vorhanden, der Anteil GFP-positiver Zellen im Neuroepithel ist ebenfalls gering, wird aber mit ansteigendem Verhältnis Neuronen/Neuroepithel immer größer. Auffällig ist, dass der Anteil GFP-positiver Zellen ein Plateau bei 50% erreicht. Zudem korrelieren die Daten im Vergleich von E10.5 Rhomb-/Telencephalon und E10.5-E15.5 Telencephalon zwar zwischen den Abb. 21A & 21B, diese aber nicht mit Abb. 21C. Im E10.5 Rhombencephalon ist die *steady state* Neuronenproduktion geringer als im Telencephalon, obwohl die Neurogenese weiter fortgeschritten (Abb. 21A) und der Anteil an GFP-positiven Zellen im Neuroepithel höher ist (Abb. 21B).

Die GFP-Expression in der KI1-Linie ist, wie die TIS21-mRNA, während der gesamten neurogenetischen Periode, im gesamten ZNS ein Marker für Neurone-generierende Neuroepithelzellen. Die KI1-Linien eröffnen somit die Möglichkeit, Neurone-generierende Neuroepithelzellen von proliferierenden zu unterscheiden und statisch sowie videomikroskopisch zu analysieren.



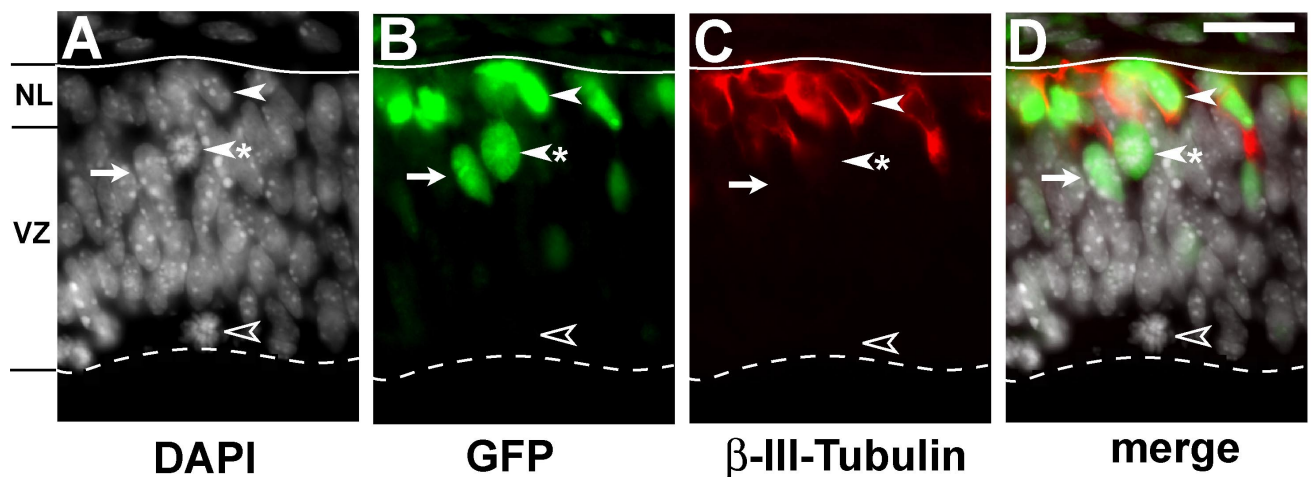
**Abb. 21. In K11-Embryonen nimmt die Zahl GFP-positiver Neuroepithelzellen im Verlauf der Neurogenese zu.** Daten aus Rhomb- und Telencephalon heterozygoter Embryonen (E10.5-E15.5). Neurone wurden durch  $\beta$ -III-Tubulin-Immunfärbung identifiziert, die Zellzahlen wurden durch Chromatinfärbung mit DAPI ermittelt. (A) Verhältnis von Neuronen zu Neuroepithelzellen. E10.5 Telencephalon: Verhältnis von  $\beta$ -III-Tubulin-positiven Zellen zu  $\beta$ -III-Tubulin-negativen Zellen in der Ventrikularzone. Sonst: Verhältnis von  $\beta$ -III-Tubulin-positiven Zellen in der Ventrikularzone + Zellen basal zur Ventrikularzone zu  $\beta$ -III-Tubulin-negativen Zellen in der Ventrikularzone. (B) Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen ( $\beta$ -III-Tubulin-negativ) an der Gesamtzahl an Neuroepithelzellen ( $\beta$ -III-Tubulin-negative Zellen in der VZ). (A & B) Rhombencephalon: n=541; Telencephalon: E10.5 n=738, E13.5 n=1847, E15.5 n=966. (C) Verhältnis von GFP-positiven (jungen) Neuronen (GFP und  $\beta$ -III-Tubulin positive Zellen) zu GFP-positiven Neuroepithelzellen ( $\beta$ -III-Tubulin-negative Zellen in der Ventrikularzone). (Rhombencephalon: n=241; Telencephalon: E10.5 n=78, E13.5 n=790, E15.5 n=208).



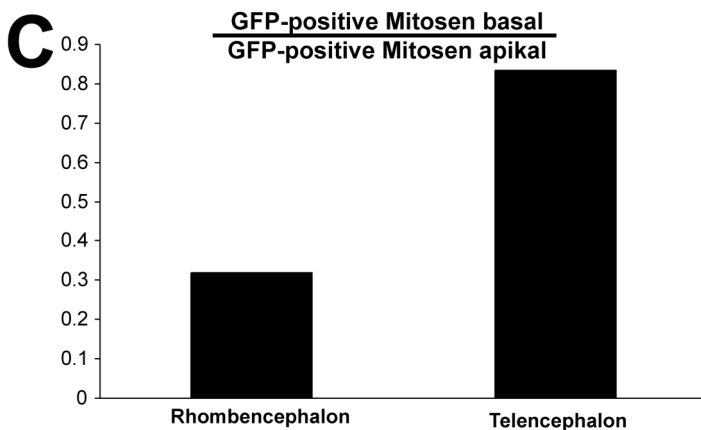
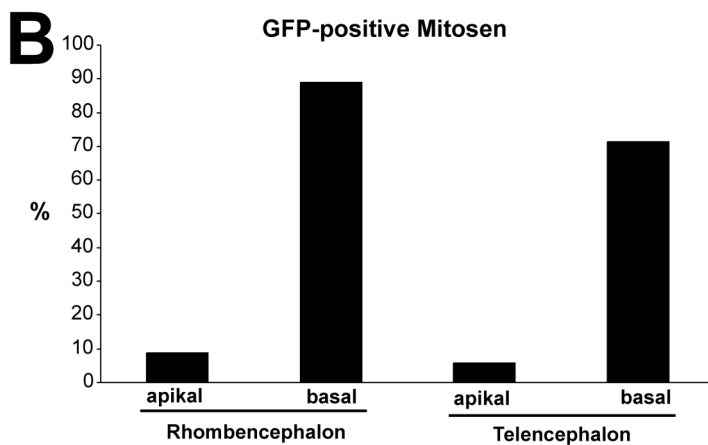
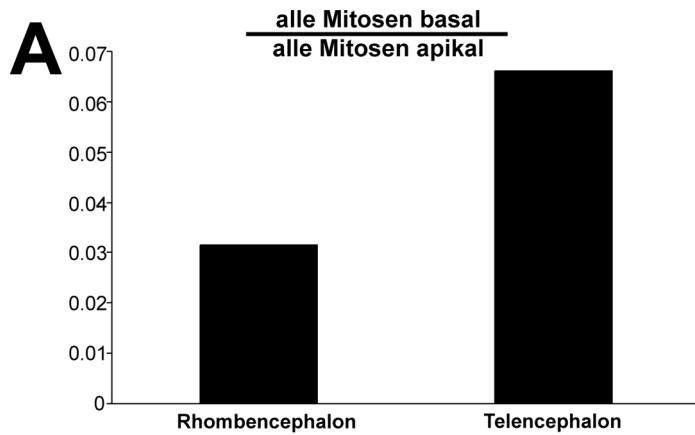
### 3.8 Apikale und basale Neurone-generierende Zellteilungen im Neuroepithel während der frühen Neurogenese

Nach dem gängigen Modell entstehen Neurone im ZNS von Säugern in der Ventrikularzone direkt aus apikalen Mitosen von Neuroepithelzellen (Chenn & McConnell, 1995; Noctor *et al.*, 2001 und Miyata *et al.*, 2001; siehe Abschnitt 1.2, Abb. 2C). Im Neuroepithel sollten also alle Neurone-generierenden (GFP-positiven) Mitosen apikal ablaufen. Die Existenz von TIS21-Protein (Iacopetti *et al.*, 1999) bzw. TIS21-GFP (Abschnitt 3.6) in einer Subpopulation (Neurone-generierender) apikaler Mitosen entspricht ebenfalls dieser Vorstellung.

Die Entdeckung GFP-positiver **basaler** Mitosen zu Beginn der Neurogenese im Telencephalon (E10.5; KII<sup>\*wt</sup>) war deshalb völlig unerwartet (Abb. 22). Diese Mitosen sind apikal zu den ersten Neuronen der neuronalen Schicht lokalisiert und negativ für  $\beta$ -III-Tubulin. Die quantitative Analyse zeigt, dass diese im Vergleich mit apikalen Mitosen zu Beginn der Neurogenese deutlich seltener auftreten (Abb. 23A) – vielleicht ein Grund, warum sie bisher in der Literatur „übersehen“ wurden. Apikale Mitosen sind zu einem geringen Prozentsatz, basale Mitosen dagegen überwiegend GFP-positiv (Abb. 23B). Im Fall apikaler Mitosen nicht überraschend, da neben differenzierenden auch proliferative Teilungen an der apikalen Oberfläche ablaufen. Basale Teilungen scheinen hingegen gänzlich differenzierend. Interessanterweise liegt der Anteil GFP-positiver (Neurone-generierender) basaler Mitosen im Telencephalon höher als im Rhombencephalon (Abb. 23C).



**Abb. 22. Basale Neurone-generierende Zellteilungen im Telencephalon zu Beginn der Neurogenese.** Sagittaler Kryostatschnitt eines Embryos (KII<sup>\*wt</sup>, E10.5), mit DAPI-Chromatinfärbung (A), GFP-Expression (B) und immunhistochemischer Färbung gegen  $\beta$ -III-Tubulin (C). (D) Überlagerung von (A, B & C). Mitosen sind an kondensiertem Chromatin zu erkennen (A). Neben apikalen Teilungen ( $\blacktriangleright$ ) treten mit dem Einsetzen der Neurogenese basale, GFP-positive Teilungen ( $*\blacktriangleright$ ) (B) auf. Diese Zellen sind neben typischen Neurone-generierenden Neuroepithelzellen ( $\rightarrow$ ) eine zweite eigenständige Neurone-generierende Zellpopulation. Sie teilen sich auf der basalen Seite der Ventrikularzone, apikal zu den neuronalen Schichten (C). Als neuronale Vorläuferzellpopulation sind diese Zellen  $\beta$ -III-Tubulin-neaktiv (C). (VZ: Ventrikularzone; NL: neuronale Schichten;  $\rightarrow$  GFP-positive Neuroepithelzelle;  $\blacktriangleright$  GFP-positives junges Neuron; ---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; Balken: 25  $\mu$ m).



**Abb. 23. Der Anteil GFP-positiver Mitosen steigt von apikalen zu basalen Zellteilungen an.** Daten aus Rhomb- und Telencephalon (K11<sup>\*/wt</sup>, E10.5). Die Mitosen wurden mittels Chromatinfärbung mit DAPI identifiziert (siehe Abb. 22). (A) Verhältnis aller basaler Mitosen zu allen apikalen Mitosen. (B) Anteil GFP-positiver Mitosen an allen Mitosen, apikal bzw. basal. (C) Verhältnis von basalen zu apikalen GFP-positiven Mitosen. (Rhombencephalon n=285; Telencephalon n=113).

Im Neuroepithel existieren demnach zwei unterschiedliche Typen Neurone-generierende Teilungen: (i) apikale Teilungen typischer Neuroepithelzellen und (ii) basale Teilungen einer zweiten neuronalen Vorläuferpopulation, deren Verhältnis zwischen Rhomb- und Telencephalon variiert.

Ein Ziel dieser Arbeit, die Symmetrie und *lineage* Neurone-generierender Zellteilungen zu untersuchen, muss demnach auf basale Teilungen erweitert werden: (i) Wie ist die jeweilige Symmetrie der apikalen und basalen Neurone-generierenden Teilung und (ii) wie können die sich apikal und die sich basal teilenden, GFP-positiven Zellen in die *lineage* „proliferierende



Neuroepithelzelle – Neuron“ eingeordnet werden? Theoretisch sollten beide Fragen (zumindest teilweise) durch eine videomikroskopische Beobachtung der Neurone-generierenden Zellteilungen zu beantworten sein.

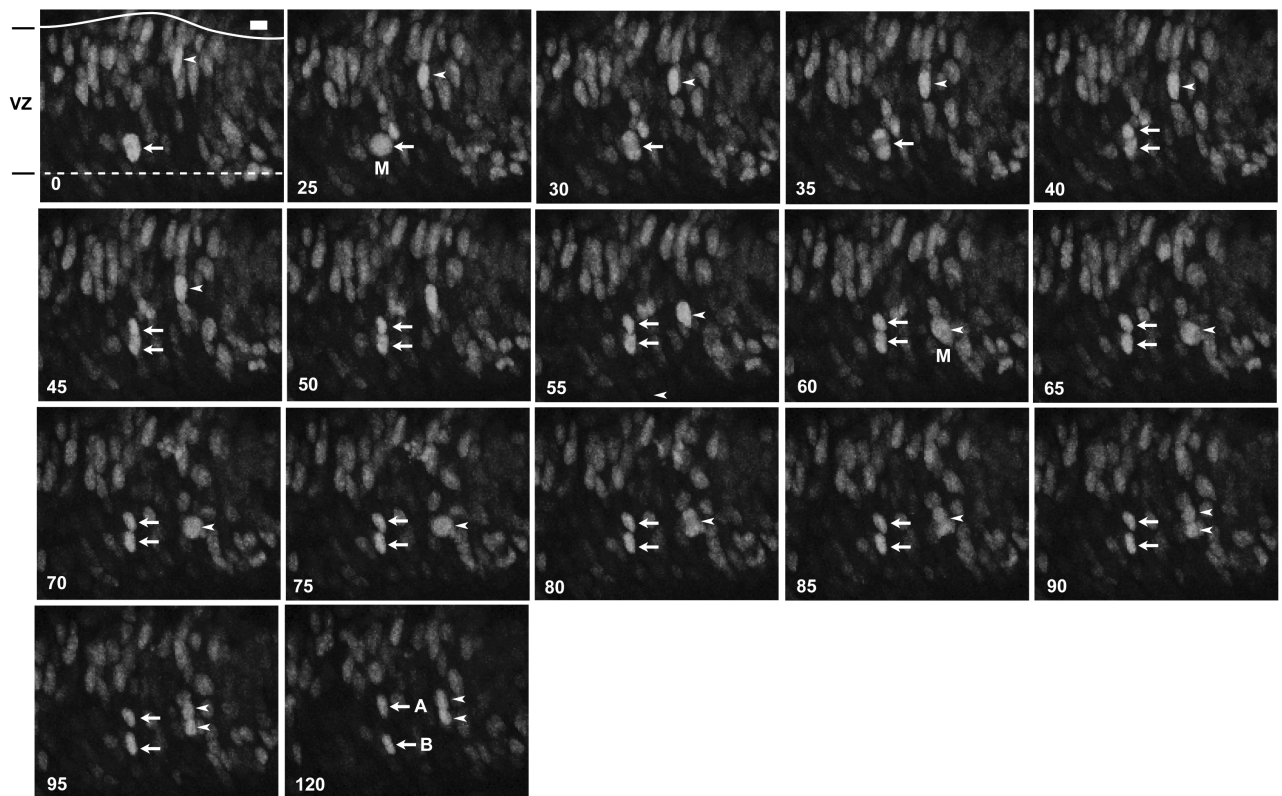
### 3.9 Die ersten Neurone im Neuroepithel entstehen aus apikalen asymmetrischen Teilungen und basalen symmetrischen Teilungen

*TIS21*-GFP-Linien bieten die Möglichkeit, Neurone-generierende Zellteilungen zeitaufgelöst darzustellen. Zellteilung und -migration GFP-markierter Zellen ( $KI1^{*/wt}$ ) wurden dazu in organotypischen Kulturen von Neuralrohr-Explantaten videomikroskopisch verfolgt. Die zeitaufgelöste Darstellung erlaubt, Rückschlüsse auf (i) das Wanderungsverhalten der Zellkerne während der interkinetischen Migration, (ii) die Zellteilungsebene relativ zur ventrikulären Oberfläche und (iii) die Symmetrie der Teilung (Symmetrie definiert über das *cell fate* der Tochterzellen) zu ziehen (Abschnitt 4.2).

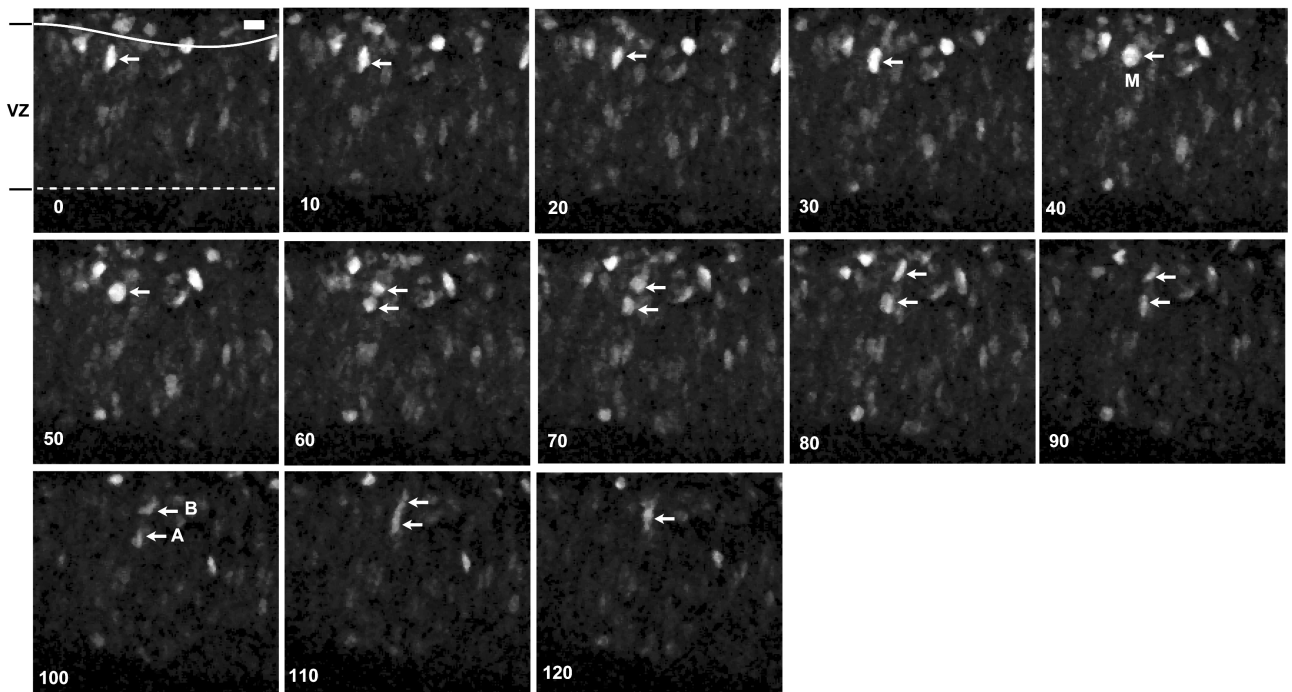
In dieser Arbeit wurde erstmals die frühe Neurogenese mittels spezifisch markierte Vorläuferpopulationen an Schnitten aus Rhomb- (E9.5-E10.5) und Telencephalon (E11.5-E12.5) analysiert. In coronalen 400  $\mu\text{m}$  Vibratom-Schnitten des Neuralrohrs konnten mit Multiphoton-Videomikroskopie Zellteilungen und Migrationen von Zellkernen über einen Zeitraum von bis zu 16 h beobachtet werden (Abb. 24 & 25).

**Abb. 24. (Seite 91). Videomikroskopie GFP-markierter apikaler und basaler Zellteilungen im Neuroepithel.** Multiphoton-Videomikroskopie von kultivierten 400  $\mu\text{m}$  coronalen Schnitten des embryonalen Neuralrohres ( $KI1^{*/wt}$ ). In dieser Orientierung verlaufen radiale Migrationen der Zellkerne in der Bildebene. (A) Apikale Teilungen im Rhombencephalon (E9.5). ( $\rightarrow$ ) Teilung einer Vorläuferzelle und basale Migration der Tochterzellen (**A**, **B**). ( $\blacktriangleright$ ) Apikale Migration einer Vorläuferzelle und deren apikale Teilung. (B) Basale Teilung im Telencephalon (E12.5). Die Tochterzellen (**A**, **B**) der basalen Zellteilung ( $\rightarrow$ ) wandern nach erfolgter Teilung in basaler Richtung aus der Ventrikularzone aus. Keine der beiden Tochterzellen wandert in apikaler Richtung. Auf Grund des kernlokalisierten GFP werden Zellkerne und deren Bewegung, nicht die Bewegung ganzer Zellen beobachtet. Die hier dargestellten Bilder sind Projektionen confocaler Einzelschnitte aus Z-Serien von insgesamt 100  $\mu\text{m}$  Tiefe (Z-Achse senkrecht zur Bildebene, Abstand der Einzelschnitte 5  $\mu\text{m}$ ). In A wurden aus diesem Stapel 100  $\mu\text{m}$  in B 10  $\mu\text{m}$  projiziert. (VZ: Ventrikularzone; M: Mitose; Zeitangaben, in den Aufnahmen unten links, in Minuten, --- apikal; \_\_\_ basale Grenze der Ventrikularzone; Balken in A, B: 10  $\mu\text{m}$ ).

**A** Apikale Teilung



**B** Basale Teilung



### Interkinetische Migration der Zellkerne

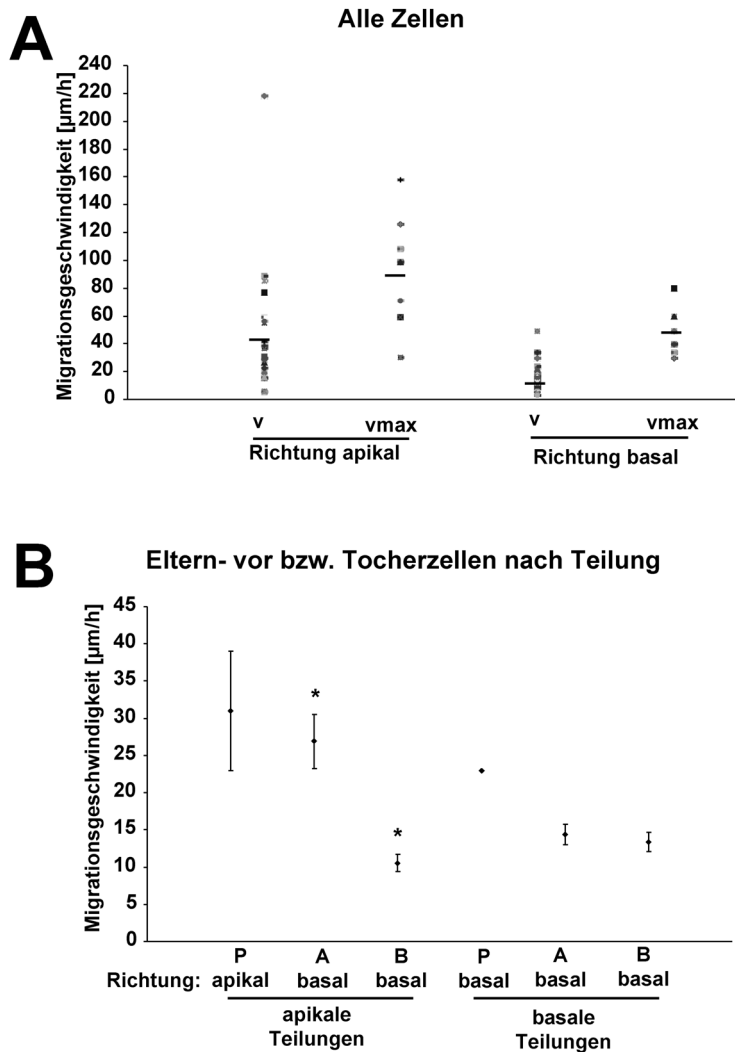
Die Übersicht über die ermittelten Migrationsgeschwindigkeiten der Zellkerne (interkinetische nukleare Migration) gibt einen Eindruck von der Bandbreite der Durchschnitts- und Maximalgeschwindigkeiten verschiedener Zellen (Abb. 25A). Die Durchschnittsgeschwindigkeit ist hier die durchschnittliche Geschwindigkeit zwischen Anfang und Ende einer Kernbewegung. Die Maximalgeschwindigkeit ist die größte Geschwindigkeit, die augenscheinlich schnelle Zellkerne während einer Transition erreichen. Die Zellen migrieren allgemein etwas schneller in apikaler als in basaler Richtung. Zudem scheint ein großer Anteil der Zellen in der basalen Ventrikularzone zu ruhen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der im Abschnitt 3.6 festgestellten Akkumulation stark GFP-positiver Zellen in der basalen Hälfte der Ventrikularzone. Es handelt sich wahrscheinlich um Zellen in S-Phase. Die S-Phase nimmt in diesem Stadium ca. 50 % der gesamten Zellzyklusdauer ein.

### Apikale Zellteilungen

Ein Beispiel für eine apikale Teilung ist in Abb. 24 gezeigt. Hier ist die Wanderung einer Zelle in Richtung apikaler Oberfläche zu sehen (➤), die sich zur Mitose abrundet. Eine andere Zelle (➔) teilt sich apikal in zwei Tochterzellen, die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in basaler Richtung wandern. Die quantitative Analyse mehrerer solcher Zellteilungen zeigt: Apikale Teilungen generieren Tochterzellen mit unterschiedlichem Migrationsverhalten (n=9 beobachtete Teilungen) (Abb. 25B), wobei die langsam wandernde Zelle tendenziell in der Ventrikularzone verbleibt (n=3/3). Die Dauer der Mitose, gemessen vom Abrunden der Zelle in der Metaphase bis zum Einsetzen der Cytokinese, lag bei 18.4+/-8.2 min (n=7). Die Zellteilungsebene, beurteilt nach der relativen Lage der Zellkerne der Tochterzellen in der Cytokinese (erkennbar durch die wieder eingetretene Lokalisierung von GFP in den Zellkernen, z.B. Abb. 24A, M bei t=30 & t=80), erscheint in 70% der Fälle horizontal bis oblique zur ventrikulären Oberfläche (0-60° bzw. n=10).

### Basale Zellteilungen

Eine tatsächliche Rolle basaler Zellteilungen in der Neurogenese impliziert deren zeitliche und räumliche Koexistenz mit GFP-positiven apikalen Zellteilungen. Tatsächlich konnten koexistierende Teilungen in statischen und videomikroskopischen Analysen beobachtet werden (Videomikroskopie: n=4 Experimente). In Abb. 24B ist eine solche basale Zellteilung gezeigt. Die Analyse mehrerer Aufnahmen ergab: Basale Teilungen generieren Tochterzellen mit gleichem Migrationsverhalten (n=5) (Abb. 25B), die aus der Ventrikularzone auswandern (n=4/4). Die Mitosedauer (gemessen wie oben) betrug 14.3+/-4.3 min. Die Zellteilungsebene (Kriterien wie oben) war in 50% der Mitosen horizontal bis oblique (n=4) (z.B. Abb. 24B, t=60).



**Abb. 25. Unterschiedliches Verhalten von Tochterzellen nach apikaler und basaler Zellteilung.** Auswertung der Videomikroskopie (als Beispiel siehe Abb. 24). Vereinte Daten aus E9.5-E10.5 Rhomb- und E11.5-E12.5 Telencephalon. (A) Wanderungsgeschwindigkeit in apikaler und basaler Richtung, Einzelbeobachtungen.  $v$  ist die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit zwischen Anfangs- und Endpunkt einer Kernbewegung,  $v_{\text{max}}$  die maximale Migrationsgeschwindigkeit während einer Bewegung. (Balken: Mittelwerte;  $v$  apikal  $n=21$ ;  $v_{\text{max}}$  apikal  $n=10$ ;  $v$  basal  $n=41$ ;  $v_{\text{max}}$  basal  $n=6$ ). (B) Gezeigt sind die Wanderungsgeschwindigkeiten der Zellkerne von Eltern- (**P**) vor bzw. Tochterzellen (**A**, **B**) nach der Teilung. Kerne von Tochterzellen apikaler Teilungen wandern mit signifikant unterschiedlicher Geschwindigkeit (\* Student-t-Test:  $P < 0.05$ ) in basaler Richtung, Tochterzellen basaler Teilungen zeigen keine Unterschiede. (apikale Teilungen  $n=9$ ; basale Teilungen  $n=4$ ; Fehlerbalken: SEM).

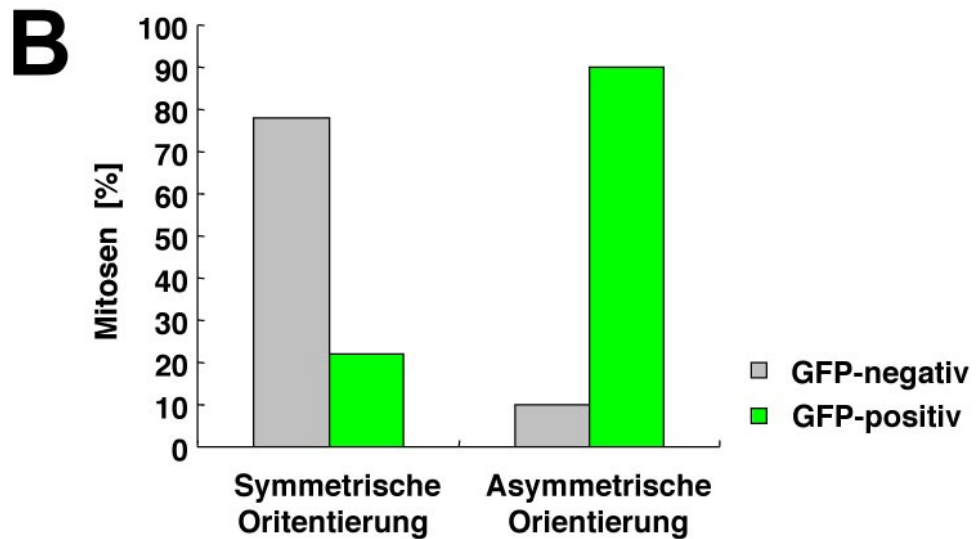
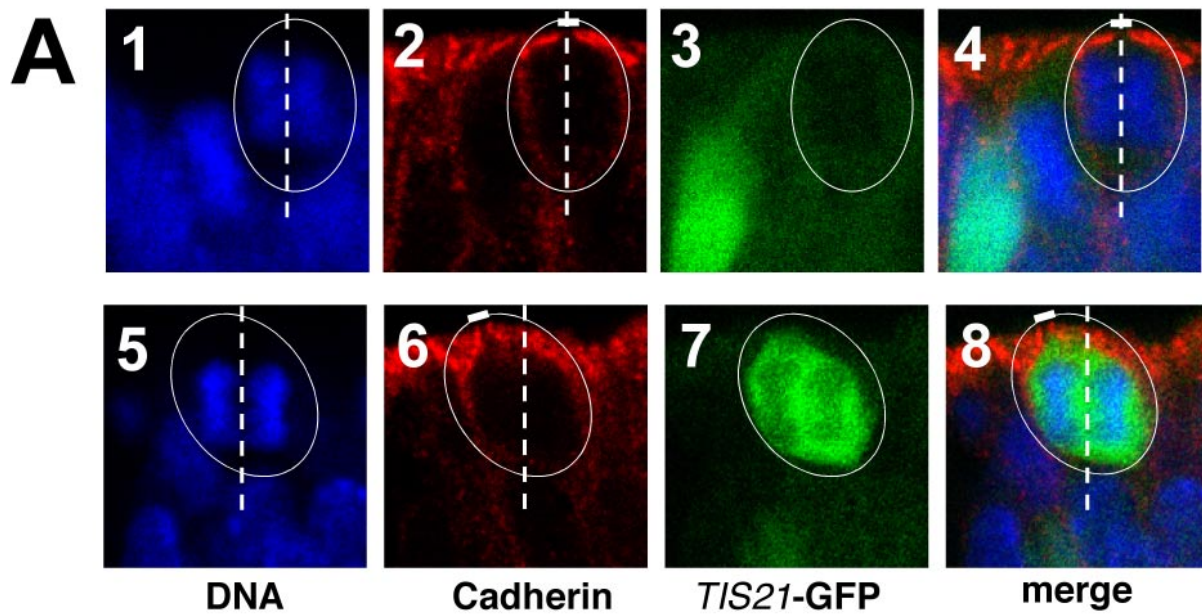
Aus den Geschwindigkeiten und Endpunkten der Migration der Tochterzellen nach apikalen bzw. basalen Teilungen können Aussagen zur Teilungssymmetrie abgeleitet werden (siehe Abschnitt 4.2): Apikale Teilungen sind asymmetrisch und generieren ein Neuron und wahrscheinlich eine Neuroepithelzelle, basale Teilungen sind symmetrisch und generieren zwei Neurone.

### 3.10 Die asymmetrische Verteilung apikaler Membran korreliert mit Neurogenese

Durch eine differentielle Analyse GFP-positiver vs. GFP-negativer Neuroepithelzellen sollten mögliche Steuerungsmechanismen des Umschaltens von Proliferation zu Neurogenese untersucht werden. Die Symmetrie der Verteilung apikaler Membran bzw. assoziierter *cell fate determinants* könnte dabei eine Rolle spielen. Korreliert der Übergang von proliferierenden zu im *cell fate* asymmetrischen (apikalen) Neurone-generierenden Zellteilungen in irgendeiner Weise mit einem Wechsel in der Symmetrie der Verteilung apikaler Membran?

In diesem Kontext sollte die Verteilung der apikalen Membran bei apikalen Teilungen in GFP-positiven (Neurone-generierenden) vs. GFP-negativen (proliferierenden) Neuroepithelzellen im *TIS21-GFP-knock in* analysiert werden (KII<sup>\*/wt</sup>). Die Verteilung apikaler Membran auf die Tochterzellen wurde aus der Orientierung der Zellteilungsebene relativ zur apikalen Membran in der Anaphase abgeleitet, zu einem Zeitpunkt, an dem keine Spindelrotation mehr auftritt. Die Teilungsebene und damit die Verteilung der Membran auf die Tochterzellen ist somit festgelegt. Die Teilungsebene wurde, wie von Röper (Röper, 2000) beschrieben, durch die Position der Chromosomen in Anaphase bestimmt und die apikale Membran als Prominin-positive, Cadherin-negative Lücke in der Plasmamembran identifiziert. Prominin ist ein Marker für die apikale Membran (Weigmann *et al.*, 1997), Cadherin für die basolaterale Plasmamembran. Es ist aber prinzipiell ausreichend, nur die Cadherin-Lücke zu betrachten (wie in Abb. 26).

Alle Klassifizierungen (Festlegung der Zellteilungsebene, Identifizierung der apikalen Membran, deren relative Orientierung und die Zuordnung zur GFP-positiven bzw. GFP-negativen Zellpopulation) wurden getrennt voneinander und durch zwei unabhängige Beobachter vorgenommen. Es wurde der Anteil GFP-negativer bzw. GFP-positiver Zellen in zellbiologisch symmetrischen (symmetrische Orientierung der Teilungsebene zur apikalen Membran, d.h. gleichmäßige Verteilung apikaler Membran auf beide Tochterzellen) und zellbiologisch asymmetrischen Teilungen (asymmetrische Orientierung der Teilungsebene zur apikalen Membran, d.h. ungleiche Verteilung apikaler Membran auf beide Tochterzellen) bestimmt. Die Auswertung vereinter Daten aus Mes-, Di- und Telencephalon (E9.5-E11.5) ergab: Zellbiologisch symmetrische Teilungen sind vorwiegend GFP-negativ (proliferierend), zellbiologisch asymmetrische Teilungen GFP-positiv (Neurone-generierend) (Abb. 26).



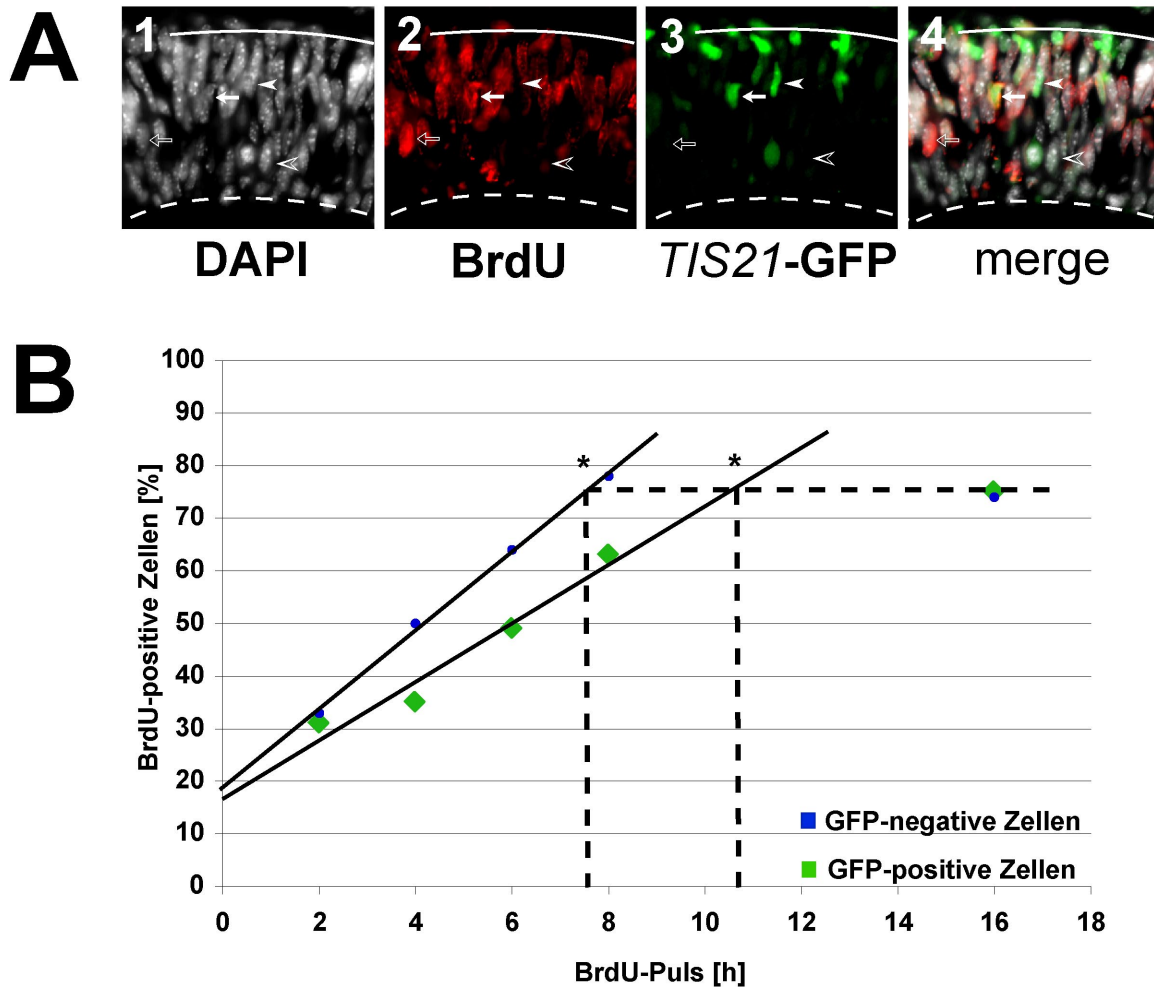
**Abb. 26. Die asymmetrische Verteilung apikaler Membran korreliert mit Neurogenese.** (A) Beispiel einer GFP-negativen Mitose (proliferierende Teilung, A1-4, eingekreiste Zelle) mit vertikaler Teilungsebene und symmetrischer Verteilung der apikalen Membran und einer GFP-positiven Mitose (Neurone-generierende Teilung, A5-A8, eingekreiste Zelle) mit ebenfalls vertikaler Teilungsebene aber asymmetrischer Verteilung der apikalen Membran. Saggitaler Kryostatschnitt durch das Mesencephalon ( $KI1^{*/wt}$ , E11.5) mit DAPI-Chromatinfärbung (A1 & A 5) und Immunhistochemie gegen Cadherin (A2 & A6). (A1 & A5) Die Teilungsebene (unterbrochene Linie) wurde anhand der Position der Chromosomen in Anaphase abgeleitet. Durch serielle Aufnahmen in Z-Ebene (hier: senkrecht zur Bildebene) wurde sichergestellt, dass die Teilungsebene der zur Auswertung herangezogenen Zellen senkrecht zur Bildebene verläuft (hier ist je nur der Einzelschnitt aus einer solchen Serie gezeigt, dessen Fokus in der Ebene der apikalen Membran liegt). (A2 & A6) Bestimmung der Orientierung der Teilungsebene relativ zur apikalen Membran. Die apikale Membran entspricht der Lücke (Balken) in der Cadherin-positiven basolateralen Membran (rot). (A3 & A7) *TIS21*-GFP-Expression. (B) Anteile GFP-negativer bzw. GFP-positiver Mitosen bei Teilungen mit symmetrischer und asymmetrischer Orientierung der Teilungsebene zur apikalen Membran. Quantifizierung von Bestimmungen wie in (A). (symmetrisch n=45; asymmetrisch n=21; vereinte Daten über das Mes-, Di-, Telencephalon und E9.5-E11.5). (In Zusammenarbeit mit Y. Kosodo und Katja Röper).

### 3.11 In Neurone-generierenden Neuroepithelzellen verlangsamt sich der Zellzyklus

Der Faktor Zeit bzw. die Zellzykluslänge, die auf Populationsebene mit fortschreitender Neurogenese zunimmt, wurde als ein weiterer möglicher Steuerungsmechanismus der Umschaltens von Proliferation zu Neurogenese diskutiert. Es ist bekannt, dass TIS21 selbst den Zellzyklus verlangsamen kann und deshalb interessant zu wissen, ob sich der Zellzyklus in der TIS21- bzw. GFP-positiven, Neurone-generierenden Zellpopulation gegenüber der proliferierenden verlangsamt.

Kumulative BrdU-Markierung ist eine Möglichkeit, die Zellzykluslänge innerhalb einer definierten Zellpopulation zu untersuchen (Nowakowski *et al.*, 1989). BrdU wird als Basenanalogon während der S-Phase in die DNA von Zellen eingebaut und kann später immunhistochemisch nachgewiesen werden. Über zunehmend längere BrdU-Pulse kann so der Anteil an Zellen bestimmt werden, die gerade in S-Phase sind bzw. die während des Pulses mindestens einmal die S-Phase durchlaufen haben. Im Zeitverlauf nimmt der Anteil BrdU-positiver Zellen linear zu und erreicht, wenn alle Zellen genau einmal die S-Phase durchlaufen haben, zum Zeitpunkt  $t_{\max}$  ein Plateau, der Anteil BrdU-positiver Zellen in der Population erreicht ein Maximum:  $\text{BrdU}_{\max}$ . Dieser Zeitpunkt ( $t_{\max}$ ) entspricht einer Zellzykluslänge ( $t_c$ ) abzüglich der Dauer der S-Phase ( $t_s$ ) ( $t_{\max} = t_c - t_s$ ). Der Achsenabschnitt (b) der Regression über den linearen Anstieg entspricht dem prozentualen Anteil der S-Phase an der gesamten Zellzykluslänge ( $b = t_s / t_c$ ). Mit diesen Beziehungen kann die Dauer von Zellzyklus und S-Phase errechnet werden.

Die TIS21-GFP-Linien bieten die Möglichkeit, diese Analyse getrennt für die GFP-negative bzw. GFP-positive Zellpopulation über GFP/BrdU-Doppelfärbungen BrdU-markierter Embryonen durchzuführen. Die Embryonen wurden durch intraperitoneale Injektion von 1.25 mg/h BrdU in schwangerere Weibchen markiert. Nach Pulslängen von 2, 4, 6, 8 und 16 h wurde der Anteil BrdU-positiver Zellen in der GFP-negativen bzw. GFP-positiven Zellpopulation in der Ventrikularzone zu Beginn der Neurogenese im Telencephalon (E10.5) durch Doppelimmunfärbungen gegen BrdU und GFP immunhistochemisch bestimmt (Abb. 27A) und quantitativ analysiert (Abb. 27B). Zur korrekten Bestimmung von  $\text{BrdU}_{\max}$  und somit der Zellzykluslänge, ist es erforderlich, dass die Dauer des längsten BrdU-Pulses in der Plateauphase liegt. Da der Zellzyklus in diesem Stadium im Populationsdruchschnitt (d.h proliferierende und Neurone-generierende Zellen) ca. 9 h beträgt (Takahashi *et al.*, 1995), erschien es plausibel für die Neurone-generierende Population eine Zellzykluslänge von nicht mehr als 16 h anzunehmen. Ein Puls von 16 h sollte deshalb auf jeden Fall ausreichend sein, um  $\text{BrdU}_{\max}$  auch für die sich langsam teilende Population korrekt zu bestimmen. Somit errechnet sich eine Zellzyklusdauer von 9.1 h für die GFP-negative und 12.7 h für die GFP-positive Population (Tab. 6). Die Verlangsamung des Zellzyklus korreliert also tatsächlich auf zellulärer Ebene mit dem Übergang von Proliferation zu Neurogenese: GFP-positive Zellen in der Ventrikularzone haben einen 40 % langsameren Zellzyklus als GFP-negative.



**Abb. 27. Neurone-generierende Neuroepithelzellen haben einen langsameren Zellzyklus als proliferierende.** Kumulative BrdU-Markierung von Embryonen (KI1<sup>+/wt</sup>, E10.5) mit 2-16h Pulslänge. (A) Saggitaler Kryostatschnitt durch das Telencephalon nach 2 h BrdU-Puls mit DAPI-Chromatinfärbung (A1) und immunhistochemischer Färbung gegen BrdU (A2) und GFP (A3). GFP muss hier indirekt über einen Antikörper nachgewiesen werden, da die endogene GFP-Fluoreszenz durch die Säurebehandlung im BrdU-Färbeprotokoll verschwindet. (▶ GFP-positive, BrdU-negative Zelle; → GFP-positive, BrdU-positive Zelle; > GFP-negative, BrdU-negative Zelle; ⇒ GFP-negative, BrdU positive Zelle; ---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels). (B) Quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen in (A). Der Anteil BrdU-positiver Zellen in der Ventrikularzone innerhalb der GFP-negativen bzw. GFP-positiven Zellpopulation wurde in Kryostatschnitten quantifiziert. (\*) Übergang von dem linearen Anstieg in die Plateauphase ( $t_{max}$ ). (GFP-positive Zellen:  $y = 5.5x + 17$ ,  $R^2 = 0.9528$ ; GFP-negative Zellen:  $y = 7.45x + 19$ ,  $R^2 = 0.9976$ ). (In Zusammenarbeit mit F. Calegari).

**Tab. 6: Zellzyklusparameter in GFP-negativen und GFP-positiven Zellen in der Ventrikularzone.**

	GFP-negativ	GFP-positiv
BrdU <sub>max</sub> [%]	74	75
$t_{max}$ [h]	7.4	10.5
$t_s$ [h]	1.7	2.1
$t_c$ [h]	9.1	12.7

Diese Tabelle bezieht sich auf Daten aus Abb. 27. (Erläuterungen siehe Text).



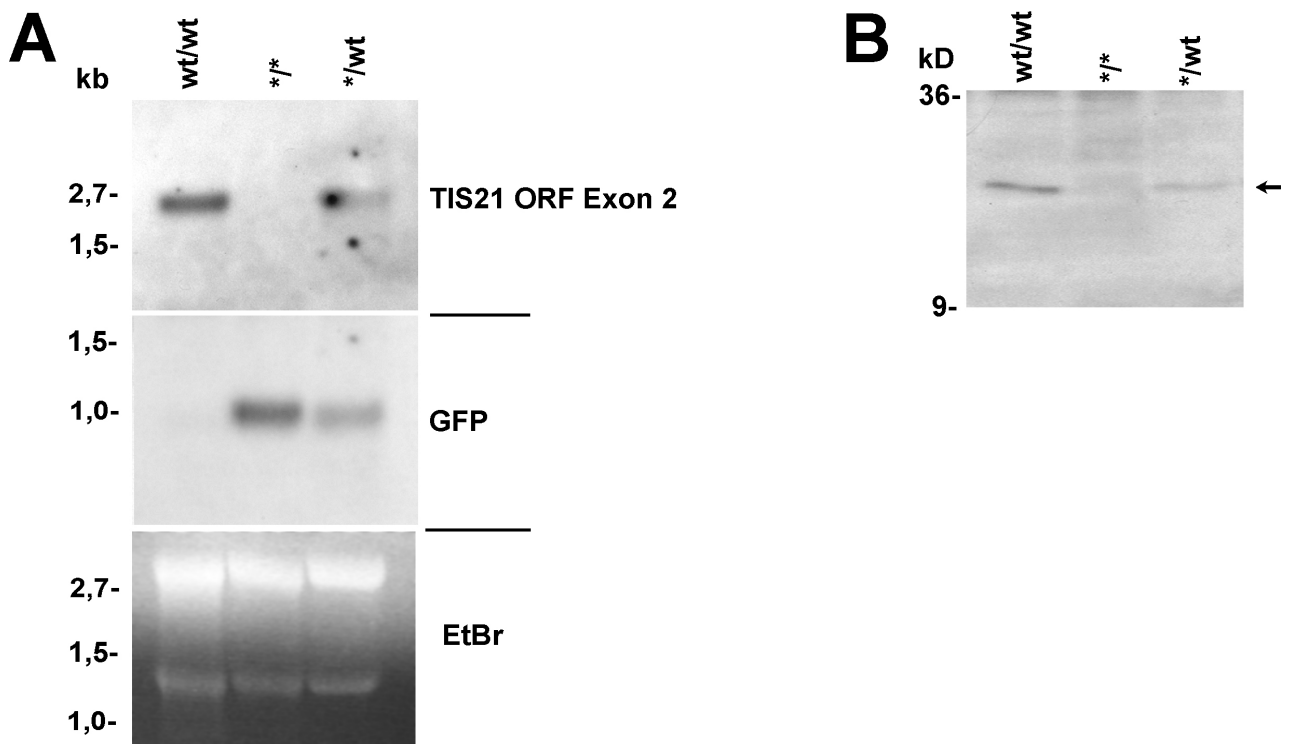
### 3.12 KI1-homozygote Tiere sind ein TIS21-*knock out*

Das prominente Expressionsmuster von TIS21 im Neuroepithel, insbesondere in Verbindung mit der gezeigten spezifischen Zellzyklusverlangsamung in Neurone-generierenden (TIS21-positiven) Neuroepithelzellen deutet darauf hin, dass TIS21 als antiproliferatives Gen selbst direkt an der Steuerung der Neurogenese teilhat. Bis jetzt ist wenig über die Funktion von TIS21 *in vivo* bekannt, alle funktionellen Daten stammen gänzlich aus *in vitro*-Experimenten.

Eine Möglichkeit, die physiologische Funktion von Genen zu untersuchen, ist eine phänotypische Beschreibung einer funktionellen Null-Mutation des Gens bzw. des Proteins. Das KI1-Allel sollte ein TIS21-*knock out*-Allel sein, es sollte kein Protein mehr translatiert werden (Abb. 10). Einzig das offene Leseraster von TIS21 in Exon 2 könnte eventuell in ein N-terminal trunkeiertes Protein translatiert werden – dieser Abschnitt des Gens sollte aber in KI1 nicht mehr transkribiert bzw. translatiert werden, da das SV40-Polyadenylierungssignal der GFP-Expressionskassette die Transkription am Ende des ersten Exons beenden sollte (Abb. 10). Dies wurde im Northern- und Western-Blot mit einer Sonde gegen den ORF von TIS21 in Exon 2 bzw. einem Antikörper (1511), ebenfalls gegen ein Epitop in Exon 2 überprüft. Der Test wurde mit Extrakten aus E12.5 Gehirn durchgeführt, das in diesem Stadium TIS21 besonders stark exprimiert. Ein Effekt des *knock in* auf TIS21-mRNA bzw. Protein sollte deshalb gut zu sehen sein. Im Northern-Blot ist, wie erwartet, kein TIS21-Transkript zu detektieren (Abb. 28A). Bei der Detektion mit der GFP-Sonde ist eine Bande von 1 kb zu erkennen. Ein Transkript dieser Länge wird erwartet, falls das SV40-Polyadenylierungssignal der GFP-Expressionskassette die Transkription terminiert. Konsistenterweise ist auch auf Proteinebene kein translatiertes TIS21-Protein mehr nachzuweisen (Abb. 28B). Das KI1-Allel ist demnach ein Null-Allel für TIS21, KI1-homozygote Tiere sind ein TIS21-*knock out*.

Die hier vorgestellten Analysen wurden an Mäusen in einem 50% 129/50% C57Bl6-Hintergrund durchgeführt. In diesem Hintergrund ist der TIS21-*knock out* nicht letal - wie in Abb. 12 zu sehen befinden sich KI1-homozygote Tiere in der F2-Generation. Homozygote Tiere sind fertil und zeigen keine auffällig erhöhte Sterblichkeit. Der Anteil an wt, homo- und heterozygoten Nachkommen entspricht den Mendelschen Verhältnissen.

In einer ersten Analyse wurden die Neurogenese im Embryo und verschiedene TIS21-exprimierende Zellsysteme in adulten Tieren untersucht.

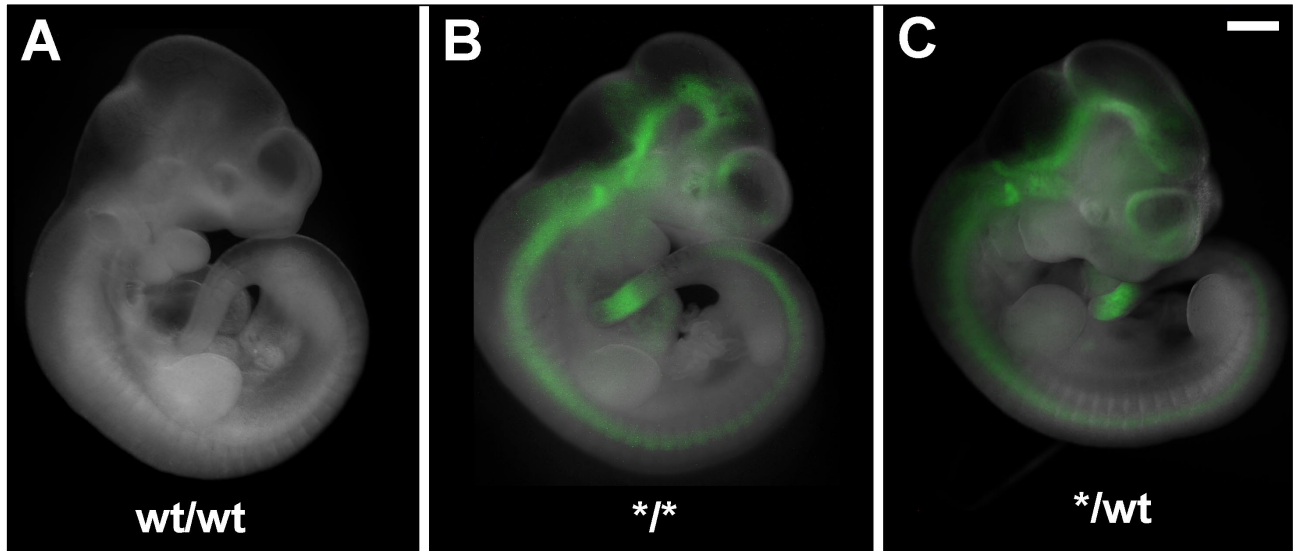


**Abb. 28. TIS21-mRNA- und Proteinexpression sind in KI1-homozygoten Tieren reduziert.** (A) Northern-Blot eines 2% Formaldehydgels mit je 20  $\mu\text{g}$  gesamt-RNA aus Gehirn (E12.5). Die Detektion erfolgte mit einer Sonde spezifisch für den ORF von TIS21 in Exon 2 bzw. für den ORF von GFP. Die endogene TIS21-mRNA (2633 bp) (1) ist in heterozygoten Tieren reduziert (3) und in homozygoten (2) nicht zu detektieren. Signal für das GFP-Transkript (924 bp) ist im Wildtyp nicht vorhanden und in homozygoten Tieren stärker als in heterozygoten. (EtBr: Ethidiumbromid-Färbung des RNA-Gels). (B) Western-Blot eines 15% Polyacrylamidgels mit je 30  $\mu\text{g}$  Proteinlysate aus Gehirn (E12.5). Der polyklonale Peptidantikörper 1511 gegen ein Epitop codiert von Exon 2 des TIS21-Gens detektiert das TIS21-Protein (158 AA, 17 kD) in Wildtyp (1) und (reduziert) in heterozygoten Tieren (3), jedoch nicht in homozygoten Tieren (2).

### 3.13 In TIS21-knock out-Mäusen verläuft die Neurogenese normal

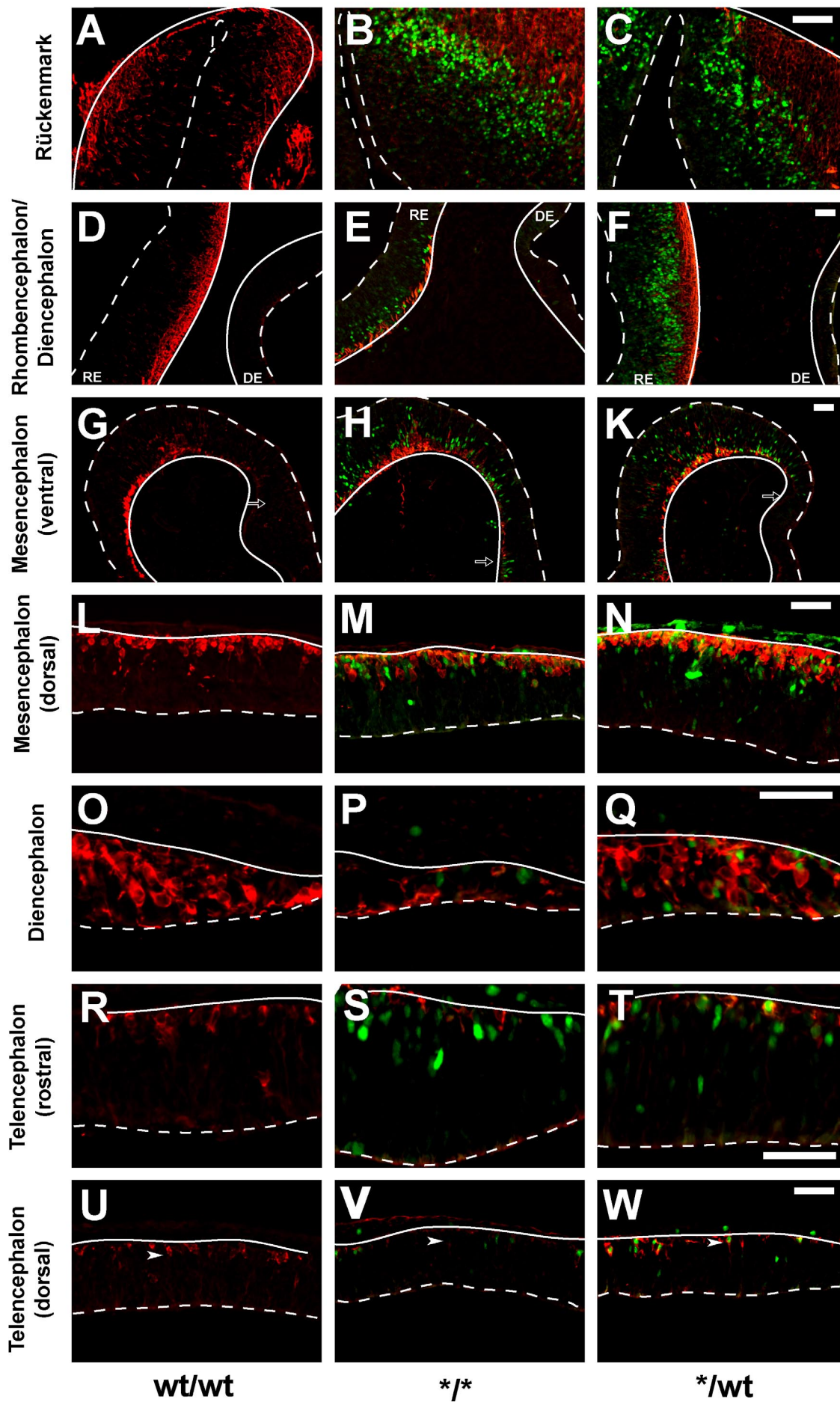
Wie erwähnt, wirft das besondere Expressionsmuster von TIS21 während der Neurogenese die Frage auf, inwieweit eine Null-Mutation Einfluss auf das *timing* des Übergangs von Proliferation zu Neurogenese hat, und so zu einer Verschiebung der neurogenetischen Gradienten führt. Generell sollte man einen „quantitativen“ Phänotyp (eine Zunahme der Zellzahl durch Funktionsverlust eines antiproliferativen Gens) erwarten. Auf Grund von fehlendem TIS21 sollten die Neuroepithelzellen also weiter proliferieren statt differenzierende Teilungen einzuleiten – die Neurogenese sollte verzögert einsetzen. Wie in Abb. 29 & 30 zu sehen, scheint dies nicht der Fall. Die Embryonen zeigen im *wholemout* keinen morphologisch erkennbaren Phänotyp (Abb. 29). Die GFP-Expression ist qualitativ nicht von der in heterozygoten Tieren zu unterscheiden. Auch bei detaillierterer Analyse ist keine Veränderung festzustellen: Die Neurogenese verläuft in *knock out*-Embryonen qualitativ normal (Abb. 30). Ein quantitativer Phänotyp, z.B. ein Zunahme von Neuronen in *knock*

*out*-Tieren bzw. eine Veränderung der Zellzyklusparameter (eine Verringerung der beobachteten Zellzykluszunahme spezifisch in der GFP-positiven Zellpopulation) wurde noch nicht untersucht.



**Abb. 29. TIS21-*knock out*-Embryonen zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp.** GFP-Expression in *wholemounds* wt, homo- und heterozygoter Embryonen (wt,  $KI1^{*/}$ ,  $KI1^{*/wt}$ , E10.5). Die Embryonalentwicklung homozygoter Embryonen verläuft normal. Homozygote Tiere exprimieren auf Grund der zwei Allele mehr GFP, das Fluoreszenzsignal ist stärker. (A-C gleiche Vergrößerung; Balken 500  $\mu$ m).

**Abb. 30. (Seite 101). Die Gradienten der Neurogenese verlaufen im TIS21-*knock out* normal.** GFP-Expression (grün) in sagittalen Kryostatschnitten wt, homo- und heterozygoter Embryonen (wt,  $KI1^{*/}$ ,  $KI1^{*/wt}$ , E10.5) mit immunhistochemischer Färbung gegen  $\beta$ -III-Tubulin (rot). (A-C) Rückenmark, (D-F) Rhomb-(RE)-/Di-(DE)-encephalon, (G-K) ventrales, (L-N) dorsales Mesencephalon, (O-Q) rostrales Diencephalon, (R-S) rostrales und (U-V) dorsales Telencephalon. Im Vergleich mit wt und heterozygoten Tieren scheinen die Gradienten der Neurogenese im *knock out* qualitativ nicht verändert: z.B. Rhombencephalon vs. Diencephalon (D-F), anteriore Grenze der Neurogenese im ventralen Mes-/ bzw. Diencephalon (G-K) ( $\Rightarrow$ ) und das Auftreten erster Neurone im dorsalen Telencephalon (U-W) ( $\blacktriangleright$ ). (---apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; A-C, D-K, L-N, O-T, U-V jeweils gleiche Vergrößerung. Balken in C, F, N, Q, W: 50  $\mu$ m).



### 3.14 Das TIS21-Gen ist in adulten Geweben exprimiert

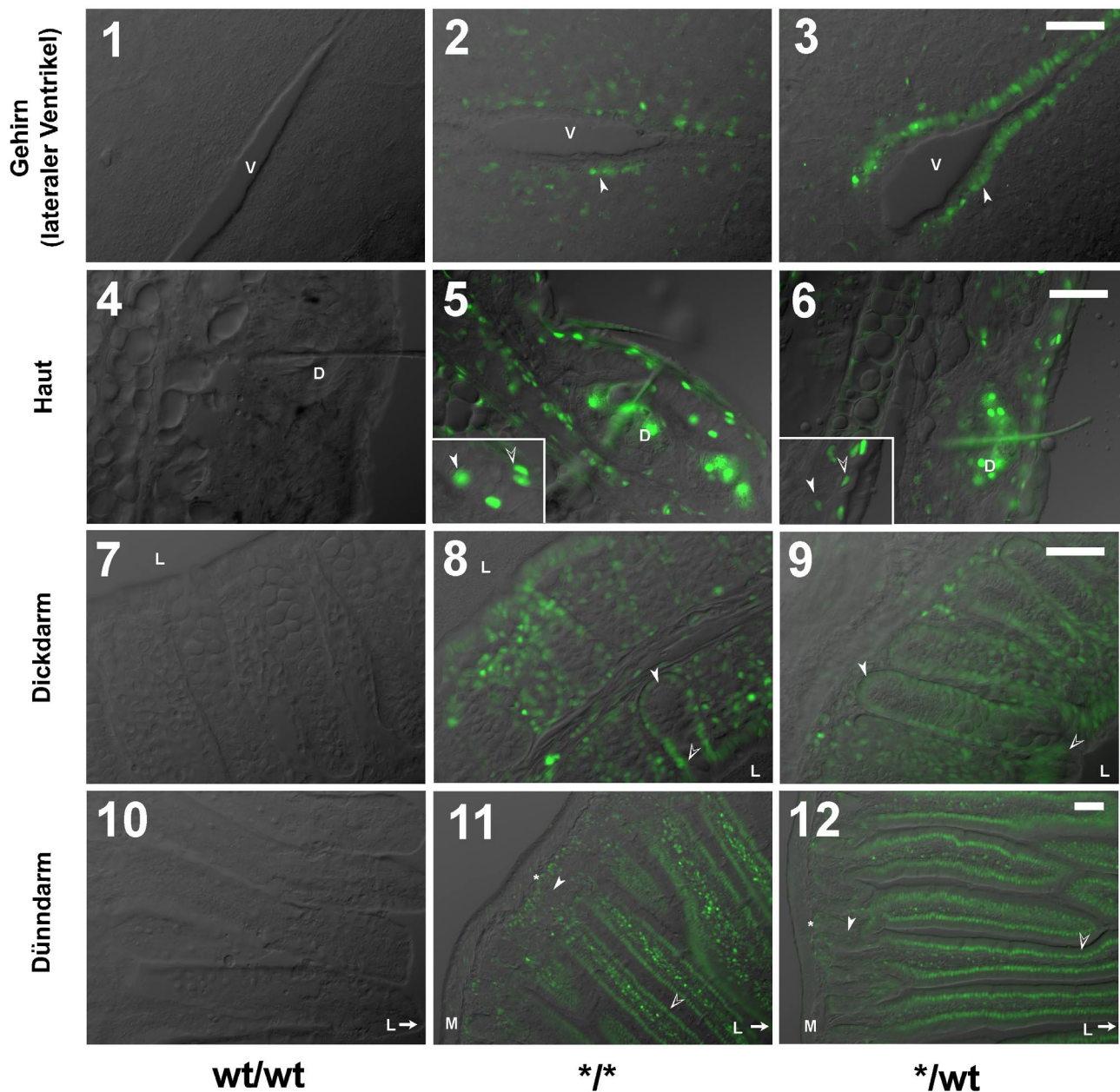
Hinweise auf die physiologische Funktion von Genen kann natürlich auch das Expressionsmuster liefern – auch wenn sich bestenfalls Korrelationen aber keine Kausalzusammenhänge daraus ableiten lassen. In embryonalen Tieren ist das Neuroepithel eine Hauptexpressionsdomäne. TIS21 ist dort in Zellen exprimiert, die von Proliferation in differenzierende Zellteilungen übergehen, was eine Funktion bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen impliziert. Im Folgenden wurden in adulten Tieren verschiedene Organe (Abb. 31) und das Blutsystem (Abb. 32) anhand ihrer GFP-Fluoreszenz auf die Expression von TIS21 untersucht. Wir wollen hier die GFP-Expression der Expression von TIS21-mRNA und -Protein gleichsetzen (siehe hierzu Abschnitt 4.1).

Allgemein scheint TIS21 in bestimmten Zellpopulationen von Geweben exprimiert, in denen Proliferations- und Differenzierungsprozesse ablaufen (Abb. 31, 32 & Tab. 7). Im Vergleich zwischen embryonalen und adulten Formen von Organen bzw. zwischen proliferierenden, differenzierenden und ausdifferenzierten Zellpopulationen innerhalb von Geweben wird dies deutlich (vgl. Tab. 3, 4 & 7): Das adulte Gehirn ist bis auf Zellen der Subventrikularzone bzw. Ependymzellen GFP-negativ (Abb. 31.3). Herzmuskelzellen exprimieren ebenfalls kein GFP (nicht gezeigt), obwohl beide Organsysteme (Gehirn und Herz) während der Entwicklungsphase GFP-Expression zeigen (Abb. 13D & 14D).

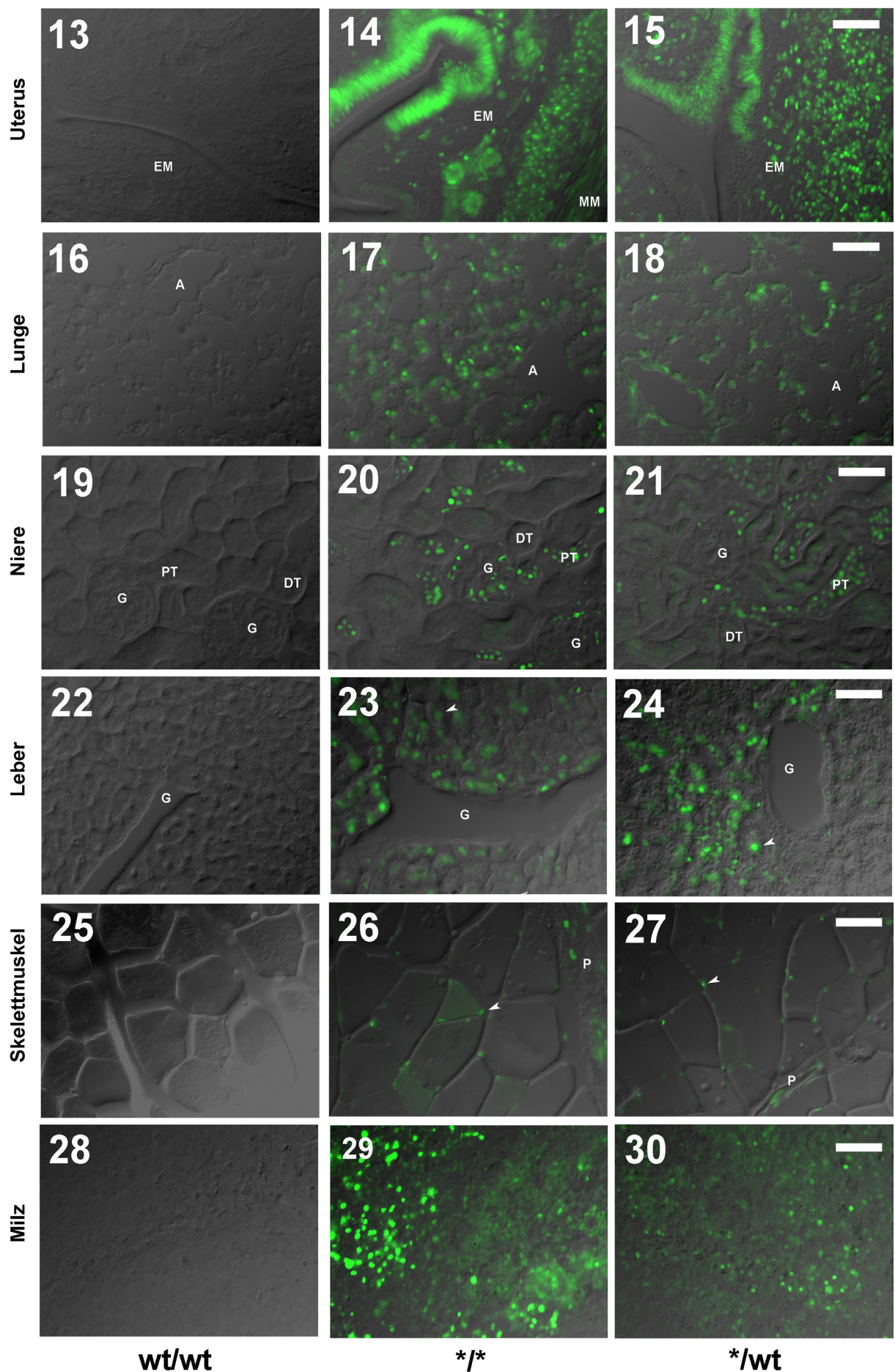
In anderen adulten Geweben ist die Expression von TIS21 ebenfalls mit Proliferations- und Differenzierungsvorgängen verbunden: In der Haut ist eine Subpopulation basaler Zellen GFP-positiv (Abb. 31.6), die GFP-positiven apikalen Zellen sind wahrscheinlich keratinisierende Zellen. Eine Rolle von TIS21 in apoptotischen Zellen wird diskutiert, was diese Expression erklären könnte (Mesner *et al.*, 1995). Im Dick- (Abb. 31.9) und Dünndarm (Abb. 31.12) sind die in den Krypten lokalisierten Stammzellen GFP-negativ, mit zunehmender Differenzierung von den Krypten zu den Villi steigt die GFP-Expression an. Ob TIS21 vor (analog zum Neuroepithel) oder erst nach der letzten Zellteilung exprimiert wird, wurde nicht untersucht.

Weitere TIS21-Expressionsdomänen, die sich nicht auf den ersten Blick in Proliferations-/Differenzierungsprozesse einordnen lassen, sind: sekretierende Zellen in Haut und Darm (Drüsenzellen, Abb. 31.6, Paneth-Zellen, Abb. 31.12), das Endometrium des Uterus (Abb. 31.15) (Auffällig ist die scharfe Grenze der GFP-Expression), Lunge (Abb. 31.18), proximale Tubuli und Glomeruli in der Niere (Abb. 31.21), Hepatocyten nahe der Gallengänge (Abb. 31.24), Muskelzellen der quergestreiften (Abb. 31.27) und glatten Muskulatur (Abb. 31.11, 31.12 & 31.14).



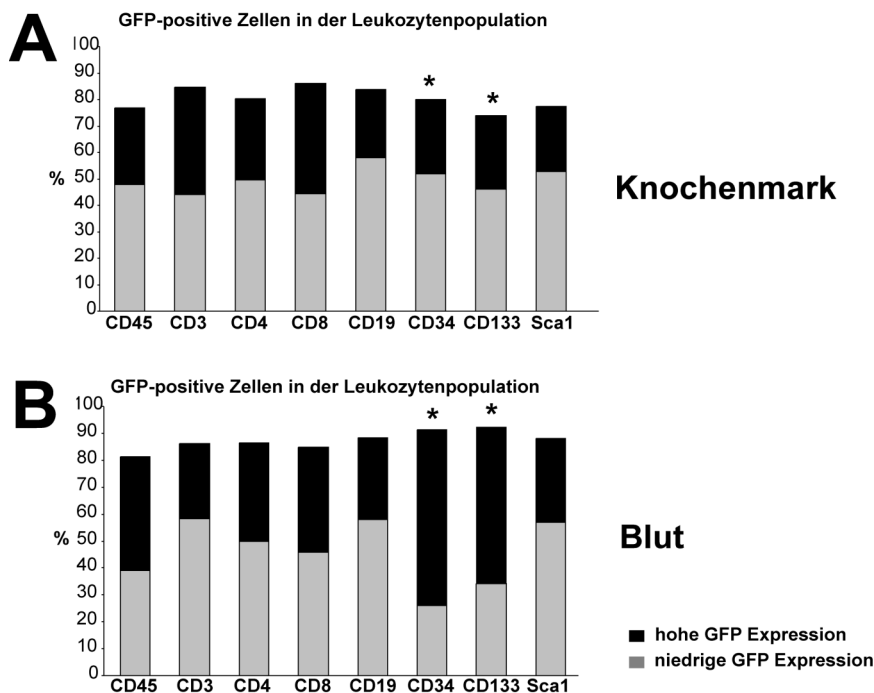


**Abb. 31. Die Expression von *TIS21*-GFP in Geweben adulter Tiere zeigt: (i) *TIS21* ist in bestimmten Zellpopulationen exprimiert, und (ii) ein *knock out* bewirkt keine offensichtlichen qualitativen Veränderungen in Bezug auf Morphologie und *TIS21*-exprimierende Zellpopulationen.** Kryostatschnitte von Geweben aus wt, homo- und heterozygoten Tieren (wt, *KII<sup>\*/\*</sup>*, *KII<sup>\*/wt</sup>*, E10.5). (1-3) Im Gehirn ist GFP nur in Zellen der Ependym/Subventrikularzone (➤) exprimiert. (V: lateraler Ventrikel). (4-6) In der Haut sind glanduläre Zellen in den Talgdrüsen (D) sowie basale (➤) und apikale (➤) Zellen der Epidermis GFP-positiv. (7-9) Im Dickdarmepithel (➤) exprimieren Zellen mit zunehmender Differenzierung (L: Lumen; ➤ proliferierende Epithelzellen der Krypten). (10-12) Im Dünndarmepithel steigt die GFP-Expression von der proliferierenden Stammzellpopulation (➤) zu differenzierten Epithelzellen an (➤). Positiv sind P-Zellen (\*) und Zellen der glatten Muskulatur (M). (L: Lumen). **(Seite 104)** (13-15) In Epithelzellen des Endometriums (EM) ist eine auffällige Expressionsgrenze morphologisch nicht unterscheidbarer Zellen zu erkennen. Zellen der glatten Muskulatur des Myometriums (MM) sind GFP-positiv. (16-18) Expression in der Lunge. (A: Alveoli). (19-21) In der Niere ist die Expression auf proximale Tubuli (PT) und Glomeruli (G) begrenzt. (DT: distaler Tubulus). (22-24) In der Leber sind Hepatocyten (➤) GFP-positiv.(G: Gallengang). (25-27) Expression in Zellen des quergestreiften Skelettmuskels (➤) und Endothelzellen (P). (28-30) Hinweis auf eine potentielle Funktion von *TIS21* im Blutssystem ist die sehr hohe Expression in der Milz. (1-9, 10-12, 13-30 jeweils gleiche Vergrößerungen. Alle Balken: 50  $\mu$ m).



Eine starke GFP-Expression ist in der Milz (Abb. 31.30) und insbesondere im adulten Thymus zu finden (nicht gezeigt), ein Hinweis auf die Expression von TIS21 in Zellen des Bluts bzw. des blutbildenden Systems.

Um diese Zellen näher zu bestimmen, wurden Leukozyten aus Knochenmark und Blut anhand ihrer Oberflächenmarker charakterisiert und der Anteil der GFP-exprimierenden Zellen in den Subpopulationen ermittelt. Dabei wurde die Stärke der GFP-Expression in zwei Kategorien eingeteilt (Abb. 32): Der Schwellenwert für starke Expression liegt um einen Faktor 10 über dem für schwach exprimierende Zellen. Die untersuchten Marker sind CD45 als genereller Leukozytenmarker, CD3, CD4 und CD8 für T-Lymphocyten, CD19 für B-Lymphocyten. CD34, CD133 und Sca-1 sind Stammzellmarker. Ca. 80% der Zellen in den einzelnen Subpopulationen sind positiv für GFP. GFP ist in allen Leukozytenpopulationen, inklusive der Stammzellen (CD34, CD133, Sca-1), in Knochenmark und Blut exprimiert. Leukozyten durchlaufen beim Übergang vom Knochenmark ins Blut einen Reifungsprozess. Interessanterweise steigt die GFP-Expression bei den CD34- und CD133-positiven Stammzellen im Blut gegenüber dem Knochenmark an und liegt im Blut, nicht aber im Knochenmark, über dem der differenzierteren Populationen (CD3-CD19) (\*) (Abb. 32). Die GFP-Expression nimmt zudem innerhalb der Stammzellpopulation beim Übergang in reifere Formen (Blut) zu (steigender Anteil stark exprimierender Zellen) (\*) (Abb. 32).



**Abb. 32. Expression von TIS21-GFP in Leukozyten.** FACS-Analyse oberflächenmarkierter Leukozytenpopulationen aus (A) Knochenmark und (B) Blut adulter Tiere (K11<sup>+/wt</sup>). Die Leukozyten wurden entsprechend ihrer Oberflächenmarker typisiert und der Anteil GFP-exprimierender Zellen innerhalb der Subpopulationen bestimmt. Auffällig ist der Anstieg der GFP-Expression in den Stammzellpopulationen CD 34 und CD133 beim Übergang vom Knochenmark ins Blut (\*). (niedrige Expression 10-100, hohe Expression 100-1000 willkürliche Fluoreszenz-Einheiten).



Tab. 7. TIS21-Expression in Geweben adulter Tiere.

Organ	Expression	Zelltyp
Gehirn	-	Ependym-/SVZ-Zellen
Herz	-	Myocardzellen
Haut	+	Basale Zellen keratinisierende Zellen Zellen in den Talgdrüsen
Dickdarm	+	differenzierende epitheliale Zellen
Dünndarm	+	differenzierende epitheliale Zellen Paneth-Zellen
Uterus	+	Epitheliale Zellen
Lunge	+	n.d.
Niere	+	Epitheliale Zellen (proximale Tubuli und Glomeruli)
Leber	+	Hepatocyten
Skelettmuskel	+	Muskelzellen
Glatter Muskel	+	Muskelzellen
Milz	+	n.d.
Thymus	+	n.d.
Knochenmark	+	Lymphocyten Monocyten Granulocyten Stammzellen
Blut	+	Lymphocyten Monocyten Granulocyten Stammzellen

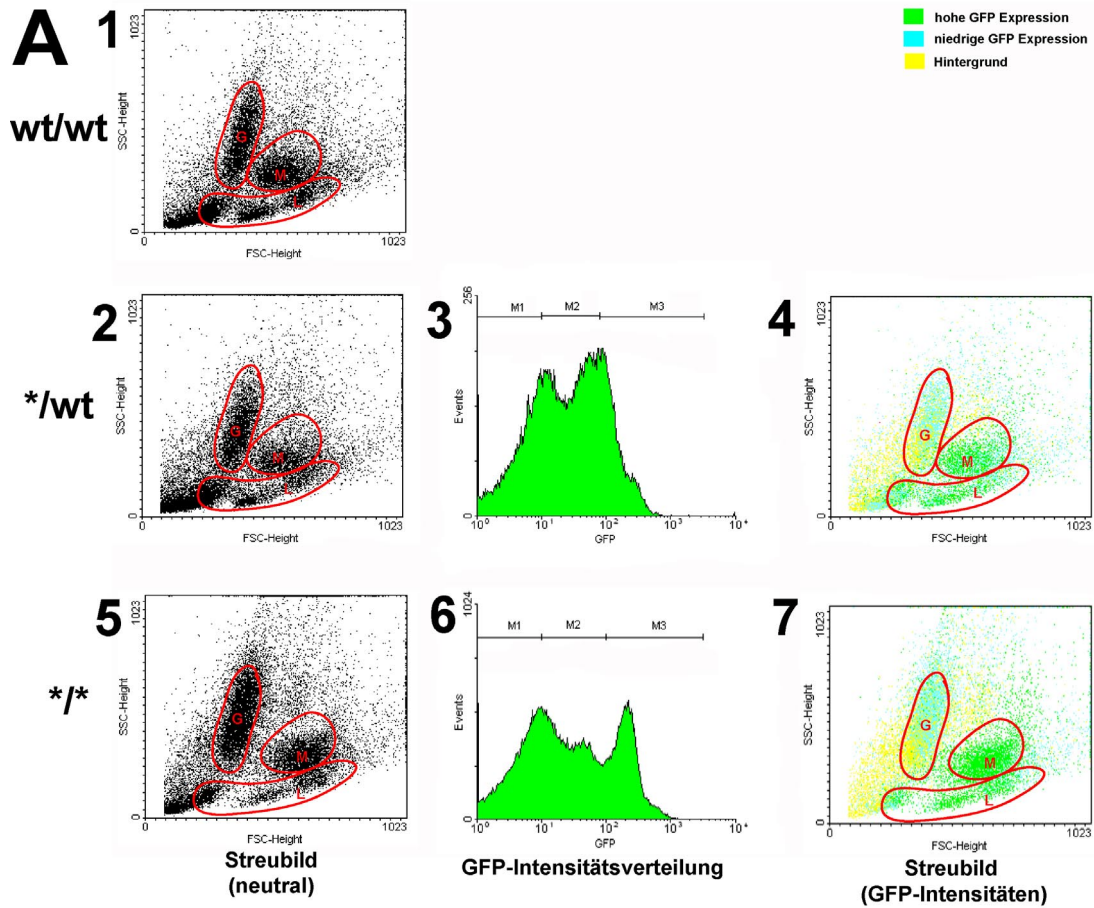
(n.d.: nicht bestimmt).

### 3.15 TIS21-knock out Mäuse zeigen ein verändertes Blutbild

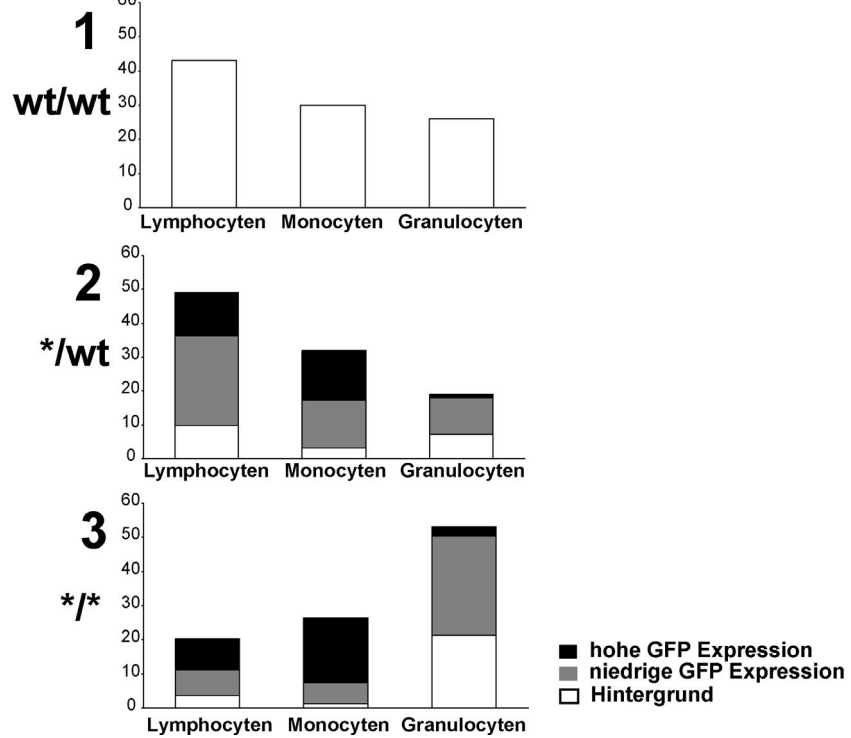
Die von einem TIS21-knock out primär betroffenen Zellpopulationen sind in den untersuchten adulten Organen in ihrer Verteilung auf den ersten Blick unverändert (Abb. 31, KI1<sup>\*/\*</sup> vs. KI1<sup>\*/wt</sup>). Wie bereits angesprochen, könnte man auf Grund der antiproliferativen Wirkung von TIS21 einen „quantitativen“ Phänotyp erwarten, d.h. bestimmte Zellpopulationen wären in ihrem Anteil bzw. absoluten Zahl verändert. Quantitative Veränderungen sollten insbesondere in Zellsystemen mit sehr hoher TIS21-Genexpression auftreten, z.B. im Blutsystem. Leukozyten in Knochenmark und Blut von Wildtyp, hetero- und homozygoten adulten Tieren wurden durch CD45 identifiziert. Anhand der Streubilder im FACS wurde die Zusammensetzung der Leukozytenpopulation aus Lymphocyten, Monocyten und Granulocyten und die GFP-Intensitätsverteilung in diesen Leukozytenpopulationen bestimmt (Abb. 33). Der Vergleich von Wildtyp, hetero- und homozygoten Tieren zeigt: Die Zusammensetzung der Leukozytenpopulation in Wildtyp und heterozygoten Tieren ist ähnlich, im knock out ist aber der Anteil der Granulocytenpopulation zu Lasten der Lymphocytenpopulation erhöht (Abb. 33A1, 33A2, 33A5, 33B1-3). Die Werte in B entsprechen dem Anteil der Populationen L, M, G an der Gesamtzahl der Leukozyten L+M+G in den Streubildern Abb. 33A1, 33A2 & 33A5. Die qualitative Veränderung in der GFP-Intensitätsverteilung deutet auf eine Veränderung einer

bestimmten Zellpopulation hin. Wäre alles unverändert würde man lediglich eine Verschiebung des Histogramms (Abb. 33A3 & 33A6) zu etwa zweifach höheren Werten (auf Grund zwei exprimierender Allele) erwarten. Die Werte für starke Expression im homozygoten Tieren wurden verdoppelt, d.h. Veränderungen in der Signalstärke einer Population sind ein tatsächlicher phänotypischer Effekt. Interessanterweise ist der Anteil an stark und schwach GFP-exprimierenden Zellen in der Granulocytenpopulation in hetero- und homozygoten Tieren ähnlich, ist aber in der Mono-, und Lymphocytenpopulation zugunsten stark exprimierender Zellen in Homozygoten verändert (Abb. 33B). Die Veränderung des Anteils der einzelnen Subpopulationen an der CD45-positiven Population korreliert also nicht mit der GFP-Intensitätsverteilung: Die Granulocytenpopulation nimmt zu, exprimiert aber nicht mehr an GFP.

**Abb. 33. (Seite 108). Im *TIS21-knock out* ist der Anteil an Lymphocyten im Knochenmark erniedrigt und der an Granulocyten erhöht.** (A) FACS-Analyse CD45-positiver Zellpopulationen adulten Tieren ( $KI1^{*/k}$ ,  $KI1^{*/wt}$ ,  $wt/wt$ ). (1, 2, 5) Neutrales Streubild. (L: Lymphocyten; M: Monocyten; G: Granulocyten). Das neutrale Streubild des Wildtyps ist mit dem heterozygoter Tiere vergleichbar. Im *knock out* ist der Anteil Granulocyten zu Lasten der Leukocyten erhöht. (M: Monocyten). (3, 6) Verteilung der GFP-Intensitäten. (M1: Hintergrundfluoreszenz; M2: niedrige GFP-Expression; M3: hohe GFP-Expression). Die Schwellenwerte wurden entsprechend der lokalen Maxima der Populationsverteilung gesetzt. (4, 7) Streubild mit GFP-Intensitäten. (B) Anteil an Lympho-, Mono- und Granulocyten an der CD45-positiven Gesamtpopulation. Die Einteilungen in niedrig und hoch exprimierend wurden für die Kopienzahl des *TIS21*-GFP-Allels korrigiert (Werte wie in Abb. 32). (In Zusammenarbeit mit D. Freund).



**B** Anteil von Lympo-, Mono- und Granulocyten an der CD45+ Gesamtpopulation, und GFP-Expression in diesen Subpopulationen



### 3.16 siRNA unterdrückt spezifisch die Genexpression im Neuroepithel

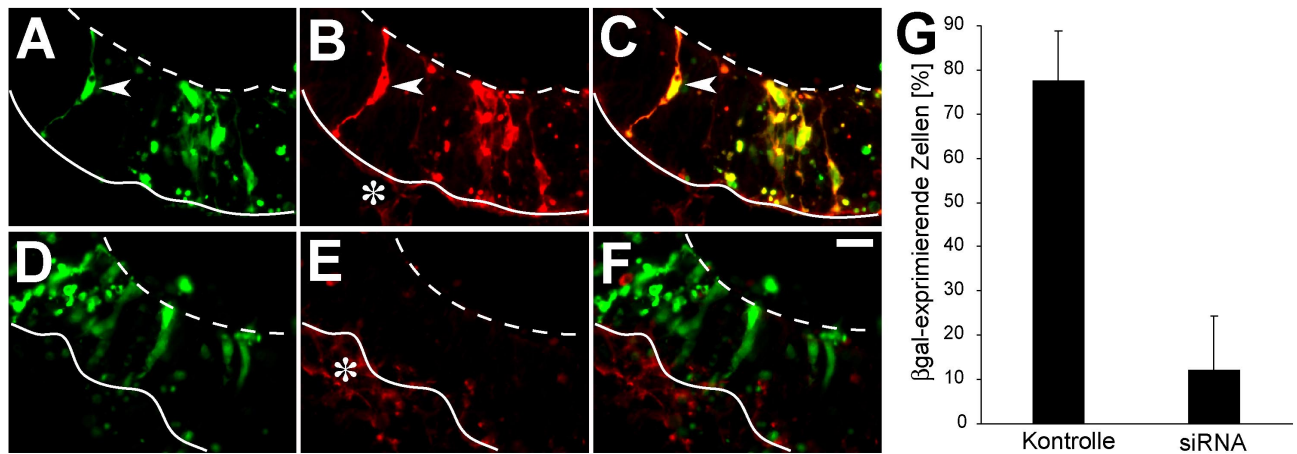
Für viele experimentelle Ansätze wäre es wünschenswert, die Genexpression zu einem bestimmten Zeitpunkt gezielt an bzw. abzuschalten. Im Kontext dieser Arbeit z.B. im Neuroepithel zum Zeitpunkt des Umschaltens zu Neurogenese. Im Folgenden wurde deshalb die Möglichkeit untersucht, durch RNAi (*RNA interference*) spezifisch die Expression bestimmter Gene auszuschalten.

In dem Experiment wurde untersucht, ob die Möglichkeit besteht, (i) RNAi im Säuger *in vivo* grundsätzlich, und via esi-(*endoribonuclease III-prepared short interfering*)-RNA, auszulösen und (ii) ein unkompliziertes experimentelles System zu etablieren, mit dem die Genexpression im Neuroepithel zu Beginn der Neurogenese unterdrückt werden kann.

Die Kombination von Elektroporation und *whole embryo culture* bot eine geeignete Möglichkeit beide Aspekte experimentell anzugehen. Mit diesem System können Nukleinsäuren in Neuroepithelzellen zeitlich (im Intervall E8.5-E11.5) und räumlich (durch Injektion in entsprechende Abschnitte des Neuralrohrs und nachfolgende gerichtete Elektroporation) definiert eingebracht und der innerhalb eines Zeitraums von 24 h auftretende Phänotyp analysiert werden (Takahashi *et al.*, 2002). Prinzipiell kann RNAi auf mehrere Arten induziert werden (siehe hierzu Abschnitt 4.8), esiRNA ist dabei eine einfach anzuwendende und effektive Alternative.

#### esiRNA unterdrückt die Genexpression selektiv

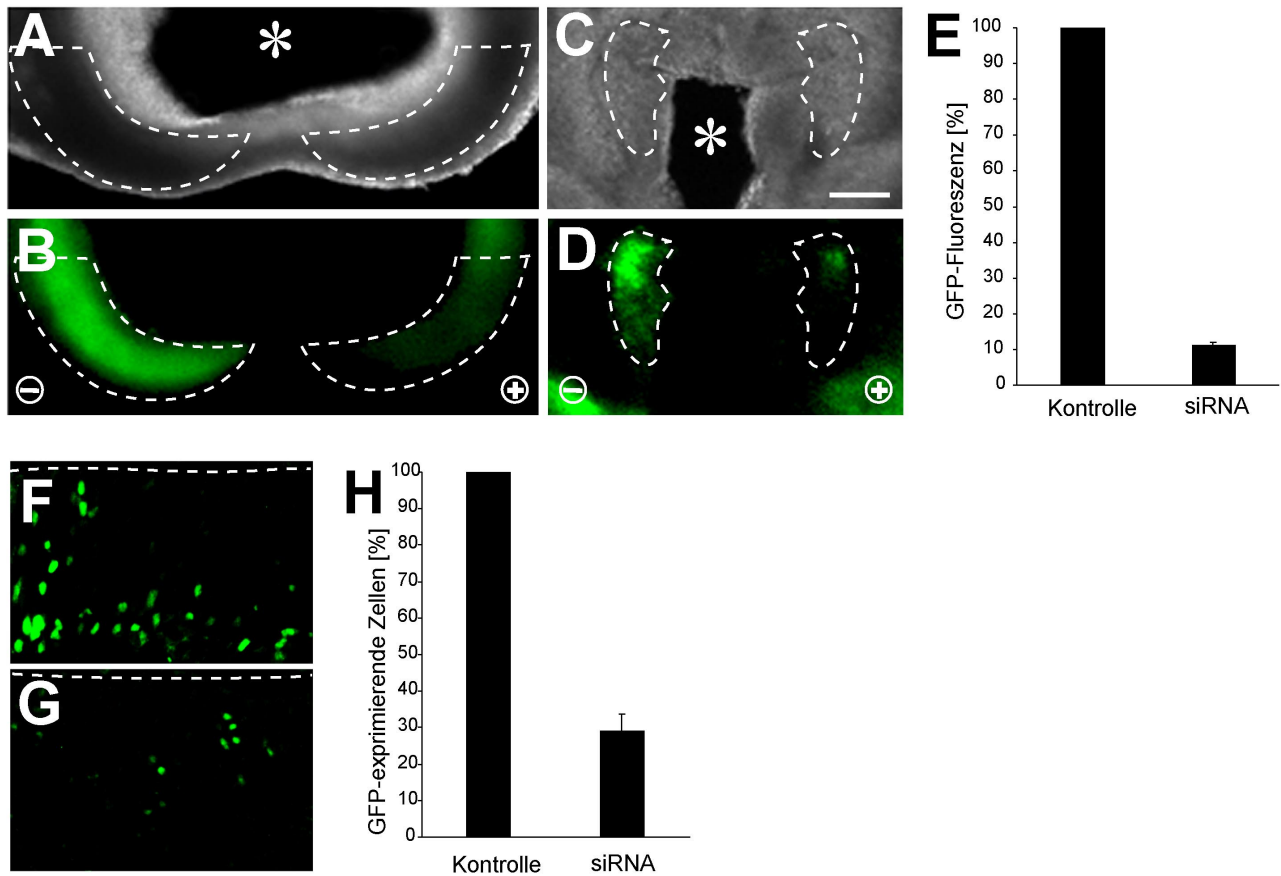
Zuerst wurde die Selektivität des esiRNA-vermittelten RNAi an ektopisch exprimierten Genen untersucht. Hierzu wurden Expressionsvektoren für GFP- und  $\beta$ -Galaktosidase mit bzw. ohne esiRNA, gerichtet gegen das offene Leseraster von  $\beta$ -Galaktosidase, ins Vorderhirn von Embryonen (E10; wt) koelektroporiert. Nach 24 h wurden GFP- und  $\beta$ -Galaktosidase-Expression im Neuroepithel überprüft. In der Kontrollsituation ohne esiRNA exprimierten fast alle GFP-positiven Zellen auch  $\beta$ -Galaktosidase (Abb. 34 A-C, G). Koelektroporation mit esiRNA gegen 1365 nt der  $\beta$ -Galaktosidase-mRNA resultierte dagegen in einer selektiven Suppression der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in fast allen GFP-positiven Zellen (Abb. 34 D-F, G). Die selektive Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase, aber nicht der GFP-Expression, ist ein Indiz für die Spezifität des durch esiRNA induzierten RNAi.



**Abb. 34. esiRNA unterdrückt spezifisch die Genexpression im Neuroepithel.** Embryonen (E10) wurden mit Expressionsplasmiden für GFP (pEGFP-N2) und  $\beta$ -Galaktosidase (pSV40paX $\Delta$ ) ohne (A-C, G: Kontrolle) bzw. mit (D-F, G: siRNA) esiRNA gegen  $\beta$ -Galaktosidase ins Telencephalon injiziert, elektroporiert und nach 24 h *whole embryo culture* immunhistochemisch auf die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase untersucht. (A-F) GFP-Expression (grün, A & D) und  $\beta$ -Galaktosidase-Immunoreaktivität (rot, B & E) in horizontalen Kryostatschnitten des Telencephalons. (C & F) Überlagerung beider Kanäle. Während GFP-exprimierende Zellen in der Kontrollsituation fast immer  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren ( $\blacktriangleright$ ) (diese Zellen erscheinen gelb in (C)), unterdrückt esiRNA die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase, nicht aber von GFP (es sind keine doppelt-positiven Zellen zu erkennen (F)). (--- apikale Oberfläche; \_\_\_ basale Grenze des Neuroepithels; \* unspezifisches Signal, hervorgerufen durch Kreuzreaktivität des Zweitantikörpers mit der Basallamina und Mesenchym und nicht durch  $\beta$ -Galaktosidase-Expression; Balken in F: 20  $\mu$ m). (G) Quantifizierung des Anteils GFP-exprimierender Zellen im Neuroepithel, die auch  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren. Daten aus drei Embryonen, analysiert wie in (A). (Fehler angegeben als SD; n=3). (In Zusammenarbeit mit F. Calegari).

#### esiRNA unterdrückt die Expression eines endogen exprimierten Gens

Für spätere funktionelle Analysen ist die Frage, ob esiRNA neben der Expression ektopischer auch die endogen exprimierter Gene unterdrücken kann, von fundamentalem Interesse. Es bietet sich an, eine beginnende und nicht eine konstitutive Genexpression zu unterdrücken: Es ist so viel einfacher, den RNAi-Effekt auf Proteinebene nachzuweisen, da es prinzipiell leichter ist, das Ausbleiben als das Nachlassen einer Proteinexpression zu detektieren. Aus diesem Grund wurde versucht, den Beginn der GFP-Expression in *TIS21*-GFP-Embryonen beim Übergang zur Neurogenese zu supprimieren. esiRNA, gerichtet gegen den GFP-ORF (ohne SV40-Kernlokalisierungssequenz) wurde noch vor Beginn der GFP-Expression ins Vorderhirn von E10 Embryonen ( $KI1^{*/wt}$ ) elektroporiert und die GFP-Expression nach 24 h quantifiziert. Bei der Elektroporation treten die Nukleinsäuren grundsätzlich nur in die der Anode zugewandten Seite von Geweben (hier: des Neuralrohres) ein (Abb. 35). Die kontralaterale Seite wird lediglich dem elektrischen Feld ausgesetzt, erhält aber keine Nukleinsäuren und kann daher als Kontrolle dienen. Im Vergleich zur Kontrollseite waren die GFP-Fluoreszenzintensität pro Areal (d.h. gemittelt über alle Zellen in einem betroffenen Areal) (Abb. 35A-E) und die Zahl GFP-exprimierender Zellen auf der der Anodenzugewandten Seite deutlich reduziert (Abb. 35F-H). Die Abnahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 35E) ist hierbei größer als die Abnahme der Zellzahl (Abb. 35H), kann aber durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität der positiven Zellen im betroffenen Areal (Abb. 35F & 35G) erklärt werden.



**Abb. 35. esiRNA unterdrückt die entwicklungsabhängige Expression von GFP im *TIS21*-GFP-knock in-zu Beginn der Neurogenese.** esiRNA gegen GFP wurde in die Ventrikel des Vorderhirns von E10 Embryonen ( $KI1^{+/wt}$ ) injiziert und gerichtet unilateral in die der Anode (+) zugewandten Seite ins Neuroepithel elektroporiert. Nach 24 h *whole embryo culture* wurde der RNAi-Effekt durch Vergleich der elektroporierten Seite mit der Kontroll-Seite (Kathode) als Abnahme in der GFP-Fluoreszenzintensität (A-E) und Abnahme in der Zahl GFP-positiver Zellen (F-H) analysiert. (A & C) Dunkelfeldaufnahmen und (B-D) GFP-Fluoreszenzaufnahmen von Vibratomschnitten (A & B: Telencephalon; C & D: Diencephalon). (Regionen unilateral unterdrückter Expression bzw. die Gegenseiten sind durch unterbrochene Linien markiert; \* Ventrikel; Balken in C: 200  $\mu$ m). (E) Quantifizierung der GFP-Fluoreszenzintensität der Anoden- (siRNA) und Kathodenseite (Kontrolle=100%). Daten aus drei verschiedenen Regionen im Vorderhirn unterschiedlicher Embryonen (zwei davon in B & D). (Fehler angegeben als  $SD < n=3$ ). (F-G) GFP-Fluoreszenz im Neuroepithel auf der Kathoden- (F) bzw. Anodenseite (G) an der Grenze zwischen Di- und Telencephalon in einem horizontalen Kryostatschnitt des Vibratomschnitts in (D). (--- apikale Oberfläche; Balken in G: 20  $\mu$ m). (H) Quantifizierung GFP-positiver Zellen auf der Anoden- (siRNA) und Kathodenseite (Kontrolle=100%). Die Daten stammen aus zwei Kryostatschnitten des Vibratomschnitts in (D). Es wurde das ganze Diencephalon bis zur Grenze des Telencephalons ausgewertet, ein Ausschnitt davon ist in (F & G) gezeigt. (Fehler angegeben als Abweichung vom Mittelwert). (Abb. aus Calegari *et al.*, 2002).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 TIS21-GFP markiert Neurone-generierende Neuroepithelzellen

Erstes, grundlegendes Ziel dieser Arbeit war die GFP-Markierung Neurone-generierender Neuroepithelzellen. Konkret sollte dies durch die Expression von GFP unter der Kontrolle des TIS21-Gens realisiert werden. Hierzu können prinzipiell zwei Strategien verfolgt werden: (i) entweder das GFP-Transgen wird in stabiler Form in das Genom von Mauslinien integriert oder (ii) die DNA wird ektopisch zugeführt. In (ii) kann die DNA durch virale Infektion (Oback *et al.*, 2000) oder durch Elektroporation (Murphy & Messer, 2001; Osumi & Inoue, 2001) in Neuroepithelzellen transferiert werden. Diese Manipulationen können sowohl *in utero*, *in vivo* (im ganzen Embryo) als auch an Explantaten durchgeführt werden (Oback *et al.*, 2000; Cid-Arregui & Haubensak, 2000; Takahashi *et al.*, 2002). Unter Berücksichtigung der Rahmenbedingungen wie Kultur- bzw. Analysesysteme (Mikroskopie, FACS) und die Verfügbarkeit eines funktionellen Promoterfragmentes ist die Generierung stabiler Mauslinien zwar die aufwendigste, aber auch die sicherste und in der Anwendung flexibelste Lösung. Sicher, da bislang stabile Linien (*knock in* bzw. BAC-transgene<sup>6</sup>) überhaupt die einzige Möglichkeit sind, bei unbekanntem Promoterfragmenten eine genspezifische Expression von Reportern zu erzielen (Giraldo & Montoliu, 2001), flexibel, da keine Limitierungen durch Gentransfertechniken auftreten: Die Embryonen bzw. Explantate müssen nicht vor der Analyse noch aufwendig transfiziert werden. Neben *knock in*-Linien können natürlich auch einfache transgene Mäuse generiert werden, falls funktionelle Promoter bekannt sind oder anzunehmen ist, dass bestimmte DNA-Fragmente *in vivo* funktionell sind (hier: das *in vitro* induzierbare TIS21-Promoterfragment).

In dieser Arbeit wurden der transgene und der *knock in*-Ansatz gleichzeitig verfolgt, um einerseits sicher die Expression von GFP in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen zu erreichen und andererseits einen funktionellen TIS21-Promoter zu identifizieren, der für weitere Anwendungen zur Verfügung steht (Abschnitt 4.7). Für TIS21 war kein solcher *in vivo* funktioneller Promoter bekannt. Deshalb wurden möglichst lange Fragmente kloniert, um die Chance zu vergrößern, relevante regulatorische Elemente einzuschließen.

---

<sup>6</sup> BAC-(*bacterial artificial chromosome*)-transgene Linien sind eine weitere Alternative zu konventionellen transgenen Mäusen, mit der seit kurzem typischerweise Reporterlinien generiert werden. Hier wird das Reportergen durch homologe Rekombination in Bakterien in große genomische DNA-Fragmente kloniert, die dann als Transgen in Mäuse geschleust werden. So kann das Reportergen unter der Kontrolle ganzer chromosomaler Regionen (bis zu 300 kb) exprimiert werden, was zu einer vergleichsweise präzisen Expression führt.

### TIS21-GFP markiert Neurone-generierende Neuroepithelzellen

Die etablierten transgenen Linien TG2, TG3 und die *knock in*-Mauslinie KI1 exprimieren GFP im Neuroepithel. Sind die GFP-positiven Zellen tatsächlich Neurone-generierende Neuroepithelzellen? Folgende Argumente sprechen dafür: (i) Im Neuroepithel ist GFP räumlich und zeitlich entsprechend der Gradienten der Neurogenese exprimiert (Abschnitt 3.5, Abb. 16-17 & Abschnitt 3.7, Abb. 19-21): GFP wird in Arealen exprimiert in denen Neurone entstehen, wird dort aber zeitlich nicht mehr als einen Zellzyklus vor Einsetzen der Neurogenese exprimiert, und der Anteil GFP-positiver Zellen steigt mit Zunahme der Neurogenese an. (ii) Eine Subpopulation von Neuroepithelzellen in Interphase und Mitose und junge Neurone sind GFP-positiv (Abschnitt 3.6, Abb. 18). Die Expression von GFP ist auf die germinalen Schichten (VZ und SVZ) begrenzt und fehlt in den neuronalen Schichten (Abschnitt 3.6, Abb. 18A1-3 & Abschnitt 3.7, Abb. 20) und im adulten Gehirn (Abschnitt 3.14, Abb. 31). Das steht in Einklang mit der Vorstellung, dass GFP von jungen Neuronen geerbt wurde und suggeriert die Expression von GFP in oder vor der Neurone-generierenden Teilung. Zusammen mit (i) folgt: GFP ist im Zellzyklus unmittelbar vor der Neurone-generierenden Zellteilung exprimiert. (iii) Das GFP-Expressionsmuster entspricht, ist aber nicht identisch mit, der Expression der TIS21-mRNA (siehe i & ii) – d.h. GFP wird exprimiert, wenn die TIS21-mRNA exprimiert wird, überdauert die Expression der TIS21-mRNA aber zeitlich. Diese Korrelation von TIS21-mRNA und GFP-Expression impliziert, zusammen mit (ii), die Expression von GFP in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen. Es ist insbesondere im Fall des *knock in* KI1 unwahrscheinlich, dass GFP einem anderen Expressionsschema folgt als die TIS21-mRNA. Ohne offensichtlichen Phänotyp in homozygoten Tieren ist nicht anzunehmen, dass heterozygote Tiere in ihrem Expressionsschema von der TIS21-mRNA im Wildtyp signifikant abweichen.

Man kann demnach davon ausgehen, dass tatsächlich Neurone-generierende Neuroepithelzellen GFP-markiert sind und die GFP-Expression in KI1 im ganzen ZNS während der gesamten Neurogeneseperiode ein Indikator für die Neurogenese ist.

### GFP-Fluoreszenz zeigt die transkriptionale Aktivität des TIS21-Gens an

Für alle Interpretationen, die aus *TIS21*-GFP-Linien (insbesondere KI1) abgeleitet werden, gelten folgende Überlegungen: (i) GFP-Fluoreszenz zeigt die transkriptionale Aktivität des *TIS21*-Gens innerhalb des, durch den Zerfalls von GFP bestimmten, Zeitfensters an. GFP-Fluoreszenz bedeutet: Der *TIS21*-Locus ist oder war vor kurzer Zeit aktiv. (ii) Unter Vernachlässigung des unterschiedlichen post-transkriptionalen und –translationalen Verhaltens von GFP und *TIS21* kann man GFP-Fluoreszenz näherungsweise auch als Indikator für die Präsenz von *TIS21*-mRNA betrachten (Einschränkung: Die mRNAs haben eine unterschiedliche Struktur – Intron und 3'UTR im Fall der *TIS21*-mRNA vs. Intron-los und SV40-pA im Fall der GFP-Expressions-kassette - und sicher nicht die gleiche Halbwertszeit). Diese Näherung gilt ebenfalls für das *TIS21*-Protein, ist aber auf mRNA-Ebene vermutlich weniger problematisch (die Stabilität von GFP-Fluoreszenz und



TIS21-Protein ist sicher nicht identisch). (iii) Empirisch konnte gefunden werden: Die GFP-Fluoreszenz hat im Neuroepithel eine geringere Zerfallsrate als die TIS21-mRNA. In jungen Neuronen überdauert die GFP-Fluoreszenz die Präsenz der TIS21-mRNA zeitlich: Während die TIS21-mRNA schon in der S-Phase zuvor abgebaut wird, ist GFP zumindest noch in jungen Neuronen zu sehen (Abschnitt 3.6, Abb. 18). Die GFP-Fluoreszenz hat eine höhere Zerfallsrate als das TIS21-Protein. GFP ist nur in der jüngeren Subpopulation TIS21-Protein-positiver Neurone zu finden (Daten nicht gezeigt).

Bei Ableitungen unbekannter TIS21-Expressionsmuster aus der GFP-Fluoreszenz wurde die GFP-Fluoreszenz der transkriptionalen Aktivität des TIS21-Genlocus bzw. der Expression von TIS21-mRNA und -Protein gleichgesetzt. Hierbei sind aber die genannten Überlegungen (i-iii) zu berücksichtigen.

Die Transgene und KI1 sind von ihrem Design so ausgerichtet, die GFP-Fluoreszenz bei erfolgter Transkription von TIS21 möglichst lange auf hohem Niveau zu halten und im Falle einer Zellteilung neutral auf Tochterzellen weiterzugeben (kernlokalisiertes GFP). Dieses Design wurde bewusst gewählt, um eine Zellpopulation möglichst lange verfolgen zu können, auch wenn die TIS21-mRNA schon wieder abgebaut ist. Linien, die eine enger an der TIS21-mRNA angelehnte Expression zeigen sollten, sind KI3 (TIS21-IRES-GFP) und KI2 (TIS21-GFP-Fusionsprotein) (Abb. 10). Die endogene TIS21-mRNA-Struktur mit Intron und 3'UTR bleibt in diesen Allelen erhalten. KI2 gibt zudem die TIS21-Proteinlokalisierung wieder. Dies wäre für eine Untersuchung einer möglichen asymmetrischen Verteilung von TIS21 *in vivo* interessant.

#### Anwendungen der *TIS21*-GFP-*knock in*-Linie

Ein Vorteil der *TIS21*-GFP-*knock in*-Linie ist die einfache Identifizierung Neurone-generierender Zellen bzw. anderer TIS21-positiver Zellpopulationen in statischen und dynamischen (videomikroskopischen) Analysen. Zudem macht die Lebendmarkierung dieser Zellpopulation bestimmte Ansätze (wie FACS, siehe Abschnitt 4.7) zur Charakterisierung der TIS21-positiven Zellpopulation überhaupt erst möglich. Gegenüber zufallsmarkierten Zellen, z.B. durch retrovirale Infektion bzw. DiI-Markierung, kann man beispielsweise bei videomikroskopischen Analysen auf eine aufwendige immunhistochemische Identifizierung der Zellen im Anschluss an die Aufnahmen verzichten, da die Markierung bereits die Information zu deren Identität enthält.

Im Kontext „Neurogenese“ wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der *TIS21*-GFP-*knock in*-Linie die Symmetrie bzw. *lineage* (Abschnitt 3.8) und Zellbiologie proliferierender vs. differenzierender Teilungen (Verteilung apikaler Membran: Abschnitt 3.10; Faktor Zeit: Abschnitt 3.11) untersucht.

Eine Ergänzung zu den hier vorgestellten *TIS21*-GFP-Linien ist eine Mauslinie, in der selektiv junge Neurone GFP-markiert sind (W. Haubensak & F. Calegari, in Vorbereitung). Dies soll durch Insertion von GFP in das erste Exon des  $\beta$ -III-Tubulin-Gens erreicht werden. Da Kontrollelemente

für dieses Neuron-spezifische Gen unbekannt sind, wurde ein BAC mit jeweils 100 kb flankierender genomischer Sequenz des  $\beta$ -III-Tubulin-Gens identifiziert. Über homologe Rekombination in Bakterien werden transgene Mauslinien etabliert, die GFP entsprechend  $\beta$ -III-Tubulin exprimieren sollen. In diesen Linien ist GFP Plasmamembran-lokalisiert, sie können also problemlos in Kombination mit den *TIS21*-GFP-Linien für statische und dynamische Analysen eingesetzt werden. Die Membranlokalisierung ermöglicht zudem eine morphologische Charakterisierung der entstehenden jungen Neurone.

## 4.2 Neurone entstehen aus Neuroepithelzellen und „BMCs“

Das *timing* des Übergangs von Proliferation zu Neurogenese als Schlüsselschritt in der Histogenese des ZNS wurde angesprochen (Abschnitt 1.6). Wie bereits erwähnt, sind im Vertebraten in diesem Kontext zwei fundamentale Aspekte kaum verstanden: (i) Symmetrie und *lineage* der Neurone-generierenden Teilung und (ii) die Steuerung dieses Prozesses auf zellbiologischer und genomischer Ebene. Die *TIS21*-GFP-*knock in*-Linie erlaubt, beide Fragestellungen über eine videomikroskopische Darstellung der Neurone-generierenden Zellteilungen an Explantatkulturen und eine differentielle Analyse proliferierender vs. Neurone-generierender Neuroepithelzellen in Bezug auf Zellbiologie und Genexpression anzugehen.

### Kultursysteme und Videomikroskopie

Prinzipiell sind die videomikroskopischen Analysen fluoreszenzmarkierter Zellen in Einzelzellkultur, in Cluster-Kulturen oder an Explantaten möglich. Die Kultursysteme spiegeln mit aufsteigender Komplexität eher die natürliche Umgebung im Gewebsverband wider, die Beobachtungen kommen der *in vivo* Situation näher. Allerdings werden in gleicher Weise die Anforderungen an das Kultursystem höher. In der hier vorliegenden Arbeit wurden alle videomikroskopischen Aufnahmen an Schnitt-Explantaten durchgeführt (Haydar *et al.*, 1999). Diese haben den Vorteil, dass sie bei relativ leichter Handhabung die Integrität des Gewebes wahren und mikroskopisch relativ gut zugänglich sind: Die Orientierung der Präparate ist immer eindeutig, die Fixierung im optischen Blickfeld unproblematisch. Schnittkulturen früher Stadien (E9-E12) wurden noch nicht für die Videomikroskopie eingesetzt, an späten Stadien wurden aber bereits erfolgreich Beobachtungen von Zellteilungen und Migration durchgeführt (Noctor *et al.*, 2001; Miyata *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Multiphoton-Mikroskop verwendet, das in Bezug auf Eindringtiefe ins Gewebe und Phototoxizität konventioneller Einphotonen-Mikroskopie überlegen ist und deshalb bei *in vivo* Studien ein breites Anwendungsspektrum hat (Denk & Svoboda, 1997). Bei den durchgeführten Analysen mit Schnittexplantaten konnte innerhalb des Beobachtungszeitraums von 16 h keine Degeneration der Kulturen festgestellt werden. Man kann allgemein davon ausgehen, dass zumindest bis zu einer Kulturdauer von 24 h Histologie und

Vitalität der Präparate erhalten bleiben (Haydar *et al.*, 1999). Prinzipiell sind auch längere videomikroskopische Beobachtungen bis zu 60 h möglich (Noctor *et al.*, 2001).

Initiale Experimente zeigen, dass es ferner möglich ist, mit Multiphotonmikroskopie GFP-markierte Neuroepithelzellen im intakten Embryo in *whole embryo*-Kultur zu detektieren (eigene Beobachtungen). *In vitro*-Kulturen intakter Embryonen sind von E8-E12, für eine Dauer von bis zu 36 h möglich (Cockroft, 1990).

#### Lehrbuch: Neurone-entstehen aus apikalen asymmetrischen Teilungen

Die gängige Vorstellung geht davon aus, dass der Schritt von Proliferation zu Neurogenese durch einen Wechsel in der Zellteilungssymmetrie von symmetrisch-proliferativen zu asymmetrisch-differenzierenden Teilungen erfolgt und Neurone aus apikalen asymmetrischen Zellteilungen entstehen. Die Existenz asymmetrischer Neurone-generierender Zellteilungen wurde jedoch noch nie direkt nachgewiesen (Abschnitt 1.4). In der viel zitierten Arbeit von Chenn und McConnell (Chenn & McConnell, 1995) interpretieren die Autoren ungleiche Wanderungsgeschwindigkeiten und Morphologie zweier Tochterzellen einer apikalen Teilung als Existenzbeweis einer asymmetrischen Neurone-generierenden Zellteilung: Die Autoren gehen aber lediglich auf Grund morphologischer Kriterien davon aus, dass die schneller wandernde Schwesterzelle ein Neuron und die langsamere eine Neuroepithelzelle ist, zeigen dies aber nicht anhand molekularer Marker. Die Studien von Noctor und Mitarbeitern (Noctor *et al.*, 2001) und Miyata und Mitarbeitern (Miyata *et al.*, 2001) untersuchten auf direkterem Weg die Entstehung von Neuronen aus asymmetrischen Teilungen radialer Gliazellen. Hier identifizieren die Autoren die Tochterzellen nach Videomikroskopie immunhistochemisch. Die Autoren sind sich aber in diesem Ergebnis nicht sicher bzw. ziehen zur Interpretation widersprüchliche Daten heran: Noctor und Mitarbeiter (Noctor *et al.*, 2001) lassen offen, ob die Neurone-generierende Teilung selbst symmetrisch oder asymmetrisch ist (Noctor *et al.*, 2001, Fig. 4c), Miyata und Mitarbeiter (Miyata *et al.*, 2001) kommen bei der Verwendung verschiedener neuronaler Marker (Hu, NeuN,  $\beta$ -III-Tubulin) zu unterschiedlichen Ergebnissen. Sie identifizieren die aus asymmetrischen Teilungen hervorgegangenen Neurone auf Grund ihrer Immunoreaktivität mit Hu. Allerdings ist der Großteil der Hu-positiven Zellen  $\beta$ -III-Tubulin-negativ, es ist also fraglich, ob die Hu-positiven Zellen wirklich Neurone sind (Miyata *et al.*, 2001, Seite 733, Absatz 2). Verwirft man diese Kritik und geht davon aus, dass radiale Gliazellen und Neuroepithelzellen identisch sind (Huttner & Brand, 1997; Noctor *et al.*, 2002), spricht somit viel für die Entstehung von Neuronen aus asymmetrischen Teilungen von Neuroepithelzellen. Zusammen mit der von Chenn und McConnell (Chenn & McConnell, 1995) beschriebenen Korrelation von Zellteilungsebene und asymmetrischen, Neurone-generierenden Zellteilungen, ergibt sich ein überzeugend einfaches Modell zur Neurogenese: Im Vertebraten entstehen Neurone nach Übergang von vertikalen symmetrischen zu horizontalen asymmetrischen Zellteilungen als basale Tochterzellen solch apikaler asymmetrischer Teilungen. Obwohl gegenwärtig immer noch von eher hypothetischem Charakter, zieht sich dieses Modell schon heute durch viele Lehrbücher. Einige

neuere Erkenntnisse, insbesondere auch im Rahmen dieser Arbeit gewonnene Einsichten, verlangen dessen Revision. Es scheint, dass der Sachverhalt komplexer ist, sowohl in Bezug auf die neuronale *lineage* als auch auf die Orientierung der Zellteilungsebene bei proliferierenden *vs.* Neurone-generierenden Zellteilungen (Abschnitt 4.3).

#### Neurone-generierende apikale asymmetrische Teilungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *TIS21*-GFP-Expression im *TIS21*-GFP-*knock in* Neurone-generierende Neuroepithelzellen markiert (siehe zur Diskussion Abschnitt 4.1). Tatsächlich treten die ersten GFP-markierten Neurone-generierenden apikalen Mitosen in allen Bereichen des Neuralrohres mit Beginn der Neurogenese auf (z.B. Telencephalon, Rhombencephalon, Abschnitt 3.8, Abb. 23). Die Wanderung von Eltern- und Tochterzellen solcher apikaler Teilungen wurden in frühen Stadien der Neurogenese (E9.5-E10.5 Rhombencephalon und E11.5-E13.5 Telencephalon) videomikroskopisch verfolgt.

Die dabei beobachteten Wanderungsgeschwindigkeiten der Zellkerne von 10-85  $\mu\text{m/h}$  (Abschnitt 3.9, Abb. 25A) liegen wie erwartet etwas über den in der Literatur beschriebenen Werten von 5-20  $\mu\text{m/h}$  für späte Stadien der Neurogenese im Frettschen (Chenn & McConnell, 1995). In diesen Studien wurde zwar nicht mit einem Kernmarker gearbeitet, die Kern- wurde aber der Zellmigration gleichgesetzt – die Werte sollten demnach einander entsprechen. Die größeren Geschwindigkeiten apikal gerichteter, in der G2-Phase ablaufenden, Wanderungen sind mit der unterschiedlichen Dauer der G1- im Vergleich zur G2-Phase kongruent und passen gut zu der Vorstellung, dass Neuroepithelzellen in etwa einer bzw. 3-5 h (Dauer der G2-Phase bzw. G1-Phase) bis zu 50  $\mu\text{m}$  in apikaler bzw. basaler Richtung zurücklegen müssen. Dieses Verhältnis macht Sinn, denn Wanderung und Zellzyklusphasen sind gekoppelt. Die Zellen wandern dabei nicht gleichförmig, sondern weisen innerhalb ihrer Wanderung eine relativ große Bandbreite an Geschwindigkeiten auf. Wahrscheinlich müssen die Zellkerne Widerstände während ihrer Bewegung überwinden (sie werden ab und zu von entgegenkommenden Zellkernen abgebremst). Die beobachtete Dauer der Mitose (Abrunden der Zelle bis Eintreten der Cytokinese, erkennbar an der Lokalisierung von GFP in den neu formierten Kernen) von etwa 20 min entspricht in etwa der Teilungsdauer, die in anderen videomikroskopischen Studien beobachtet wurde (Takahashi *et al.*, 1993; Chenn & McConnell, 1995; Noctor *et al.*, 2001; Miyata *et al.*, 2001).

Bei der Interpretation der videomikroskopischen Daten werden folgende Annahmen gemacht: (i) alle *TIS21*-GFP-markierten Zellteilungen generieren zumindest ein Neuron, (ii) die basal aus der Ventrikularzone auswandernden Zellen sind in diesen Stadien ausschließlich Neurone, (iii) Tochterzellen verschiedenen Typs (Neuroepithelzelle *vs.* Neuron) unterscheiden sich in ihrer Migration bzw. ihrer räumlichen Position, was durch die Wanderungsgeschwindigkeit bzw. die Endposition der Zellkerne beschrieben werden kann. Initial sollten die Videoaufnahmen über zwei Zellzykluslängen durchgeführt werden. Tritt eine der Tochterzellen wieder in den Zellzyklus ein,

folgt mit den Annahmen (i) und (ii) zwingend, dass Neurone aus asymmetrischen Zellteilungen hervorgehen, in denen die Vorläuferzelle regeneriert wird (Stammzellmodus).

In den Experimenten konnten Zellen bis zu 16 h verfolgt werden. In diesem Zeitraum konnte keine Abfolge von Teilung - basale Migration - apikale Migration beobachtet werden. Ob aus technischen oder natürlichen Gründen, kann zum derzeitigen Stand der Analyse noch nicht entschieden werden. Es kann sein, dass der Beobachtungszeitraum von ca. 16 h nicht ausreichend lang war, um eine zweite Zellteilung zu verfolgen. Würde die beobachtete erste asymmetrische Zellteilung - bei einem Zellzyklus von 10 h - im statistischen Mittel nach 5 h erfolgen, so würde die zweite symmetrische Zellteilung bei 5 plus 10 h, bei also 15 h liegen. Um die Existenz einer zweiten Zellteilung gänzlich auszuschließen, müsste dann die Beobachtung mindestens 20 h, d.h. zwei Zellzyklen, andauern. Wie in Abschnitt 3.11 gezeigt, liegt der Zellzyklus der GFP-positiven Zellen sogar bei 13 h, ca. 40 % über dem Populationsdurchschnitt von 8-10 h in diesen Stadien (Takahashi *et al.*, 1995). Es könnte also sein, dass ein noch längerer Beobachtungszeitraum notwendig ist, um eine zweite Teilung sicher auszuschließen.

Die Tochterzellen apikaler Mitosen wandern mit signifikant unterschiedlicher Geschwindigkeit (Abschnitt 3.9, Abb. 25B): Es gibt eine schnell basal aus dem Neuroepithel auswandernde Zelle (Zelle A) und eine langsam wandernde Zelle, die im Neuroepithel verbleibt (Zelle B). Zelle B wandert dabei mit 10  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Nach 5 h, der Dauer der G1-Phase in diesem Stadium, würde sie exakt 50  $\mu\text{m}$ , in etwa die radiale Ausdehnung der Ventrikularzone, zurückgelegt haben. Die Zelle A hingegen würde bei gleichförmiger Bewegung nach 5 h Wanderung die Ventrikularzone längst verlassen haben ( $5 \times 27 \mu\text{m} \gg 50 \mu\text{m}$ ). Es ist also unwahrscheinlich, dass Zelle A wieder, an eine interkinetische Migration gekoppelt, in die G1-Phase eintritt. Wir können, zusammen mit den erwähnten Annahmen, davon ausgehen, dass Zelle A das Neuron und Zelle B eine Neuroepithelzelle ist, die sich selbst erneuert hat. Neurone werden also durch apikale asymmetrische Teilungen generiert (Abb. 36, *lineage A*). Dieser Befund ist mit dem klassischen Neurogenese-Modell konform (Abb. 2C).

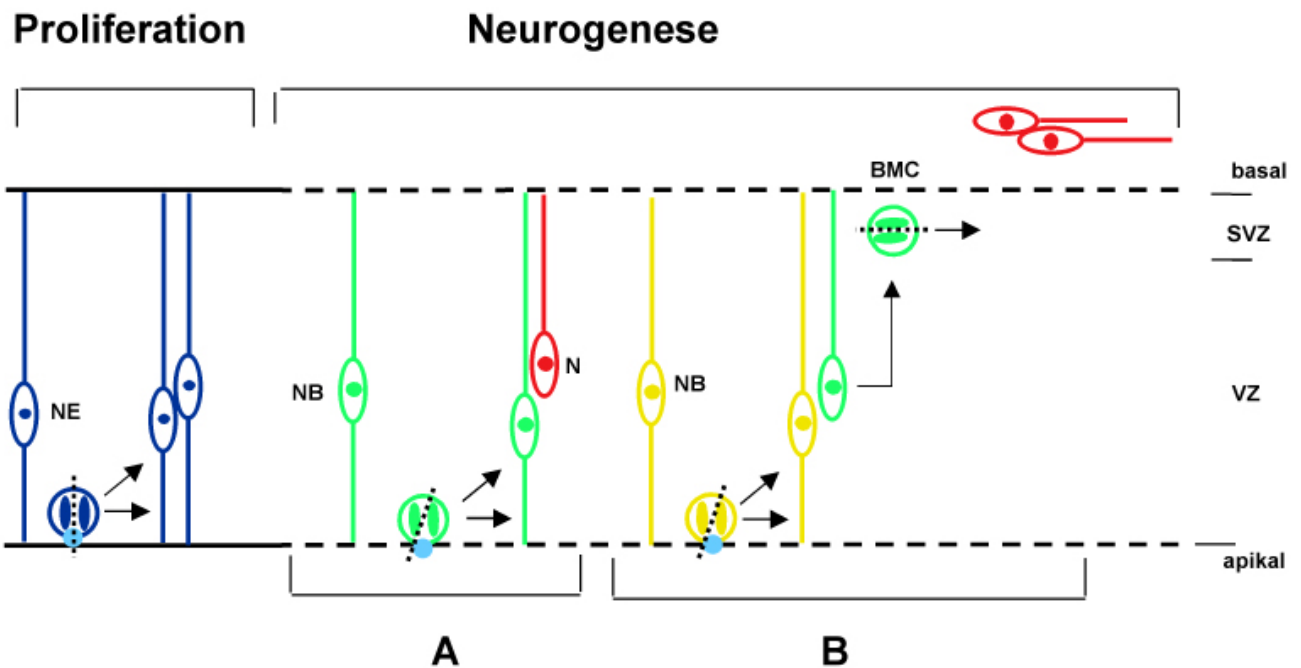
Interessanterweise erschienen 70% der Teilungen horizontal bis oblique zur ventrikulären Oberfläche. Das steht im Missverhältnis zu dem Befund von Kosodo und Mitarbeitern (Kosodo *et al.*, 2002), die zeigen, dass nur 14% der Teilungen diese Orientierung aufweisen. Dies kann durch die unterschiedliche Art und Weise der Ableitung erklärt werden: In statischen Analysen wird die Teilungsebene aus der Position der Chromosomen in Anaphase abgeleitet, in videomikroskopischen aus der Position der wieder formierten Kernmembran, also zu einem späteren Zeitpunkt im Zellzyklus. Es könnte sein, dass die Teilungsebene bei der videomikroskopischen Analyse deshalb nur horizontal/oblique erscheint, da die Bestimmung etwas später im Zeitpunkt erfolgt und sich die Zellen (später) im Gewebsverband durch äußere Zwänge (seitlichen Druck, ziehende Kräfte in der apikal-basalen Achse, etc.) zwangsläufig vertikal (übereinander) einordnen müssen (pseudostratifiziertes Epithel).

### Neurone-generierende basale symmetrische Teilungen

Die Entdeckung **basaler GFP-positiver Mitosen** zu Beginn der Neurogenese im Telencephalon (E10.5) (Abschnitt 3.8, Abb. 22) ist sicherlich der Schlüsselbefund dieser Arbeit und stellt eine echte Herausforderung an das gegenwärtige Neurogenese-Modell dar. Basal heißt hier: in der basalen Ventrikularzone, apikal zu den neuronalen Schichten. Die Existenz dieser zweiten, sich basal teilenden Zellpopulation im Neuroepithel zu frühen Stadien der Neurogenese wurde in der Literatur noch nicht formuliert. Deshalb wurden diese Zellen als BMC (*basal mitotic cells*) bezeichnet, um sie von Neuroepithelzellen abzugrenzen.

Diese basalen Mitosen koexistieren zeitlich und räumlich mit apikalen Neurone-generierenden Teilungen. Es scheint also, als würden Neurone nicht nur durch apikale, sondern auch basale Zellteilungen generiert. Tatsächlich konnte auch die Teilung dieser basalen Zellen videomikroskopisch verfolgt werden (Abschnitt 3.9, Abb. 24). Die Mitosedauer (definiert wie bereits erläutert) differiert nicht signifikant von der apikaler Teilungen. Beide Tochterzellen einer solchen basalen Teilung wandern dabei im Gegensatz zu apikalen Teilungen mit gleicher Geschwindigkeit basal in die neuronalen Schichten aus – die Teilung verläuft demnach symmetrisch (Abschnitt 3.9, Abb. 25). Folgende Hinweise sprechen dafür, dass es sich bei den auswandernden Zellen um Neurone handelt: (i) Die Teilungen treten nicht vor Beginn der Neurogenese auf, (ii) *TIS21*-GFP markiert neuronale und nicht Glia-generierende Teilungen (die *TIS21*-mRNA ist in der späten Gehirnentwicklung, dem *peak* der Gliogenese, nicht mehr exprimiert) (Iacopetti *et al.*, 1994) und (ii) Neurone sind die einzigen Zellen, die in diesen Stadien in die neuronalen Schichten wandern, Gliazellen entstehen deutlich später (Altman & Bayer, 1991). Neurone entstehen demnach in zwei Modi Neurone-generierender Zellteilungen: apikale asymmetrische (Abb. 36, *lineage A*) und basale symmetrische (Abb. 36, *lineage B*). Während nur der differenzierende Anteil apikaler Mitosen GFP-positiv ist, sind es nahezu alle basalen Mitosen (Abschnitt 3.8, Abb. 25B). Apikale Mitosen können (und müssen, es findet ja Proliferation im Neuroepithel statt) entweder proliferierend und/oder differenzierend sein, basale Mitosen dagegen sind immer differenzierend. Der relativ niedrige Anteil GFP-positiver apikaler Mitosen bzw. basaler Zellteilungen an der Gesamtzahl der Zellteilungen ist deshalb nicht unerwartet und passt gut zu der geringen Zahl generierter Neurone bzw. zu dem geringen Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen: Nehmen wir für die Dauer einer Mitose 20 min, für den Zellzyklus 10 h und einen asymmetrischen Teilungsmodus an, ist näherungsweise eine Neurone-generierende Mitose je 30 Neurone zu erwarten - insbesondere zu Beginn der Neurogenese ein vergleichsweise seltenes Ereignis.

Die Orientierung der Zellteilungsebene war in 50% der Fälle horizontal bis oblique, scheint also weniger stringent kontrolliert als im Fall der apikalen Teilung.



**Abb. 36. Modell zur Entstehung von Neuronen im ZNS.** Mit Beginn der Neurogenese entstehen Neurone aus zwei koexistierenden *lineages*. *Lineage A*: Neurone (N) entstehen direkt aus apikalen Teilungen von Neuroepithelzellen. *Lineage B*: Aus asymmetrischen Teilungen gehen isolierte TIS21-positive „Neuroblasten“ (NB) hervor, die durch apikale Teilung eine *basal mitotic cell* (BMC) und wieder einen Neuroblasten generieren. Die BMC teilt sich basal in zwei Neurone. Der Übergang zu Neurogenese ist auf zellbiologischer Ebene durch einen Wechsel von symmetrischer zu asymmetrischer Verteilung der apikalen Membran (blauer Punkt) (siehe hierzu Abschnitt 4.3) und einer Verlangsamung des Zellzyklus in der Neuronen-generierenden (grün) vs. proliferierenden Population (blau) (Abschnitt 4.4) gekennzeichnet. (VZ: Ventrikularzone; SVZ: Subventrikularzone; \_ apikale/basale Oberfläche vor und ... nach Verlust epithelialer Eigenschaften).

Die Koexistenz beider unabhängigen neuronalen *lineages* würde die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur zu dem klassischen Neurogenesemodell erklären. Videomikroskopische *lineage*-Studien *in vitro* zeigen eindeutig die Entstehung von Neuronen aus symmetrischen Teilungen (Qian *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002). Inwieweit die Daten allerdings auf die *in vivo*-Situation übertragen werden können, ist fraglich. Es gibt allerdings auch Hinweise auf symmetrische Teilung *in vivo* (Reznikov *et al.*, 1997). Durch intraventrikuläre Injektion kombiniert retroviral und  $^3\text{H}$ -markierte Zellklone im Cortex zeigen ein eindeutig symmetrisches Teilungsmuster: Paarweise auftretende Neurone in den neuronalen Schichten haben die gleiche Intensität der  $^3\text{H}$ -Markierung, d.h. sie haben die gleiche Anzahl Zellzyklen durchlaufen, was nur durch symmetrische Neuronengenerierende Teilungen erklärt werden kann. Beide Befunde sprechen für die hier vorgestellte Beobachtung einer symmetrischen Neuronengenerierenden Teilung, welche durch diese Arbeit erstmals einer histologisch definierten Zellpopulation (BMCs) zugeordnet werden kann.

#### Das neue Neurogenesemodell: die *Drosophila*-Analogie und offene Fragen

Der symmetrische differenzierende Teilungsmodus erinnert stark an die Neurogenese in *Drosophila*: Wie erwähnt (Abschnitt 1.6), verläuft dort die neuronale *lineage* über die Spezifizierung einer Neuroblastenzelle, die sich anschließend asymmetrisch in eine GMC und einen Neuroblasten teilt.

Die Neurone selbst entstehen durch eine symmetrische Teilung der GMC. *lineage* B in Abb. 36 entspricht weitestgehend der *Drosophila-lineage*. Man würde die Existenz sich asymmetrisch teilender Neuroepithelzellen (Neuroblasten) postulieren, die eine delaminierte Zelle und wieder eine Neuroepithelzelle generieren. Die delaminierte Zelle selbst teilt sich, entsprechend *Drosophila*, symmetrisch in zwei Neurone. Die hier vorgestellte BMC wäre das Vertebraten-Homolog der Ganglionmutterzelle (GMC). Die Analogie sollte natürlich nicht überstrapaziert werden: In *Drosophila* ist der Neuroblast selbst bereits delaminiert. Die Analogie sollte nur die bislang nicht vermutete, offenbar konservierte *lineage* über eine symmetrische Neurone-generierende Teilung verdeutlichen.

Eine zentrale, derzeit offene Frage ist: Geht die BMC aus GFP-positiven oder GFP-negativen Teilungen hervor? Bei dem derzeitigen Stand der Analyse kann hierzu strenggenommen keine Aussage gemacht werden. Nimmt man an, dass TIS21-mRNA bzw. GFP den direkten apikalen neuronalen Vorläufer markiert, sind folgende Szenarien möglich: (i) Apikale Mitosen generieren ein Neuron und eine Neuroepithelzelle – die GFP-positiven Subventrikularzonenzellen entstehen aus apikalen Mitosen GFP-negativer Neuroepithelzellen. (ii) GFP-positive apikale Mitosen generieren ein Neuron und eine BMC - die BMC entsteht aus einer GFP-positiven apikalen Mitose. Geht man jedoch davon aus (und es fehlt augenblicklich jeglicher Grund zu einer gegenteiligen Annahme), dass TIS21-mRNA tatsächlich nur unmittelbar und nicht einen Zellzyklus vor einer Neurone-generierenden Zellteilung exprimiert wird (Iacopetti *et al.*, 1999), ist der „Neuroblast“ in *lineage* B (Abb. 36) TIS21-mRNA-negativ. (Die Existenz eines TIS21-negativen, sich asymmetrisch teilenden „Neuroblasten“ passt in sofern ins Bild, da TIS21-positiv Zellen wahrscheinlich selbst Produkt einer asymmetrischen Teilung sind). Diese Annahme ist mit folgenden Befunden konsistent: (i) bei den videomikroskopischen Analysen konnten keine Tochterzellen einer apikalen GFP-positiven Mitose detektiert werden, die sich auf der basalen Seite wieder teilten (auf den Zusammenhang der Beobachtungsdauer und der Chance, eine solche Teilung zu verfolgen, wurde hingewiesen) und (ii) zu späten Stadien der Neurogenese ist der Anteil apikaler GFP-positiver Mitosen relativ gering (Daten nicht gezeigt), obwohl der Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen relativ hoch ist (Abschnitt 3.7, Abb. 21B). Dazu passend sind junge migrierende Neurone in der Ventrikularzone selbst beim *peak* der Neurogenese (E15.5) im Telencephalon relativ selten. Es scheint, als ob dort besonders viele Neurone durch basale Mitosen generiert werden. Deshalb wird die zentrale Frage weiterer Analysen sein, die *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle - (Neuroblast)- BMC“ zu klären.



### Was sind BMCs? - Versuch einer histologischen Einordnung

Man kann mit Sicherheit davon ausgehen, dass alle histologisch definierbaren Zelltypen bereits entdeckt wurden - lediglich molekular (Genexpressionsprofil) bzw. über die Funktion lassen sich heute innerhalb der histologisch bekannten Zellklassen neue Subtypen definieren. Um so unwahrscheinlicher ist es (wie in dieser Arbeit), in einem so gut studierten System wie dem embryonalen Nervensystem der Maus einen histologisch definierten Zelltyp (eine „sich zu Beginn der Neurogenese basal teilende Zelle im Neuroepithel“) zu entdecken und diesen dann noch funktionell (ein „sich symmetrisch in zwei Neurone teilender neuronaler Vorläufer“) charakterisieren zu können.

Deshalb sollen im Folgenden die Hinweise in der Literatur in Bezug auf (i) die histologische Existenz eines, den BMCs entsprechenden, Zelltyps und (ii) dessen Rolle als neuronaler Vorläufer diskutiert werden. Trotzdem sei hier vorweggenommen: Die in der Literatur vorhandenen, histologischen und funktionellen Hinweise sind spärlich und wurden nicht zu einem Modell (vgl. Abb. 36) integriert – geschweige denn, dass diese Hinweise in irgendeinem Modell zur Neurogenese (schon gar nicht in Lehrbüchern) berücksichtigt wurden.

Histologisch könnte man die BMC-Zellpopulation als Vorläufer der Subventrikularzone einordnen, die in der Literatur fast durchweg als erst ab E14 sichtbare Schicht rein glialer Vorläufer diskutiert wird (Altman & Bayer, 1991). Die Tatsache, dass SVZ-Zellen im Adulten Neurone generieren, ist sicherlich ein starkes Argument für deren Rolle in der embryonalen Neurogenese. Es ist nicht einzusehen, warum embryonale SVZ-Vorläuferzellen in ihrem Potential auf die *Glia-lineage* limitiert sein sollten, im Adulten aber pluripotent Neurone und Glia generieren können. Wenn überhaupt, erwartet man die Einschränkung des *lineage* Potenzials im Adulten und nicht umgekehrt.

Es gibt in der Tat mehrere Hinweise auf die Entstehung von Neuronen aus der embryonalen SVZ. Allerdings sind sie verglichen mit dem gegenwärtigen Modell zur Neurogenese wenig populär, stützen aber das hier erstmalig vorgestellte *lineage*-Modell über basale Teilungen. Die fundamentalen Studien von Smart zur Neurogenese im Säuger bzw. der Maus beschreiben das Auftreten von „non-surface“ (=basale) Mitosen entlang des ganzen Neuralrohres im Verlauf der Neurogenese (Rückenmark, Smart, 1972a; Diencephalon Smart, 1972b und Telencephalon Smart, 1973). Smart beobachtete einen Zusammenhang des Auftretens dieser Mitosen und dem Gradienten der Neurogenese (Eintreten in Phase 2, siehe Abschnitt 1.3) und postulierte bereits die Entstehung von Neuronen aus diesen basalen Mitosen, blieb aber einen Beweis für diese Behauptung schuldig. Bemerkenswerterweise fällt der *peak* der Neurogenese von Schicht IV-II mit der radialen Expansion der SVZ zusammen, was einen kausalen Zusammenhang zwischen der SVZ und Neuronentstehung vermuten lässt (Smart & McSherry, 1982). Zudem tritt während dieses *peaks* in der SVZ eine stark <sup>3</sup>H-markierte Population auf (Altman & Bayer, 1991), Beleg einer zeitlichen Koinzidenz mitotischer Aktivität in der SVZ und der Entstehung der Schichten IV-II. Takahashi und Mitarbeiter (Takahashi

*et al.*, 1996) schließen in ihrer Studie zur Proliferation und Differenzierung im Cortex die Generierung von Neuronen aus der Subventrikularzone nicht aus, interpretieren sie aber als eher seltenes Ereignis. Nach ihren Daten werden weniger als 5% der Neurone bei E15 aus der Subventrikularzone generiert. Der relativ niedrige Wert steht im Widerspruch zu der Studie von Tarabykin und Mitarbeitern (Tarabykin *et al.*, 2001), die den Ursprung der Schicht II-IV Neurone in der SVZ nahelegt (siehe nächster Absatz) - und das sind mehr als 5% der Neuronenproduktion. Takahashi und Mitarbeiter (Takahashi *et al.*, 1996) selbst räumen ein, dass es schwierig ist, die Zellpopulationen eindeutig VZ und SVZ zuzuordnen, was die unterschiedlichen Ergebnisse beider Studien erklären könnte. Die Studie von Takahashi und Mitarbeitern (Takahashi *et al.*, 1996) zeigt zudem, dass das Maximum der corticalen Neuronenproduktion zeitlich gegenüber dem Verschwinden der Neuroepithelzellen in der VZ um zumindest einen Zellzyklus verzögert ist (Abb. 3A). Dies kann natürlich durch die Koexistenz von Typ 2- und 3-Teilungen erklärt werden (Abb. 3B). Man kann sich aber auch vorstellen, dass ein Teil der Neurone über eine intermediäre Zellpopulation (in der SVZ) generiert wird, was die zeitliche Verzögerung erklärt. (Die gemessene Neuronenproduktion in Abb. 3A würde sich in diesem Fall nicht, wie angenommen auf die VZ sondern auf VZ plus SVZ beziehen. Wie erwähnt, ist die Zuordnung von Zellen zu VZ bzw. SVZ nicht ganz eindeutig).

Neben den eher hypothetischen Vermutungen von Smart gibt es neuere Studien, die auf molekularer Ebene auf einen Zusammenhang von SVZ und Neurogenese hindeuten. In einem subtraktiven *screen* für spezifisch in der SVZ, aber nicht in der VZ exprimierter Gene, konnten Tarabykin und Mitarbeiter (Tarabykin *et al.*, 2001) eine mRNA identifizieren, die exklusiv in der SVZ und Schicht-II-IV-Neuronen exprimiert ist (Svet1). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob die hier beschriebenen basalen Zellen Svet1-positiv sind. Die Autoren postulierten einen *lineage*-Zusammenhang zwischen der SVZ und den Svet1-positiven Neuronen: In Pax6-defizienten Mäusen (Sey/Sey) ist exklusiv die Svet1-positive SVZ-Vorläuferpopulation, nicht aber die Otx-1-positiv der VZ betroffen – dieser Defekt resultiert auf neuronaler Ebene in einem selektiven Verlust der Svet1-positiven Schicht-II-IV-Neurone, nicht aber der Otx-1-positiven Population. Die Svet1-mRNA selbst enthält keinen ORF und ist im Zellkern lokalisiert (Tarabykin *et al.*, 2001).

Die Einordnung der BMCs als frühe Zellen der SVZ impliziert: (i) Die Pionierzellen der SVZ entstehen bereits zu Beginn der Neurogenese, (ii) diese Pionierzellen generieren Neurone durch basale symmetrisch differenzierende Teilungen, (iii) Zellen der Subventrikularzone sind neuronale Vorläufer und (iv) die Subventrikularzone ist (zu späteren Stadien) eine heterogene Zellpopulation, sie besteht aus BMCs und Glia-Vorläuferzellen.

#### Lineage A und B sind unterschiedlich effizient in der Neuronenproduktion

Auffällig ist der erhöhte Anteil basaler Zellteilungen in Regionen mit hoher Neuronenproduktion: Im Telencephalon ist das Verhältnis von GFP-positiven basalen zu GFP-positiven apikalen Mitosen

höher als im Rhombencephalon (bei E10 ca. 2.7fach) (Abschnitt 3.8, Abb. 23A). Dies kann ein Indiz für unterschiedliche Mechanismen der Neurogenese in beiden Hirnregionen sein: Regionen mit einem größeren *output* an Neuronen tendieren schon in sehr frühen Stadien der Neurogenese dazu, ihre Neurone durch basale Teilungen zu generieren. Dieser Effekt ist nicht auf einen erhöhten Anteil proliferativer Mitosen zurückzuführen, da innerhalb der Neurone-generierenden Population der Trend anhält (Abschnitt 3.8, Abb. 23C). Offenbar werden im Telencephalon Neurone anders generiert als im Rhombencephalon. Tatsächlich scheint die Balance der verschiedenen Modi (*lineage A* vs. *lineage B*) unterschiedlich. Was könnte ein Grund hierfür sein?

Beziehen wir die produzierten Neurone auf den Zellzyklus der ersten, sich differenzierend teilenden Neuroepithelzelle in jeder *lineage*. *Lineage A* würde ein Neuron und eine Neuroepithelzelle generieren, der *output* wäre ein Neuron pro Zellzyklus. *Lineage B* produziert dagegen eine Neuroepithelzelle und über das Zwischenstadium der BMC zwei Neurone, der *output* wäre zwei Neurone pro Zellzyklus, also doppelt so effektiv. Gleiche Überlegungen gelten, falls die erste differenzierende Teilung symmetrisch verlaufen würde, das Verhältnis wäre dann zwei zu vier Neuronen pro Zellzyklus. Im Embryo limitiert die begrenzte apikale Oberfläche, auf Grund der begrenzten lateralen Ausdehnung der Ventrikel, die Zahl der Neuroepithelzellen. Der Embryo könnte so über eine Intensivierung der Neuronenproduktion über *lineage B* die Ausbeute an Neuronen pro Raum und Zellzyklus erhöhen. Die Neuronenproduktion, d.h. die pro Neurone-generierender Neuroepithelzelle generierten Neurone, gemessen als das Verhältnis junger GFP-positiver Neurone zu GFP-positiven Neuroepithelzellen (Abb. 21C) im Rhombencephalon ist tatsächlich, bei einem höheren Anteil GFP-positiver Neuroepithelzellen (Abb. 21B), geringer als im Telencephalon, obwohl die Neurogenese dort weiter fortgeschritten ist (Abb. 21A). Nimmt man eine gleiche Zellzykluslänge an, ist die wahrscheinlichste Erklärung ein anderer Zellteilungsmodus der Neurone-generierenden Vorläuferzellen, welcher im Telencephalon mehr Neurone pro Neuroepithelzelle und Zellzyklus generiert als im Rhombencephalon – wahrscheinlich wegen eines höheren Anteils an *lineage B*. Offensichtlich stellt das *lineage* Modell B (Abb. 36) einen besonders effizienten Weg zur Neuronenproduktion dar und korreliert innerhalb einer Spezies positiv mit der neurogenetischen Leistung eines Areals.

Diese Überlegung ist auch im Hinblick auf evolutionäre Veränderungen interessant. Könnte auch die evolutionäre Zunahme der Neuronenzahl zwischen verschiedenen Spezies auf ein unterschiedliches Verhältnis von *lineage A* zu *lineage B* zurückzuführen sein? Betrachtet man eine radiale Einheit im Cortex der Ratte bei E18, ist das Größenverhältnis von SVZ:VZ ca. 1:1 (Altman & Bayer, 1991), im höher encephalisierten Rhesusaffen bei E75 ca. 5:1 (Rakic, 1972). Evolutionär weiterentwickelte Spezies haben also eine relativ größere SVZ. Folgt man der Argumentation von Tarabykin und Mitarbeitern (Tarabykin *et al.*, 2001), entstehen Neurone der Schichten IV-II vorwiegend aus der SVZ. Steht die Ausdehnung der SVZ in einem kausalen Zusammenhang mit einer Erhöhung der Neuronenzahl, sollte insbesondere der Anteil dieser Schichten in der Evolution ansteigen.

Tatsächlich nimmt das Verhältnis von Schicht IV-II zu Schicht I, V-VI von 1:1 in der Ratte zu 5:1 im Rhesusaffen zu (Beaulieu, 1993; Beaulieu *et al.*, 1992). Offenbar zeichnen sich größere Gehirne durch einen höheren Anteil von *lineage B* aus. Gerade in diesem Kontext ist es interessant zu untersuchen, wie das Verhältnis zwischen beiden *lineages* gesteuert wird, und welche Gene daran beteiligt sind.

### 4.3 Die asymmetrische Verteilung apikaler Membran korreliert mit Neurogenese

Es wurde oftmals die vertikale bzw. horizontale Zellteilungsebene relativ zur apikalen Oberfläche als zellbiologisches Korrelat proliferierender vs. Neurone-generierender Teilung herangezogen (Chenn & McConnell, 1995). Danach entstehen Neurone durch horizontale Teilungen. Wie bereits erwähnt, ist dieses Modell nicht haltbar (Abschnitt 1.5): Die Zahl der horizontalen Teilungen ist im Verlauf der Neurogenese konstant, d.h. sie korreliert nicht mit der Neuronenproduktion und ist zu gering, um die Entstehung aller Neurone zu erklären. Von Huttner und Brand (Huttner & Brand, 1997) wurde die Verteilung der apikalen Membran auf zwei oder nur eine Tochterzelle als Kriterium proliferierender vs. Neurone-generierender Teilung vorgeschlagen. Hier soll (i) auf die Korrelation der Verteilung apikaler Membran mit Neurogenese und (ii) auf den Zusammenhang zwischen der Verteilung apikaler Membran und der Symmetrie im *cell fate* eingegangen werden.

Eine Analyse der Zellteilungsebene im *TIS21-GFP-knock in* erlaubt es, die Verteilung apikaler Membran auf zellulärer Ebene in Relation zu proliferierenden bzw. Neurone-generierenden Zellteilungen setzen: 90% der Mitosen mit symmetrischer Verteilung apikaler Membran sind größtenteils proliferierend (GFP-negativ), 80% der Mitosen mit asymmetrischer Verteilung apikaler Membran dagegen Neurone-generierend (GFP-positiv) (über das gesamte Gehirn und E9.5-E11.5 vereinigte Daten) (Abschnitt 3.10, Abb. 26). Zellbiologisch asymmetrische Teilungen sind demnach größtenteils Neurone-generierend, die asymmetrische Verteilung apikaler Membran korreliert mit Neurogenese. Es ist zu beachten, dass die Korrelationen der Verteilung apikaler Membran zu Neurone-generierenden Teilungen nicht 1:1 gelten, vielmehr eine Wahrscheinlichkeit ausdrücken: Verteilt eine Zelle die apikale Membran asymmetrisch, wird sie mit großer Wahrscheinlichkeit ein Neuron generieren.

Wie steht die zellbiologische Teilungssymmetrie in Zusammenhang mit der Symmetrie im *cell fate*? Geht man davon aus, dass apikale Neurone-generierende Teilungen asymmetrisch sind (Abschnitt 4.2) folgt: Eine asymmetrische Verteilung apikaler Membran korreliert mit einem asymmetrischen *cell fate*. Man könnte postulieren, dass hier ein Kausalzusammenhang zwischen der asymmetrischen Vererbung apikaler Membran (Neuroepithelzelle vs. Neuron) und dem *cell fate* besteht. Die apikale Membran bzw. assoziierte Faktoren könnten als Proliferationsfaktor eine Tochterzelle im asymmetrischen Teilungsmodus halten. Die andere Zelle erhält diesen Faktor nicht und differenziert

zum Neuron. Welche Mechanismen die Verteilung der apikalen Membran auf die Tochterzellen steuern, ist noch nicht bekannt.

### Asymmetrisch verteilte *cell fate determinants* in der Neuronen-generierenden Zellteilung

Kandidaten für solche *cell fate determinants* wären in erster Linie mit der apikalen Membran oder *junctions* assoziierte Faktoren bzw. Faktoren, die generell in Bezug auf die apikal-basale Polarität der Zelle asymmetrisch lokalisiert sind. Einige Komponenten des Notch-Delta Signalwegs sind beispielsweise in mitotischen Neuroepithelzellen asymmetrisch verteilt (Chenn & McConnell, 1995; Shen *et al.*, 2002). Auf welche Weise laterale Inhibition und asymmetrische Verteilung von *cell fate determinants* bei der Steuerung von Proliferation und Differenzierung im Neuroepithel integriert werden, ist nicht bekannt.

In diesem Zusammenhang ist die erwähnte asymmetrische Verteilung von minibrain-mRNA und -Protein *in vivo* (Hammerle *et al.*, 2002) und TIS21 *in vitro* (L. Farkas, persönliche Mitteilung) interessant. Man kann spekulieren, ob für diese asymmetrische Verteilung ein beiden Proteinen gemeinsames C-terminales Sequenzmotiv verantwortlich ist. Sollte TIS21 *in vivo* ebenfalls asymmetrisch verteilt sein, sollte das Protein in der Neurone-generierenden Teilung nur an das Neuron weitergegeben werden (folgt aus Iacopetti *et al.*, 1999: TIS21-Immunoreaktivität ist im Neuron, d.h. bei asymmetrischer Verteilung muss das Neuron TIS21 erhalten). So würde eine Akkumulation von TIS21 in sich asymmetrisch teilenden Neuroepithelzellen verhindert, die ja in jeder G1-Phase neues TIS21 synthetisieren. Dieser Befund spricht gegen ein Modell, in dem TIS21 durch sukzessive asymmetrische Teilungszyklen akkumuliert und so als Zell-intrinsischer Timer zu der *in vivo* beobachteten sukzessiven Verlangsamung des Zellzyklus beiträgt, die letztendlich zur Differenzierung führt. p27 scheint die Differenzierung von Vorläuferzellen in der Retina über einen solchen Mechanismus zu steuern (Levine *et al.*, 2000).

Im Zusammenhang mit basal lokalisierten *cell fate determinants* ist die asymmetrische Vererbung des basalen Fortsatzes auf das Neuron bei asymmetrischen Neurone-generierenden Teilungen radialer Gliazellen ein zentraler Befund (Miyata *et al.*, 2001). Wenn wir davon ausgehen, dass sich typische Neuroepithelzellen ähnlich verhalten (d.h. den Fortsatz während der Mitose nicht retrahieren), könnten nicht nur apikal, sondern auch basal lokalisierte *cell fate determinants* bzw. Signale von der Basallamina das *cell fate* entscheidend beeinflussen, insbesondere, da sich vor und während der Neurogenese Zusammensetzung und Kontakt zur Basallamina und die Synthese von Rezeptoren für Basallamina-Komponenten ändern (Koch, 2000).

#### 4.4 Ein verlangsamter Zellzyklus korreliert auf zellulärer Ebene mit Neurogenese

Neben der asymmetrischen Verteilung von *cell fate determinants* wurde auch die Verlangsamung des Zellzyklus als möglicher Steuerungsmechanismus diskutiert. Tatsächlich kann eine Verlängerung des Zellzyklus Differenzierung einleiten: *In vivo* (*whole embryo culture*) löst Olomucine, das spezifisch die G1-Phase verlängert, den Zellzyklus aber nicht blockiert, über eine vorzeitige Verlängerung des Zellzyklus eine verfrühte Neurogenese aus (Calegari *et al.*, in Vorbereitung). Es besteht also ein funktioneller Zusammenhang zwischen Verlangsamung des Zellzyklus und Differenzierung.

Falls die Zellzyklusdauer den Übergang von Proliferation zu Neurogenese steuert, sollten sich proliferierende Neuroepithelzellen von Neurone-generierenden in der Zellzyklusdauer unterscheiden. Tatsächlich nimmt der Zellzyklus von GFP-negativen zu GFP-positiven Zellen in der Ventrikularzone um 40% von 9 h auf ca. 13 h zu (Abschnitt 3.11, Abb. 27). Die Werte für GFP-negative Zellen entsprechen den publizierten Daten von ca. 9 h für dieses Stadium (Takahashi *et al.*, 1995). Diese Daten sind zwar über die ganze Population in der Ventrikularzone gemessen, passen aber zu den hier ermittelten Werten, da der Anteil Neurone-generierender Zellen zu Beginn der Neurogenese relativ gering ist.

In dem Experiment wurde prinzipiell die Zunahme der Zellzyklusdauer in der gesamten GFP-positiven Zellpopulation in der Ventrikularzone, d.h. Neurone-generierende Neuroepithelzellen und junge, ebenfalls GFP-positive Neurone, bestimmt. Deshalb wurde die Analyse in einem Stadium gerade bei Einsetzen der Neurogenese (E10.5 Telencephalon) durchgeführt, in dem die meisten Zellen erst umschalten und den Großteil der Neurone erst einem Zellzyklus (d.h. frühestens 8 h später) generieren werden. Zudem wandern junge Neurone innerhalb kurzer Zeit aus der Ventrikularzone aus (bei 50-100  $\mu\text{m}$  Dicke der VZ und 35  $\mu\text{m}$  Geschwindigkeit ca. 2-3 h) (Tochterzelle A; Abb. 25B), der Anteil junger Neurone in der GFP-positiven Zellpopulation in der Ventrikularzone ist deshalb relativ gering. Davon ausgehend scheint es legitim, den Beitrag der Neurone zur Zellzyklusverlangsamung zu vernachlässigen. Man kann also davon ausgehen, dass der Zellzyklus Neurone-generierender Neuroepithelzellen näherungsweise korrekt bestimmt wurde. Eine Verlangsamung des Zellzyklus korreliert demnach tatsächlich auf zellulärer Ebene mit Neurogenese.

Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die Zunahme der durchschnittlichen Zellzyklusdauer in der Neurogenese auf bis über 18 h (Takahashi *et al.*, 1995) gänzlich auf den langsam steigenden Anteil Neurone-generierender Neuroepithelzellen zurückzuführen ist, während die Zellzyklusdauer in der proliferierenden und Neurone-generierenden Population über den Zeitraum konstant bleibt. Der Zellzyklus der Neurone-generierenden Population müsste in diesem Fall über 18 h liegen und nicht bei 13 h. Man kann davon ausgehen, dass bei der Verlangsamung des Zellzyklus auf Populationsebene noch eine additive Komponente existiert, die den Zellzyklus in proliferierenden und Neurone-generierenden Neuroepithelzellen gleichermaßen verlängert.

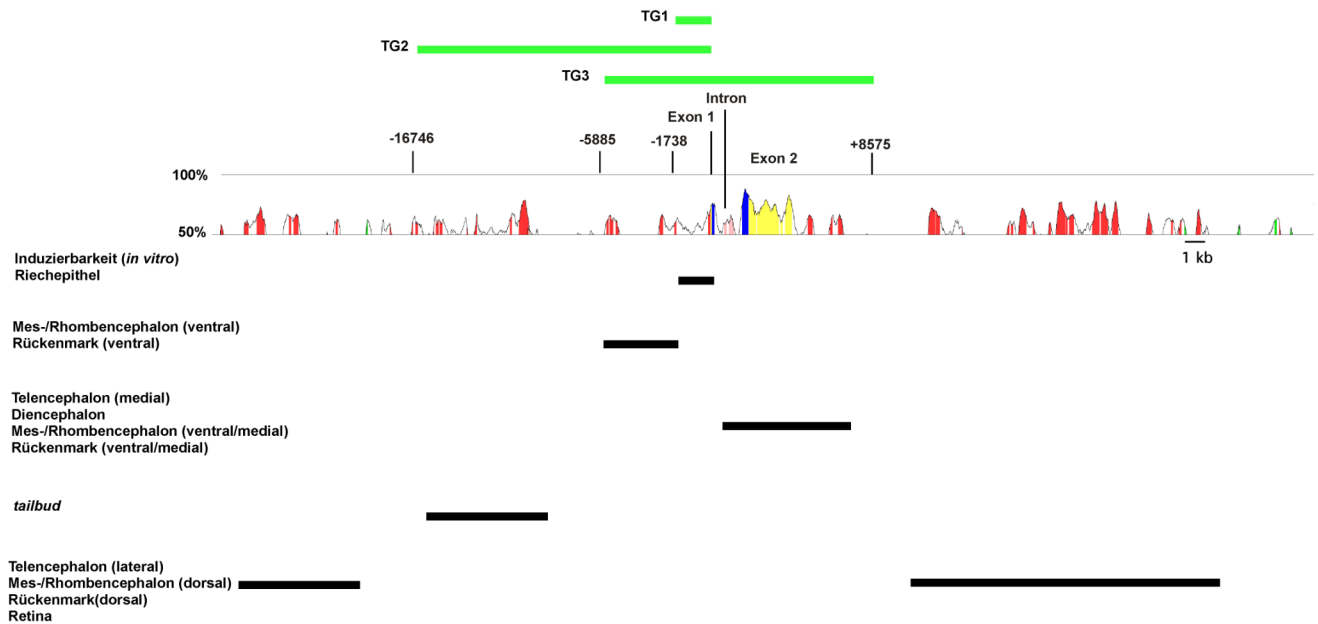
Die beobachtete Verlängerung des Zellzyklus in der GFP- bzw. TIS21-positiven Zellpopulation zusammen mit der antiproliferativen Wirkung von TIS21, lässt Spekulationen über dessen physiologische Funktion zu: Wirkt TIS21 selbst an der Verlängerung des Zellzyklus mit? Wahrscheinlich nicht ausschließlich, vielleicht zusammen mit p27, das zellulär ein identisches Expressionsmuster aufweist (Stuckmann, 1998).

#### 4.5 Regiospezifische Elemente regulieren die Expression von TIS21

Ein Ziel der Etablierung der transgenen Linien war u.a. die Identifizierung eines funktionellen TIS21-Promoters. Ein solcher Promoter könnte (i) zum *screening* nach *upstream* von TIS21 gelegenen Genen und (ii) zur gezielten Expression bestimmter Gene in der TIS21-positiven Zellpopulation im Neuroepithel eingesetzt werden.

##### Modulare Regulation der TIS21-Genexpression

TG1 beinhaltet 2 kb 5', TG2 17 kb 5' und TG3 6 kb 5'+8 kb 3' Sequenzen des TIS21-Gens (Angaben relativ zum Transkriptionsstart). Tatsächlich zeigen die unterschiedlichen Expressionsmuster von transgenen und *knock in*-Linien einige interessante Aspekte. In der frühen Neurogenese (E10.5) zeigt TG1 im Neuroepithel keine Expression, TG2 exprimiert im Mittel-, Hinterhirn und Rückenmark, TG3 im Vorder-, Mittel-, Hinterhirn und Rückenmark. Zusammenfassend findet man: Die für eine Wachstumsfaktor- und Mitogen-abhängige Induzierbarkeit *in vitro* ausreichenden Elemente des proximalen TIS21-Promoters (Fletcher *et al.*, 1991) zeigen *in vivo* keine spezifische Expression (TG1). Eine Erweiterung der Transgene, 5' und 3', auf Intron Exon 2 inklusive 3'UTR und 4 kb 3' genomischer Sequenz, bewirkt eine schrittweise Annäherung (TG2, TG3, KI1) an die Expression von endogenem TIS21 (Abschnitt 3.4, Tab. 3 & 4). Regulatorische Elemente im Bereich von 2-5kb 5' sind ausreichend, um GFP in Mittel-, Hinterhirn und Rückenmark zu exprimieren (Abb. 37). Hier exprimieren sowohl TG2 als auch TG3. Geht man davon aus, dass nur ein Element diese Expression steuert, muss es innerhalb gemeinsamer genomischer Sequenzen von TG2 und TG3, aber ausserhalb von TG1 liegen. Elemente, die bis +8 kb 3' zum Transkriptionsstart liegen, steigern die Expression im Vorderhirn. Sie sind nur in TG3 enthalten, das auch als einziges Transgen in diesen Bereichen exprimiert (Abb. 37). Da nicht alle TIS21-mRNA positiven Areale Expression zeigen, kann man auf weiter entfernt liegende Elemente schließen, die für das volle Expressionsmuster von TIS21 erforderlich sind. Tatsächlich finden sich auch außerhalb der Transgene (-17 kb und +8 kb) innerhalb eines Bereichs -28 kb bis + 26 kb zwischen Mensch und Maus konservierte Bereiche mit evolutionär konservierten Transkriptionsfaktorbindestellen, die natürlich nur im Fall des *knock in* abgedeckt werden (Abb. 37).



**Abb. 37. Transkriptionskontrolle von TIS21.** (Oben) Genomische Bereiche des TIS21-Gens in den Transgenen TG1, TG2 & TG3. (Mitte) Homologiebereiche von TIS21 in Mensch und Maus (dargestellter Bereich 50-100% Homologie in einem 300 bp Fenster; Positionen bezogen auf BTG2) und evolutionär hoch konservierte nicht-codierende Bereiche innerhalb dieser homologen Bereiche in nicht-transkribierten Abschnitten (dunkelrot), im TIS21-Intron (hellrot) und in der TIS21-3'-UTR (gelb) bzw. evolutionär konservierte codierende Bereiche im TIS21-ORF (blau). (Unten) Zuordnung der Expressionsdomänen zu den konservierten Bereichen. Die konservierten Bereiche des TIS21-Gens können auf Grund des Expressionsmusters der Transgene bestimmten Expressionsdomänen zugeordnet werden: Konservierte Bereiche von +0.2 kb bis +6.3 kb (inkl. Intron und 3'UTR) könnten die Expression von TG3 im Vorderhirn steuern. Diese Bereiche fehlen beispielsweise in TG2, das nicht im Vorderhirn exprimiert. Konservierte Bereiche ausserhalb der Transgene stromauf von -16 kb und stromab von +8kb könnten die Expression im dorsalen Neuralrohr inklusive des dorsalen Telencephalons kontrollieren. Der unmittelbare Bereich stromauf von TIS21 (mit dem *in vitro* funktionellen Promoter) enthält vergleichsweise wenig konservierte Bereiche. So ist es nicht überraschend, dass TG1 *in vivo* kaum exprimiert. Die hoch konservierten nicht-codierenden Bereiche in Intron und in nicht transkribierten genomischen Abschnitten, nicht jedoch in der 3'-UTR enthalten alle evolutionär konservierte Transkriptionsfaktorbindestellen. Die Funktion der hoch konservierten TIS21-3'-UTR ist offensichtlich weniger in der Kontrolle von Transkription als in z.B. mRNA-Lokalisation zu suchen. (Angaben in bp relativ zum Transkriptionsstart; Daten aus dem ECR Genome Browser).

Die Expression von TIS21 scheint von verschiedenen Modulen gesteuert, die jeweils bestimmte Regionen im ZNS abdecken. Das vollständige TIS21-Expressionsmuster setzt sich nach einer Art Baukastenprinzip zusammen. TG2 exprimiert regiospezifisch unvollständig, innerhalb der positiven Zellpopulation trotzdem in der richtigen Phase des Zellzyklus (G1/S-Phase, erkennbar in Abschnitt 3.6, Abb. 18 an der starken Expression im basalen Drittel der Ventrikularzone) und in dem richtigen Zelltyp (Neuroepithelzelle), obwohl nicht alle regulatorischen Elemente vorhanden sind: So sind z.B. Telencephalon und Diencephalon negativ. Eine analoge Argumentation gilt für TG3. Es könnte sein, dass verschiedene separate Elemente eine zelltyp- bzw. zellzyklusabhängige und regiospezifische Expression steuern. TIS21 ist, ähnlich Nestin, auch im ganzen Neuralrohr in jeder Neurone-generierenden Zellteilung exprimiert (unabhängig von dem generierten neuronalen Subtyp und dem Entwicklungsstadium). Regiospezifische Elemente innerhalb des Nestin-Enhancers bauen übrigens auch das Nestin-Expressionmuster modular auf (Josephson *et al.*, 1998).



Ein vollständig funktioneller TIS21-Promoter konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Mit TG2 und TG3 wurden zumindest partiell funktionelle Promoterfragmente identifiziert, die es erlauben, die in Abschnitt 1.9 beschriebenen experimentellen Ansätze weiter zu verfolgen. TG3 kommt in seiner Expression dem endogenen TIS21-Expressionsmuster nahe, deckt es aber nicht vollständig ab. Um ein funktionelles Transgen zu erhalten, sind offensichtlich größere genomische Abschnitte erforderlich. Zu diesem Zweck wurde ein BAC-Klon (RP-24-163M8) identifiziert, der 5' und 3' des TIS21-Gens mindestens 100 kb bzw. 30 kb flankierende Sequenzen, also auch die *in silico* identifizierten regulatorischen Sequenzen, die größtenteils innerhalb des Bereichs von -30 kb bis +15 kb liegen, enthält.

#### 4.6 Zur Funktion von TIS21 in Proliferations- und Differenzierungsprozessen

Die Aktivität des TIS21-Gens ist nicht auf das Neuroepithel begrenzt, sondern erstreckt sich im Embryo (Abschnitt 3.4, Tab. 3 & 4) und im Adulten (Abschnitt 3.14, Tab. 7) über verschiedene Gewebetypen.

In Abschnitt 3.4 & 3.14 wurde die GFP-Fluoreszenz nicht immer mit TIS21-Immunfärbung überprüft bzw. mit TIS21-mRNA korreliert. Strenggenommen weiß man nicht immer, ob TIS21-mRNA und Protein tatsächlich vorhanden sind (siehe hierzu Abschnitt 4.1). Man kann dies aber annehmen, da für Lunge, Darm, Thymus, Herz und Gehirn die Fluoreszenz mit der TIS21-Expression im Western-Blot übereinstimmt und deshalb näherungsweise die GFP-Fluoreszenz mit der TIS21-Protein Expression gleichsetzen.

##### TIS21 ist beim Übergang zur Differenzierung exprimiert

In vielen Geweben bzw. Organen ist das TIS21-Gen im Laufe ihrer Entwicklung aktiv, in manchen nur transient, wie z.B. im Herz und im Gehirn. Herz und Gehirn exprimieren nur im Embryo - im Adulten sind hier die Proliferationsprozesse abgeschlossen. (Das adulte Gehirn ist bis auf die Zellen der adulten Subventrikularzone, die neben dem *Gyrus dentatus* die einzigen Zellen sind, die im adulten ZNS Neurone bilden, negativ). Die Expression des TIS21-Gen in verschiedenen Zellsystemen (neuronale Stammzellen vs. neuronale Vorläufer und ältere Neurone im Neuroepithel, Krypten vs. Villi im Darm, embryonale vs. adulte Muskelzellen im Herz, höhere Aktivität in Lymphozyten im Blut vs. Knochenmark) weist auf ein allgemeines Motiv der TIS21-Genexpression hin: TIS21 ist generell in Zellpopulationen exprimiert, die von Proliferation in Differenzierung übergehen. (Vielleicht hängt die Expression im Uterusepithel (Abschnitt 3.14, Abb. 31.15) damit zusammen und spiegelt Regenerationsprozesse der Gebärmutter Schleimhaut wider).

In diesem Zusammenhang ist die Korrelation von TIS21-Expression und Prominin-Expression (CD133) in Blutstammzellen sehr interessant: Im Blut und Neuroepithel markiert TIS21 eine

Subpopulation Prominin-positiver Stammzellen. Eine Expression von TIS21, insbesondere auch in Kombination mit Prominin in neuronalen und hämatopoetischen Zellsystemen, wäre nicht ganz unerwartet: Genexpressionsstudien deuten tatsächlich auf ein allgemeines überlappendes Genexpressionsprogramm in beiden Systemen hin (Terskikh *et al.*, 2001). Ist TIS21 ein genereller Marker für differenzierende Stammzellen? Die antiproliferative Funktion könnte man in dieser Richtung interpretieren: TIS21 induziert über eine Verlangsamung des Zellzyklus eine differenzierende Teilung (siehe Abschnitt 1.6). Man würde, wie schon angesprochen, bei Verlust der TIS21-Genfunktion eine Überproliferation erwarten. Der Verlust der TIS21-Expression in Brust- (Duriez *et al.*, 2002) und Prostatakarzinomen (Ficazzola *et al.*, 2001) bzw. Zellen aus Tumor-Zelllinien aus Lunge und Thymus (Lim *et al.*, 1995) ist ein Hinweis.

### TIS21 hat eine physiologische Funktion im blutbildenden System

In dieser Arbeit wurden KI1-homozygote Tiere als *knock out*-Modell für TIS21 vorgestellt. Man könnte generell einen „quantitativen“ Phänotyp ähnlich dem *p27-knock out*-Phänotyp erwarten (Zunahme von Zellzahl und Körpergröße, Nakayama *et al.*, 1996). *p27* ist, wie TIS21, ein negativer Regulator des Zellzyklus, wirkt also antiproliferativ. Bis jetzt konnte noch kein systemischer Phänotyp ähnlich *p27* detektiert werden, auch nicht im Neuroepithel (Abschnitt 3.13). Grund kann der besprochene, nicht homogene genetische Hintergrund sein, in dem ein quantitativer Phänotyp (spätere Differenzierung, mehr Neurone, ähnlich des *p27-knock out*-Phänotyps) schwer zu detektieren ist. Zur Homogenisierung des genetischen Hintergrunds werden derzeit Rückkreuzungen durchgeführt. Interessant wäre, ob die Verlangsamung des Zellzyklus in der Neurone-generierenden Zellteilung im *TIS21-knock out* nicht mehr zu detektieren ist. Eine antiproliferative Funktion von TIS21 *in vivo* und eine mögliche Rolle in der Neurogenese wäre somit bewiesen. TIS21 wäre in diesem Fall der maßgebliche Faktor, der über eine Verlangsamung des Zellzyklus Differenzierung steuert.

Neben dem Neuroepithel wurde auch das blutbildende System auf einen Phänotyp untersucht. Tatsächlich führt der Verlust der Genfunktion zu einem Phänotyp im blutbildenden System. Hier ist das TIS21-Gen besonders aktiv und ein Phänotyp sicherlich am ehesten zu detektieren. Es tritt eine Populationsverschiebung zu Lasten der Lymphozyten und zu Gunsten der Granulocyten auf. Zwischen einer Veränderung der *cell fate decision* in der *lineage* zu Granulocyten oder einer einfachen Überproliferation an Granulo- und Monocyten kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht unterschieden werden. Zusätzlich zur Verschiebung der Populationen veränderte absolute Zellzahlen (z.B. insgesamt mehr Leukocyten) können also nicht ausgeschlossen werden. Geht man aber von einer veränderten *cell fate decision* aus, muss der entscheidende Schritt in der *lineage* vor der Maturierung zu Granulocyten liegen, da die Granulocyten selbst nicht TIS21-positiv sind. In Bezug auf eine mögliche Funktion von TIS21 bei der Proliferationskontrolle im Blutsystem ist bemerkenswert, dass BTG1 in einer mit B-Zelllymphomen assoziierten Translokation involviert ist (Rouault *et al.*, 1992).

#### 4.7 Die Suche nach Kandidatengenem zur Proliferationskontrolle – ein mechanistischer Ansatz

Die *TIS21*-GFP-Linien bieten die Möglichkeit, durch ein *gene expression profiling* der GFP-positiven vs. -negativen Population von Neuroepithelzellen direkt nach Genen zu suchen, die an diesem Umschaltprozess beteiligt sind. Diese differentielle Analyse ist der von Geschwind *et al.*, 2001 vorgestellten Strategie, Gene zu identifizieren, die an der Differenzierung neuronaler Stammzellen beteiligt sind, weit überlegen. In dieser Studie wurde ein *in vitro*-Kultursystem eingesetzt, in dem ein differentieller Status der Neuroepithelzellen (proliferierend vs. differenzierend) über bFGF instruiert wurde. In dem in dieser Arbeit vorgestellten System würden die Daten dagegen direkt aus dem *in situ* Status der Zellen gewonnen: Neuroepithelzellen könnten dissoziiert und nach FACS-Sorting deren Genexpressionsprofil mit DNA-Arrays untersucht werden. Es ist anzunehmen, dass man so auf direktem Weg und mit weniger Hintergrund zu entsprechenden Kandidatengenem kommt, da proliferierende und differenzierende Neuroepithelzellen, „*in vivo*-Nachbarn“ im Neuroepithel, direkt miteinander verglichen würden. Die Analyse muss sich auf Neuroepithelzellen, unter Ausschluss der ebenfalls GFP-positiven jungen Neurone, beschränken. Man könnte dies z.B. durch die Markierung von Neuroepithelzellen mit Prominin, einem im Neuroepithel ausschließlich von Neuroepithelzellen exprimierten Marker für die apikale Plasmamembran (Weigmann *et al.*, 1997), oder durch eine Doppelmarkierung in Kombination mit  $\beta$ -III-Tubulin-BAC-Linien erreichen (siehe 4.1).

Aus Genexpressionsdaten können zwar nicht zwingend funktionelle Daten abgeleitet werden, in erster Näherung kann man aber davon ausgehen, dass Expressionsmuster nicht ohne Grund mit einem biologischen Prozess korrelieren. Hier wären sicherlich Gruppen von Genen interessant, die mit der Expression von *TIS21* korrelieren – positiv und insbesondere negativ: Ein Proliferationsfaktor, der Neuroepithelzellen in ihrer proliferativen Phase hält, wäre im Expressionsprofil auf zellulärer Ebene komplementär zu *TIS21*. Durch ein differentielles Genexpressionsprofil ermittelte Kandidatengene können sowohl parallel als auch *up*- und *downstream* von *TIS21* liegen, müssen aber nicht notwendigerweise funktionell an *TIS21* gekoppelt sein. Vielleicht könnte man Gruppen koregulierter Gene (*synexpression groups*) finden, die ursächlich mit diesem Prozess zusammenhängen. Diese Netzwerke koregulierter Gene könnte man über eine Suche nach im Genexpressionsprofil ähnlichen Genen, die von gleichen regulatorischen Motiven gesteuert werden, identifizieren. Strategien, regulatorische Sequenzen durch inter-Speziesvergleiche *in silico* zu identifizieren, wurden vorgestellt (Loots *et al.*, 2002). Ein nachfolgender inter-Spezies-Vergleich innerhalb dieser Kandidatengene zur Identifikation eventueller Mutationen in Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der regulatorischen Sequenzen bietet sich an. Man kann erwarten, dass in diesen Sequenzen evolutionär relevante Veränderungen abgelaufen sind. Es wird im allgemeinen diskutiert, dass sich nahe verwandte Spezies wie z.B.

Mensch und Schimpanse, gerade auch im Genexpressionsprofil unterscheiden (King & Wilson, 1975, Enard *et al.*, 2002).

#### Die Suche nach *downstream* Kandidaten

Führt man das oben beschriebene *gene expression profiling* nicht nur an heterozygoten, sondern auch an homozygoten Embryonen durch, so eröffnet sich eine elegante Möglichkeit, in den Veränderungen des Genexpressionsprofils der hetero- vs. homozygoten GFP-positiven Populationen einen Phänotyp zu entdecken. Die GFP-negative (proliferierende) Zellpopulation kann dabei als interne Kontrolle dienen. Zellen dieser Population „wissen“ ja nicht, dass sie ein *knock out* sind - sie können keinen *loss of function*-Effekt „fühlen“, da sie sowieso TIS21 noch nicht angeschaltet haben. Die Veränderungen im Genexpressionsmuster (GFP-positive Population KI1-hetero- vs. KI1-homozygoter Tiere) deuten auf jeden Fall auf *downstream* von TIS21 liegende Gene hin, nur sie würden durch die Abwesenheit von TIS21 betroffen.

#### Die Suche nach *upstream* Kandidaten

Wie kann man gezielt *upstream* von TIS21 gelegene Gene identifizieren? Prinzipiell können *upstream* gelegene Gene durch Überexpression und *loss of function* untersucht werden, *in vitro* und *in vivo*, letzteres in transgenen Mäusen oder durch Elektroporation und anschließender *whole embryo culture*. TIS21-GFP-ES-Zellen könnten mit einer Expressionslibrary transfiziert und in neuronale Zellen differenziert werden. Man könnte dann nach Klonen suchen, die auf dem Weg zur neuronalen Differenzierung durch die Expression der cDNA die Expression von TIS21 fördern bzw. supprimieren. Gene mit diesen Effekten wäre ein Kandidat eines Gens zur Proliferationskontrolle. Ein sehr „direkter“ *screen* könnte mit einem TIS21-GFP-BAC durchgeführt werden, der einen positiven bzw. negativen Selektionsmarker enthält. Man würde entsprechend die überlebenden Zellen selektionieren. Wie erwähnt, wurde ein solcher BAC bereits identifiziert.

Eine Alternative wäre, *in silico* Genabschnitte mit regulatorischen Sequenzen zu identifizieren. Strategien, solche regulatorische Sequenzen durch inter-Spezies-Sequenzvergleiche zu finden, wurden diskutiert (Pennacchio & Rubin, 2001; Loots *et al.*, 2002). Diese Genabschnitte könnten dann in einem *Yeast one Hybrid screen* eingesetzt werden – der an diese Sequenzen bindende Faktoren liefern sollte. Bei diesen Experimenten könnten die Genabschnitte und die *libraries* (die die an die Genabschnitte bindenden Faktoren enthalten) aus verschiedenen Spezies miteinander kombiniert werden um evolutionäre Veränderungen zu identifizieren und festzustellen, ob diese *in cis* bzw. *trans* zu dem entsprechenden Gen abgelaufen sind.

Über einen inter-Speziesvergleich wurden bereits konservierte regulatorische Elemente im TIS21-Gen *in silico* identifiziert (eigene Beobachtungen), die nachfolgend in einem entsprechenden *screening* eingesetzt werden könnten. In den auf dieser Weise identifizierten regulatorischen

Sequenzen könnten funktionelle Veränderungen über eine heterologe Expression dieser Sequenzen als Transgen in einer anderen Spezies analysiert werden.

### Die Suche nach Genen mit genetischen Ansätzen

Neben dem hier beschriebenen, auf einer mechanistischen Überlegung basierenden, Ansatz („*timing* des Umschaltens determiniert Neuronenzahl“) können auch auf rein phänotypischen Kriterien aufgebaute Strategien verfolgt werden. Ein solcher Ansatz ist die Analyse von QTL's (*quantitative trait loci*). Hier wird über die Kreuzung von Mausstämmen mit verschiedenen Phänotypen deren Segregation mit genetischen Markern verfolgt und so die *linkage* des Phänotyps (z.B. großes Gehirn) mit genomischen Regionen ermittelt. Ein Problem dabei ist die Größe der Regionen, die sich meistens über mehrere Gene erstrecken und in denen nur sehr aufwendig einzelne Kandidaten eingegrenzt werden können. So konnten zwar QTL's für die Neuronenzahl in der Retina und auch für Teile des Gehirns, aber noch nicht die relevanten Gene innerhalb der genomischen Bereiche identifiziert werden (Williams, 2000). Es wird diskutiert, über die Kombination von QTL- und Genexpressionsdaten die Identifizierung von relevanten Genen zu beschleunigen (Carter *et al.*, 2001). Neue, auf SNP's-(*single nucleotide polymorphism*)-Phänotyp-Korrelationen basierende Techniken ermöglichen es, solche Gene *in silico* zu finden (Grupe *et al.*, 2001). Diese Methoden eröffnen Perspektiven in Bezug auf die mögliche Identifizierung von Kandidatengen und würden einen rein mechanistischen Ansatz sinnvoll ergänzen.

## **4.8 Evaluierung von Kandidatengen: Gen-*knock down* durch esiRNA**

Typischerweise wird die physiologische Funktion von Kandidatengen durch Überexpression oder *loss of function* des betreffenden Gens untersucht. Für viele experimentelle Ansätze wäre es wünschenswert, die Genexpression zu einem bestimmten Zeitpunkt gezielt an bzw. auszuschalten, im Kontext dieser Arbeit z.B. im Neuroepithel zum Zeitpunkt des Umschaltens zu Neurogenese.

Eine zeitlich definierte Überexpression kann, je nach *assay*-System, in (transienten) transgenen Mäusen mit induzierbaren Promotern oder durch Transfektion der Embryonen bzw. Explantaten in Kultur erreicht werden (Elektroporation von Embryonen gefolgt von *whole embryo culture* bzw. Elektroporation oder virale Infektion von Explantaten und Zellen in Kultur).

Zeitlich definierte *loss of function*-Studien im Säuger erfordern derzeit immer noch die Etablierung eines klassischen induzierbaren *knock out*-Modells über homologe Rekombination in ES-Zellen - ein arbeits- und zeitintensiver Prozess. Hier wurde deshalb die Verwendung von RNAi als eine alternative Methode zur Unterdrückung der Genexpression untersucht. RNAi wurde in anderen Spezies erfolgreich zur systematischen Analyse der Genfunktion eingesetzt, allerdings war bis vor kurzem noch nicht geklärt, ob auch im Säuger *in vivo* RNAi via si-(*small interfering*)-RNA

ausgelöst und zur selektiven Suppression der Genexpression eingesetzt werden kann (McCaffrey *et al.*, 2002). Zwar wurde schon „lange ds-(*double stranded*)-RNA“ in Mäuseembryonen erfolgreich eingesetzt, allerdings war die Technik auf präimplantatorische Stadien limitiert (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000; Svoboda *et al.*, 2000; Zernicka-Goetz, 2000). Als problematisch erwies sich dabei insbesondere die durch „lange dsRNA“ ausgelöste IFN-(Interferon)-*response*, die in späteren Stadien zu einem unspezifischen und generellen Abschalten der Genexpression führt (Yang *et al.*, 2001), die aber bei kürzeren si-(*short interfering*)-RNAs nicht auftritt. Aus diesem Grund wurde in den hier vorgestellten Experimenten (Abschnitt 3.16), si-(*short interfering*)-RNA, genauer: esi-(*endoribonuclease-prepared short interfering*)-RNA, eingesetzt. esiRNA entsteht durch Endoribonuclease-Verdau doppelsträngiger RNA, die in der Regel als annealtes Transkript durch *in vitro*-Transkription einer cDNA, flankiert von z.B. T3 und T7-Promoterbindestellen, gewonnen wird (Abschnitt 2.2.28). esiRNA ist demnach gegen eine ganze cDNA gerichtet und nicht, wie synthetische si-(*short interfering*)-RNA, nur gegen bestimmte Sequenzen auf der cDNA. Dies induziert RNAi sehr effektiv und schaltet somit die Genexpression sehr effizient aus. Zudem bietet die relativ einfache Herstellung der esiRNA gegenüber der Oligonucleotidsynthese konventioneller siRNA einen Kosten- und Zeitvorteil (es muss nicht erst eine besonders gut funktionierende Zielsequenz in der cDNA identifiziert werden, über die RNAi induziert werden kann).

Wie erwähnt, wurde der *proof of principle* (RNAi via esiRNA funktioniert und ist spezifisch) mit einem experimentellen System untersucht, dass es erlaubt, die Genexpression im Neuroepithel zu Beginn der Neurogenese zu unterdrücken. Tatsächlich konnten durch Elektroporation von intraventrikulär injizierter esiRNA in Neuroepithelzellen, gefolgt von *whole embryo*-Kultur, selektiv die Expression eines von zwei koelektroporierten Reportergenen und die Expression eines endogen exprimierten Gens unterdrückt werden. Diese Befunde haben mehrere Implikationen. (i) *Post-transcriptional gene silencing* via esiRNA-vermitteltes RNAi funktioniert im lebenden Säuger (hier: postimplantatorische Mäuseembryonen). (ii) Die Unterdrückung der Expression des endogen exprimierten GFPs ist erstaunlich effektiv: Der Abfall in der Zahl GFP-exprimierender Zellen von 90% (Abschnitt 3.16, Abb. 35H) liegt deutlich höher als man von der Elektroporationseffizienz, die in einem betroffenen Areal 50% nicht übersteigt (Abschnitt 3.16, Abb. 34G), erwarten sollte. Dieser Befund könnte durch eine interzelluläre Verbreitung von RNAi im Gewebe erklärt werden. Derzeit sind solche RNAi vermittelten systemischen Effekte in *Caenorhabditis elegans* und in einigen Pflanzen bekannt (Fire *et al.*, 1998; Winston *et al.*, 2002; Klahre *et al.*, 2002)<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> Könnten auf RNA-Ebene Proliferations- und Differenzierungsprozesse in Geweben gesteuert werden? Überlegungen in dieser Richtung sind derzeit rein spekulativ. siRNAs könnten zwischen verschiedenen Zellen transportiert werden und so die Genexpression in einem ganzen Gewebeverband koordinieren. Auf diese Weise könnte das Genexpressionsprofil der Zellen untereinander abgeglichen werden – Genregulation auf RNA-Basis würde dem Zellverband eine Identität auf Transkriptionsebene geben. Solch ein Mechanismus würde eine Art inter-zelluläre Kommunikation von Transkriptomen darstellen. Die Zellen würden sich den „Umweg“ über

Man kann sich vorstellen, esiRNA auch in Kombination mit *in utero*-Elektroporation einzusetzen, was den Zeitpunkt einer phänotypischen Analyse unabhängig von der Kulturdauer macht. Zudem ist die Technik sicher nicht auf das Neuroepithel beschränkt. In anderen Experimenten wurde ein GFP-Expressionsplasmid mit bzw. ohne esiRNA (Kontrolle) gegen GFP in das embryonale Herz von Mäuseembryonen (E10) elektroporiert. Nach 24 h *whole embryo culture* konnte GFP nur in der Kontrolle detektiert werden (n=4). Es konnten dabei keine negativen Auswirkungen auf Herzfunktion und Entwicklung der Embryonen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Elektroporation von Nukleinsäuren ist auch in Gewebe ohne Kavität möglich (Aihara & Miyazaki, 1998), was die Einsatzmöglichkeiten auf prinzipiell alle Gewebe erweitert.

In der hier vorgestellten Einsatzweise ist RNAi als komplementärer Ansatz, keinesfalls aber als echte Alternative, zu *knock out*-Modellen zu verstehen. Mit RNAi ist ein *knock out* auf klonaler Ebene möglich. Es sei erwähnt, dass sh-(*short hairpin*)-RNA, transkribiert von ektopischer oder ins Genom integrierter Vektor-DNA, über Polymerase III *in vivo* RNAi induziert (McCaffrey *et al.*, 2002). Das lässt die Möglichkeit offen, diese DNA-Sequenzen als induzierbares Transgen in das Genom zu integrieren.

Prinzipiell könnte in Experimenten siRNA gegen mehrere Gene eingesetzt werden, was ein kombinatorisches *screening* ermöglicht und die Evaluierung von Kandidatengenomen erheblich beschleunigt. Zudem könnten so mehrere Gene eines Signalweges und Gene einer Proteinfamilie (mit redundanten Funktionen) ausgeschaltet werden. Im Fall von TIS21 wäre dies BTG3, das ebenfalls in der Ventrikularzone exprimiert ist, im TIS21-*knock out* vielleicht dessen Funktion übernimmt und einen Phänotyp maskieren könnte.

#### 4.9 Perspektive

Basis des experimentellen Konzepts (Abschnitt 1.9) war es, GFP unter Kontrolle des TIS21-Gens gezielt in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen zu exprimieren und damit (i) die Symmetrie der Neurone-generierenden Zellteilung und neuronale *lineage* sowie (ii) die zellbiologischen Mechanismen und Gene, die das Umschalten von Proliferation zu Neurogenese steuern könnten, zu untersuchen. Das ganze Konzept steht und fällt mit der **spezifischen** Markierung Neurone-generierender Neuroepithelzellen durch GFP bzw. der Deduktion, dass TIS21 tatsächlich in diesen Zellen exprimiert ist (Iacopetti *et al.*, 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten geben

---

Proteine sparen. Es fällt schwer zu glauben, dass der evolutionär konservierte RNAi-Mechanismus lediglich zur Verteidigung gegen Viren existiert. Es könnte sich vielmehr um eine urzeitliche Form der Genregulation handeln. Es ist bekannt, dass andere Klassen kleiner RNA-Moleküle beim *timing* biologischer Prozesse eine entscheidende Rolle spielen (Pasquinelli & Ruvkun, 2002).

keinen Grund zu einer gegenteiligen Annahme. Insgesamt erwies sich die experimentelle Strategie als umsetzbar, sowohl in Bezug auf die Expression von GFP in Neurone-generierenden Neuroepithelzellen in *TIS21*-GFP-Mauslinien als auch auf die Verwendung dieser Linien in statischen und videomikroskopischen Analysen.

### Neurone-generierende Zellteilungen und neuronale *lineage*

Offenbar entstehen Neurone im Cortex aus asymmetrischen, apikalen Mitosen typischer Neuroepithelzellen und aus symmetrischen, basalen Teilungen von „basalen mitotischen Zellen“. Es wurde diskutiert, dass beide Schlussfolgerungen strenggenommen nicht endgültig bewiesen sind. Eine zeitlich längere videomikroskopische Analyse, idealerweise mit kombinierten Markern (z.B. in *TIS21*-GFP- plus  $\beta$ -III-Tubulin-BAC-transgene Linien), könnte auf direkte und elegante Weise die Symmetrie der Neurone-generierenden Zellteilungen in Vertebraten bzw. Säugern eindeutig klären.

Die nächste Herausforderung ist die *lineage* „proliferierende Neuroepithelzelle – Neuron“ für apikale und basale Neurone-generierende Zellteilungen zu charakterisieren. Besteht ein Zusammenhang zwischen *lineage* A und B mit dem Fortschritt der Neurogenese und/oder dem generierten neuronalen Subtyp (Pionierneurone, Neurone verschiedener Schichten, Neurotransmitter-Subtyp)? Wie wird das Verhältnis zwischen beiden *lineages* gesteuert? Hierzu wäre die Etablierung molekularer Marker für die Zelltypen proliferierende Neuroepithelzelle (z.B. Nestin), Neurone-generierende Neuroepithelzelle (z.B. *TIS21*), „Vorläuferzelle der basalen mitotischen Zelle“ (=Neuroblast), „basale mitotische Zelle“ (BMC) (z.B. *TIS21*), Zellen der Subventrikularzone (z.B. *Svet1*) sowie verschiedener neuronaler Subtypen hilfreich.

### Proliferation - Neurogenese: Mechanismen und Gene

Die Korrelation von asymmetrischer Verteilung apikaler Plasmamembran mit Neurogenese weist auf eine zentrale Bedeutung apikaler Plasmamembran bei der Steuerung von *cell fate decisions* im Neuroepithel hin. In diesem Kontext könnte die Verteilung mit apikaler Plasmamembran oder *junctions* assoziierten Komplexen (ASIP/aPKC/Par-6) und asymmetrisch lokalisierter Proteine (z.B. *minibrain*, *TIS21*) in proliferierenden vs. differenzierenden Teilungen untersucht werden.

Der Faktor Zeit (als Zunahme der Zellzykluslänge) scheint ebenfalls die Differenzierung von Neuroepithelzellen zu steuern. Naheliegender ist, die Zellzyklusdauer von GFP-positiven Zellen im *TIS21-knock out* (*KI1<sup>\*\*</sup>*) zu bestimmen. Ist der Unterschied zwischen GFP-positiven und GFP-negativen Zellen im Vergleich zu heterozygoten Tieren reduziert, ist *TIS21* ursächlich an der Verlängerung des Zellzyklus beteiligt und man hätte dessen antiproliferative Wirkung *in vivo* nachgewiesen.

Ein *gene expression profiling* der proliferierenden (GFP-negative) vs. differenzierenden (GFP-positive) Neuroepithelzellen sollte unabhängig davon, ob Neurone auf einer oder zwei neuronalen



Vorläuferpopulationen entstehen, Kandidatengene liefern, die an der Proliferationskontrolle im Neuroepithel beteiligt sind.

### Funktion von TIS21

Phänotypische Effekte können je nach dem genetischem Hintergrund der Mauslinie gemildert werden, insbesondere bei redundanten Funktionen des Proteins. Im Fall von TIS21 wäre dies BTG3, das ebenfalls in der Ventrikularzone exprimiert ist und im TIS21-*knock out* vielleicht dessen Funktion übernehmen kann. Veränderungen auf der Ebene der molekularen Interaktionspartner von TIS21 im TIS21-*knock out* (z.B. ein verändertes Proteinmethylierungsmuster, veränderte CyclinD1/E-Level, Zellzykluslänge (siehe oben) sowie Veränderungen im Genexpressionsmuster) bleiben detaillierteren Analysen vorbehalten.

### Nicht nur Neuronenzahl – therapeutische Aspekte

Die TIS21-positiven Zellpopulationen sind auch im Hinblick auf therapeutische Anwendungen neuronaler Stammzelltherapien interessant. Es wurden Strategien vorgeschlagen, GFP unter der Kontrolle eines für neuronale Stammzellen spezifischen Promoters transient in Stammzellpopulationen (ES- oder neuronale Zellen) zu exprimieren und mittels FACS die Subpopulation neuronaler Stammzellen anzureichern (Roy *et al.*, 2000). Bis jetzt wurde in der Regel Nestin als Marker eingesetzt, um diese Zellen zu isolieren (Roy *et al.*, 2000). Dabei ist fraglich, ob die Nestin-positive Population nicht ein zu großes proliferatives Potential hat (Gefahr der Tumorbildung), um sicher *in vivo*, nach Transplantation, eine neuronale Differenzierung einzugehen (Roy *et al.*, 2000; Sawamoto *et al.*, 2001). TIS21-positive Zellen sind auf jeden Fall in ihrem Potential für die Generierung von Neuronen spezifiziert. Die eventuelle Gefahr einer unkontrollierten Proliferation wäre deshalb weitaus geringer als im Fall der Nestin-positiven Stammzellpopulation, in der ausnahmslos alle Neuroepithelzellen, ganz gleich ob sie proliferieren oder differenzieren, GFP-markiert sind (Yamaguchi *et al.*, 2000). Es ist offensichtlich, dass die TIS21-GFP-*knock in*-Linie auch die Erstellung von Genexpressionsprofilen neuronaler Stammzellen bezüglich therapeutischer Fragestellungen sinnvoll ergänzen könnte.

## 5 LITERATUR

- Aaku-Saraste, E., A. Hellwig and W. B. Huttner (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. Dev Biol **180**: 664-79.
- Aaku-Saraste, E., B. Oback, A. Hellwig and W. B. Huttner (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. Mech Dev **69**: 71-81.
- Aihara, H. and J. Miyazaki (1998). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. Nat Biotechnol **16**: 867-70.
- Altman, J., & S. Bayer (1991). Neocortical development, Raven Press.
- Appel, B., L. A. Givan and J. S. Eisen (2001). Delta-Notch signaling and lateral inhibition in zebrafish spinal cord development. BMC Dev Biol **1**: 13.
- Bahnsen, U. (2001). Die Gene des Geistes. Die Zeit. Hamburg. **05**.
- Banerjee, A., M. C. Roach, P. Trcka and R. F. Luduena (1990). Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin. J Biol Chem **265**: 1794-9.
- Barton, R. A. and P. H. Harvey (2000). Mosaic evolution of brain structure in mammals. Nature **405**: 1055-8.
- Beaulieu, C., Z. Kisvarday, P. Somogyi, M. Cynader and A. Cowey (1992). Quantitative distribution of GABA-immunopositive and -immunonegative neurons and synapses in the monkey striate cortex (area 17). Cereb Cortex **2**: 295-309.
- Beaulieu, C. (1993). Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. Brain Res **609**: 284-92.
- Berthet, C., F. Guehenneux, V. Revol, C. Samarut, A. Lukaszewicz, C. Dehay, C. Dumontet, J. P. Magaud and J. P. Rouault (2002). Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects. Genes Cells **7**: 29-39.
- Bertrand, N., D. S. Castro and F. Guillemot (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. Nat Rev Neurosci **3**: 517-30.
- Bishop, K. M., G. Goudreau and D. D. O'Leary (2000). Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6. Science **288**: 344-9.

- Bradbury, A., R. Possenti, E. M. Shooter and F. Tirone (1991). Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization. Proc Natl Acad Sci U S A **88**: 3353-7.
- Bradbury, A., Possenti, R., Shooter, E. M., & Tirone, F. (1991). Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization. Proc. Natl. Acad. Sci., USA **88**: 3353-3357.
- Butler, A. B. and W. Hodos (1996). Comparative vertebrate neuroanatomy. New York, Wiley Liss.
- Cai, L., N. L. Hayes and R. S. Nowakowski (1997). Synchrony of clonal cell proliferation and contiguity of clonally related cells: production of mosaicism in the ventricular zone of developing mouse neocortex. J Neurosci **17**: 2088-100.
- Calegari, F., W. Haubensak, D. Yang, W. B. Huttner and F. Buchholz (2002). Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 14236-40.
- Calegari, F., D. Freund and W. B. Huttner (in Vorbereitung). The role of cell cycle length in mammalian neurogenesis.
- Carter, T. A., J. A. Del Rio, J. A. Greenhall, M. L. Latronica, D. J. Lockhart and C. Barlow (2001). Chipping away at complex behavior: transcriptome/phenotype correlations in the mouse brain. Physiol Behav **73**: 849-57.
- Casarosa, S., C. Fode and F. Guillemot (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. Development **126**: 525-34.
- Caviness, V. S., Jr., T. Takahashi and R. S. Nowakowski (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. Trends Neurosci **18**: 379-83.
- Caviness, V. S., Jr., T. Takahashi and R. S. Nowakowski (1999). The G1 restriction point as critical regulator of neocortical neuronogenesis. Neurochem Res **24**: 497-506.
- Changizi, M. A. (2001). Principles underlying mammalian neocortical scaling. Biol Cybern **84**: 207-15.
- Chen, P. J., A. Singal, J. Kimble and R. E. Ellis (2000). A novel member of the tob family of proteins controls sexual fate in *Caenorhabditis elegans* germ cells. Dev Biol **217**: 77-90.
- Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell **82**: 631-41.

- Chenn, A. and C. A. Walsh (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. Science **297**: 365-9.
- Cid-Arregui, A. and W. Haubensak (2000). Gene Transfer into Brain Slices from Mouse Embryos Using Herpes Simplex Amplicons. Viral Vectors in Gene Therapy and Basic Research. A. Cid-Arregui and A. Garcia. Natick, Eaton Publishing.
- Clancy, B., R. B. Darlington and B. L. Finlay (2001). Translating developmental time across mammalian species. Neuroscience **105**: 7-17.
- Cockroft, D. L. (1990). Dissection and culture of postimplantation embryos. Postimplantation mammalian embryos. A. J. Copp and D. L. Cockroft. Oxford, New York, Tokyo, IRL - Press: 15-40.
- Corish, P. and C. Tyler-Smith (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. Protein Eng **12**: 1035-40.
- de la Pompa, J. L., A. Wakeham, K. M. Correia, E. Samper, S. Brown, R. J. Aguilera, T. Nakano, T. Honjo, T. W. Mak, J. Rossant and R. A. Conlon (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. Development **124**: 1139-48.
- de Winter, W. and C. E. Oxnard (2001). Evolutionary radiations and convergences in the structural organization of mammalian brains. Nature **409**: 710-4.
- Delalle, I., T. Takahashi, R. S. Nowakowski, L. H. Tsai and V. S. Caviness, Jr. (1999). Cyclin E-p27 opposition and regulation of the G1 phase of the cell cycle in the murine neocortical PVE: a quantitative analysis of mRNA in situ hybridization. Cereb Cortex **9**: 824-32.
- Denk, W. and K. Svoboda (1997). Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. Neuron **18**: 351-7.
- Dicicco-Bloom, E., N. Lu, J. E. Pinter and J. Zhang (1998). The PACAP ligand/receptor system regulates cerebral cortical neurogenesis. Annals Of The New York Academy Of Sciences **865**: 274-89.
- Durand, B., M. L. Fero, J. M. Roberts and M. C. Raff (1998). p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell- intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. Curr Biol **8**: 431-40.
- Duriez, C., N. Falette, C. Audouy, C. Moyret-Lalle, K. Bensaad, S. Courtois, Q. Wang, T. Soussi and A. Puisieux (2002). The human BTG2/TIS21/PC3 gene: genomic structure,

- transcriptional regulation and evaluation as a candidate tumor suppressor gene. Gene **282**: 207-14.
- Enard, W., P. Khaitovich, J. Klose, S. Zollner, F. Heissig, P. Giavalisco, K. Nieselt-Struwe, E. Muchmore, A. Varki, R. Ravid, G. M. Doxiadis, R. E. Bontrop and S. Paabo (2002). Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. Science **296**: 340-3.
- Estivill-Torrus, G., H. Pearson, V. van Heyningen, D. J. Price and P. Rashbass (2002). Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. Development **129**: 455-66.
- Falk, D., J. C. Redmond, Jr., J. Guyer, C. Conroy, W. Recheis, G. W. Weber and H. Seidler (2000). Early hominid brain evolution: a new look at old endocasts. J Hum Evol **38**: 695-717.
- Farah, M. H., J. M. Olson, H. B. Sucic, R. I. Hume, S. J. Tapscott and D. L. Turner (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. Development **127**: 693-702.
- Faulkner, N. E., D. L. Dujardin, C. Y. Tai, K. T. Vaughan, C. B. O'Connell, Y. Wang and R. B. Vallee (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. Nat Cell Biol **2**: 784-91.
- Feng, Y., E. C. Olson, P. T. Stukenberg, L. A. Flanagan, M. W. Kirschner and C. A. Walsh (2000). LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. Neuron **28**: 665-79.
- Ficazzola, M. A., M. Fraiman, J. Gitlin, K. Woo, J. Melamed, M. A. Rubin and P. D. Walden (2001). Antiproliferative B cell translocation gene 2 protein is down-regulated post-transcriptionally as an early event in prostate carcinogenesis. Carcinogenesis **22**: 1271-9.
- Finlay, B. L. and R. B. Darlington (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. Science **268**: 1578-1584.
- Finlay, B. L., M. N. Hersman and R. B. Darlington (1998). Patterns of vertebrate neurogenesis and the paths of vertebrate evolution. Brain Behav Evol **52**: 232-42.
- Finlay, B. L., R. B. Darlington and N. Nicastro (2001). Developmental structure in brain evolution. Behav Brain Sci **24**: 263-78; discussion 278-308.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature **391**: 806-11.

- Fisher, A. and M. Caudy (1998). The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. Bioessays **20**: 298-306.
- Fletcher, B. S., R. W. Lim, B. C. Varnum, D. A. Kujubu, R. A. Koski and H. R. Herschman (1991). Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters. J Biol Chem **266**: 14511-8.
- Fode, C., Q. Ma, S. Casarosa, S. L. Ang, D. J. Anderson and F. Guillemot (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. Genes Dev **14**: 67-80.
- Fotaki, V., M. Dierssen, S. Alcantara, S. Martinez, E. Marti, C. Casas, J. Visa, E. Soriano, X. Estivill and M. L. Arbones (2002). Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. Mol Cell Biol **22**: 6636-47.
- Frankhauser, G., J. A. Vernon, W. H. Frank and W. V. Slack (1955). Effect of size and number of brain cells on learning in larvae of the salamander, *Triturus viridescens*. Science **122**: 692-3.
- Fukuchi-Shimogori, T. and E. A. Grove (2001). Patterning of the Neocortex by the Secreted Signaling Molecule FGF8. Science **20**: 20.
- Gardette, R., M. Courtois and J. C. Bisconte (1982). Prenatal development of mouse central nervous structures: time of neuron origin and gradients of neuronal production. A radioautographic study. Journal Fur Hirnforschung **23**: 415-31.
- Geschwind, D. H., J. Ou, M. C. Easterday, J. D. Dougherty, R. L. Jackson, Z. Chen, H. Antoine, A. Terskikh, I. L. Weissman, S. F. Nelson and H. I. Kornblum (2001). A genetic analysis of neural progenitor differentiation. Neuron **29**: 325-39.
- Ghosh, A. and M. E. Greenberg (1995). Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis [see comments]. Neuron **15**: 89-103.
- Giraldo, P. and L. Montoliu (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. Transgenic Res **10**: 83-103.
- Groszer, M., R. Erickson, D. D. Scripture-Adams, R. Lesche, A. Trumpp, J. A. Zack, H. I. Kornblum, X. Liu and H. Wu (2001). Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. Science **294**: 2186-9.
- Grupe, A., S. Germer, J. Usuka, D. Aud, J. K. Belknap, R. F. Klein, M. K. Ahluwalia, R. Higuchi and G. Peltz (2001). In silico mapping of complex disease-related traits in mice. Science **292**: 1915-8.

- Guardavaccaro, D., G. Corrente, F. Covone, L. Micheli, I. D'Agnano, G. Starace, M. Caruso and F. Tirone (2000). Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. Mol Cell Biol **20**: 1797-815.
- Hammerle, B., E. Vera-Samper, S. Speicher, R. Arencibia, S. Martinez and F. J. Tejedor (2002). Mnb/Dyrk1A Is Transiently Expressed and Asymmetrically Segregated in Neural Progenitor Cells at the Transition to Neurogenic Divisions. Dev Biol **246**: 259-73.
- Hardcastle, Z. and N. Papalopulu (2000). Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27(XIC1) and imparting a neural fate. Development **127**: 1303-14.
- Hatta, K. and M. Takeichi (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. Nature **320**: 447-9.
- Hatta, K., S. Takagi, H. Fujisawa and M. Takeichi (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. Dev Biol **120**: 215-27.
- Haydar, T. F., L. L. Bambrick, B. K. Krueger and P. Rakic (1999). Organotypic slice cultures for analysis of proliferation, cell death, and migration in the embryonic neocortex. Brain Res Brain Res Protoc **4**: 425-37.
- Haydar, T. F., R. S. Nowakowski, P. J. Yarowsky and B. K. Krueger (2000). Role of founder cell deficit and delayed neuronogenesis in microencephaly of the trisomy 16 mouse. J Neurosci **20**: 4156-64.
- Heins, N., F. Cremisi, P. Malatesta, R. M. Gangemi, G. Corte, J. Price, G. Goudreau, P. Gruss and M. Gotz (2001). Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. Mol Cell Neurosci **18**: 485-502.
- Hentges, K., K. Thompson and A. Peterson (1999). The flat-top gene is required for the expansion and regionalization of the telencephalic primordium. Development **126**: 1601-9.
- Hentges, K. E., B. Sirry, A. C. Gingeras, D. Sarbassov, N. Sonenberg, D. Sabatini and A. S. Peterson (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A **13**: 13.
- Hirotsune, S., M. W. Fleck, M. J. Gambello, G. J. Bix, A. Chen, G. D. Clark, D. H. Ledbetter, C. J. McBain and A. Wynshaw-Boris (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. Nat Genet **19**: 333-9.

- Hofman, M. A. (1982). Encephalization in mammals in relation to the size of the cerebral cortex. Brain Behav Evol **20**: 84-96.
- Hofman, M. A. (1985). Size and shape of the cerebral cortex in mammals. I. The cortical surface. Brain Behav Evol **27**: 28-40.
- Hofman, M. A. (1989). On the evolution and geometry of the brain in mammals. Prog. Neurobiol. **32**: 137-158.
- Huttner, W. B. and M. Brand (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. Curr. Opin. Neurobiol. **7** (1): 29-39.
- Huyton, T., P. A. Bates, X. Zhang, M. J. Sternberg and P. S. Freemont (2000). The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. Mutat Res **460**: 319-32.
- Iacopetti, P., G. Barsacchi, F. Tirone, L. Maffei and F. Cremisi (1994). Developmental expression of PC3 gene is correlated with neuronal cell birthday. Mechanisms Of Development **47**: 127-37.
- Iacopetti, P., M. Michelini, I. Stuckmann, B. Oback, E. Aaku-Saraste and W. B. Huttner (1999). Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **96**: 4639-44.
- Ishibashi, M., K. Moriyoshi, Y. Sasai, K. Shiota, S. Nakanishi and R. Kageyama (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. Embo J **13**: 1799-805.
- Ishibashi, M., S. L. Ang, K. Shiota, S. Nakanishi, R. Kageyama and F. Guillemot (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. Genes And Development **9**: 3136-48.
- Jackson, A. P., H. Eastwood, S. M. Bell, J. Adu, C. Toomes, I. M. Carr, E. Roberts, D. J. Hampshire, Y. J. Crow, A. J. Mighell, G. Karbani, H. Jafri, Y. Rashid, R. F. Mueller, A. F. Markham and C. G. Woods (2002). Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. Am J Hum Genet **71**: 136-42.
- Jacobson, M. (1991). Developmental neurobiology. New York und London, Plenum Press.
- Jerison, H. (1969). Brain evolution and dinosaur brains. Am. Nat. **103**: 575-588.
- Jerison, H. (1985). Animal intelligence as encephalization. Phil. Trans. R. Soc. Lond. **B 308**: 21-35.



- Jerison, H. J. (1973). Evolution of the brain and intelligence. New York, Academic Press.
- Jolly, A. (1966). Lemur social behavior and primate intelligence. Science **153**: 501-6.
- Josephson, R., T. Muller, J. Pickel, S. Okabe, K. Reynolds, P. A. Turner, A. Zimmer and R. D. McKay (1998). POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. Development **125**: 3087-100.
- Kahane, N. and C. Kalcheim (1998). Identification of early postmitotic cells in distinct embryonic sites and their possible roles in morphogenesis. Cell Tissue Res **294**: 297-307.
- Kahle, W. (1951). Studien über die Matrixphasen und die örtlichen Reifungsunterschiede im embryonalen menschlichen Gehirn. Deutsche Zeitschrift f. Nervenheilkunde **166**: 273-302.
- Kannan, K., N. Amariglio, G. Rechavi, J. Jakob-Hirsch, I. Kela, N. Kaminski, G. Getz, E. Domany and D. Givol (2001). DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. Oncogene **20**: 2225-34.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **94**: 10409-14.
- Kempermann, G. and F. H. Gage (1999). New nerve cells for the adult brain. Sci Am **280**: 48-53.
- Kempermann, G. and F. H. Gage (2002). Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. Eur J Neurosci **16**: 129-36.
- Kilpatrick, T. J., & Bartlett, P. F. (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. Neuron **10**: 255-265.
- King, M. C. and A. C. Wilson (1975). Evolution at two levels in humans and chimpanzees. Science **188**: 107-16.
- Klahre, U., P. Crete, S. A. Leuenberger, V. A. Iglesias and F. Meins, Jr. (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 11981-6.
- Koch, J. (2000). Dissertation. Universität Heidelberg.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (1995). Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages. Neuron **15**: 311-21.

- Kornack, D. R. and P. Rakic (1998). Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **95**: 1242-6.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **96**: 5768-73.
- Kornack, D. R. (2000). Neurogenesis and the evolution of cortical diversity: mode, tempo, and partitioning during development and persistence in adulthood. Brain Behav Evol **55**: 336-44.
- Kosodo, Y., K. Roper, W. Haubensak, D. Corbeil and W. B. Huttner (2002). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neuron-generating divisions of mammalian neuroepithelial cells. American Society for Cell Biology Abstract.
- Landrieu, P. and A. Goffinet (1979). Mitotic spindle fiber orientation in relation to cell migration in the neo-cortex of normal and reeler mouse. Neurosci Lett **13**: 69-72.
- Langmann, J., R. Guerrant and B. Freeman (1966). Behaviour of neuroepithelial cells. J. Comp. Neurol. **127**: 399-412.
- Lardelli, M., R. Williams, T. Mitsiadis and U. Lendahl (1996). Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. Mech Dev **59**: 177-90.
- Lee, J. E., S. M. Hollenber, L. Snider, D. L. Turner, N. Lipnick and H. Weintraub (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. Science **268**: 836-844.
- Lee, J. E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. Current Opinion In Neurobiology **7**: 13-20.
- Lendahl, U., L. B. Zimmerman and R. D. McKay (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell **60**: 585-95.
- Letinic, K., R. Zoncu and P. Rakic (2002). Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. Nature **417**: 645-9.
- Levine, E. M., J. Close, M. Fero, A. Ostrovsky and T. A. Reh (2000). p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. Dev Biol **219**: 299-314.

- Levison, S. W. and J. E. Goldman (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. Neuron **10**: 201-12.
- Lim, I. K., M. S. Lee, S. H. Lee, N. K. Kim, I. Jou, J. S. Seo and S. C. Park (1995). Differential expression of TIS21 and TIS1 genes in the various organs of Balb/c mice, thymic carcinoma tissues and human cancer cell lines. J Cancer Res Clin Oncol **121**: 279-84.
- Lim, I. K., M. S. Lee, M. S. Ryu, T. J. Park, H. Fujiki, H. Eguchi and W. K. Paik (1998). Induction of growth inhibition of 293 cells by downregulation of the cyclin E and cyclin-dependent kinase 4 proteins due to overexpression of TIS21. Mol Carcinog **23**: 25-35.
- Lin, W. J., J. D. Gary, M. C. Yang, S. Clarke and H. R. Herschman (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. J Biol Chem **271**: 15034-44.
- Lin, W. J., Y. F. Chang, W. L. Wang and C. Y. Huang (2001). Mitogen-stimulated TIS21 protein interacts with a protein-kinase-Calpha- binding protein rPICK1. Biochem J **354**: 635-43.
- Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson and A. Efstratiadis (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). Cell **75**: 59-72.
- Loots, G. G., I. Ovcharenko, L. Pachter, I. Dubchak and E. M. Rubin (2002). rVista for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. Genome Res **12**: 832-9.
- Luskin, M. B., A. L. Pearlman and J. R. Sanes (1988). Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied *in-vivo* and *in-vitro* with a recombinant retrovirus. Neuron **1**: 635-647.
- Malatesta, P., M. Gotz, G. Barsacchi, J. Price, R. Zoncu and F. Cremisi (2000). PC3 overexpression affects the pattern of cell division of rat cortical precursors. Mech Dev **90**: 17-28.
- Manabe, N., S. Hirai, F. Imai, H. Nakanishi, Y. Takai and S. Ohno (2002). Association of ASIP/mPAR-3 with adherens junctions of mouse neuroepithelial cells. Dev Dyn **225**: 61-9.
- Marino, L. (1998). A comparison of encephalization between odontocete cetaceans and anthropoid primates. Brain Behav Evol **51**: 230-8.
- Marquardt, T. and S. L. Pfaff (2001). Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. Cell **106**: 651-4.

- Matsuda, S., J. Kawamura-Tsuzuku, M. Ohsugi, M. Yoshida, M. Emi, Y. Nakamura, M. Onda, Y. Yoshida, A. Nishiyama and T. Yamamoto (1996). Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity. Oncogene **12**: 705-13.
- McCaffrey, A. P., L. Meuse, T. T. Pham, D. S. Conklin, G. J. Hannon and M. A. Kay (2002). RNA interference in adult mice. Nature **418**: 38-9.
- McConnell, J. A. and J. W. Sechrist (1976). A comparative autoradiographic study of early neuron origin in the mouse and chick. Neurosci. Abstr. **2**: 202-.
- McConnell, J. A. and J. W. Sechrist (1980). Identification of early neurons in the brainstem and spinal cord: I. An autoradiographic study in the chick. Journal Of Comparative Neurology **192**: 769-83.
- McConnell, J. A. (1981). Identification of early neurons in the brainstem and spinal cord. II. An autoradiographic study in the mouse. J Comp Neurol **200**: 273-88.
- McHenry, H. M. (1994). Tempo and mode in human evolution. Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 6780-6.
- Megason, S. G. and A. P. McMahon (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. Development **129**: 2087-98.
- Mesner, P. W., C. L. Epting, J. L. Hegarty and S. H. Green (1995). A timetable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells. J Neurosci **15**: 7357-66.
- Michelini, M. (2000). Dissertation.
- Mione, M. C., J. F. Cavanagh, B. Harris and J. G. Parnavelas (1997). Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. J Neurosci **17**: 2018-29.
- Mitsubishi, T., Y. Aoki, Y. Z. Eksioğlu, T. Takahashi, P. G. Bhide, S. A. Reeves and V. S. Caviness, Jr. (2001). Overexpression of p27Kip1 lengthens the G1 phase in a mouse model that targets inducible gene expression to central nervous system progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 6435-6440.
- Miyama, S., T. Takahashi, R. S. Nowakowski and V. S. Caviness, Jr. (1997). A gradient in the duration of the G1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium. Cereb Cortex **7**: 678-89.

- Miyata, T., A. Kawaguchi, H. Okano and M. Ogawa (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron **31**: 727-41.
- Mochida, G. H. and C. A. Walsh (2001). Molecular genetics of human microcephaly. Curr Opin Neurol **14**: 151-6.
- Montagnoli, A., D. Guardavaccaro, G. Starace and F. Tirone (1996). Overexpression of the nerve growth factor-inducible PC3 immediate early gene is associated with growth inhibition. Cell Growth Diff. **7**: 1327-1336.
- Monuki, E. S. and C. A. Walsh (2001). Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. Nat Neurosci **4 Suppl**: 1199-206.
- Moynihan, L., A. P. Jackson, E. Roberts, G. Karbani, I. Lewis, P. Corry, G. Turner, R. F. Mueller, N. J. Lench and C. G. Woods (2000). A third novel locus for primary autosomal recessive microcephaly maps to chromosome 9q34. Am J Hum Genet **66**: 724-7.
- Murphy, R. C. and A. Messer (2001). Gene transfer methods for CNS organotypic cultures: a comparison of three nonviral methods. Mol Ther **3**: 113-21.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly and J. C. Roder (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 8424-8.
- Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii and D. Y. Loh (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. Cell **85**: 707-20.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman and A. R. Kriegstein (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature **409**: 714-20.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, W. S. Wong, B. K. Clinton and A. R. Kriegstein (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci **22**: 3161-73.
- Nornes, H. O. and M. Carry (1978). Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis. Brain Research **159**: 1-6.
- Nowakowski, R. S., S. B. Lewin and M. W. Miller (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. J Neurocytol **18**: 311-8.

- O'Kusky, J. R., P. Ye and A. J. D'Ercole (2000). Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. J Neurosci **20**: 8435-42.
- O'Leary, D. D. and Y. Nakagawa (2002). Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. Curr Opin Neurobiol **12**: 14-25.
- Oback, B. (2000). Dissertation. Universität Heidelberg.
- Oback, B., A. Cid-Arregui and W. B. Huttner (2000). Gene Transfer into Cultured Postimplantation Mouse Embryos Using Herpes Simplex Amplicons. Viral Vectors: Basic Science & Gene Therapy. A. Cid-Arregui and A. Garcia. Natick, MA, Eaton Publishing.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. Curr Opin Cell Biol **13**: 641-8.
- Ohtsuka, T., M. Sakamoto, F. Guillemot and R. Kageyama (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. J Biol Chem **276**: 30467-74.
- Osumi, N. and T. Inoue (2001). Gene transfer into cultured mammalian embryos by electroporation. Methods **24**: 35-42.
- Pasquinelli, A. E. and G. Ruvkun (2002). Control and Developmental Timing by MicroRNAs and Their Targets. Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 28.
- Passingham, R. E. (1985). Rates of brain development in mammals including man. Brain Behav Evol **26**: 167-75.
- Paterson, J. A., A. Privat, E. A. Ling and C. P. Leblond (1973). Investigation of glial cells in semithin sections. 3. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after 3 H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats. J Comp Neurol **149**: 83-102.
- Pattison, L., Y. J. Crow, V. J. Deeble, A. P. Jackson, H. Jafri, Y. Rashid, E. Roberts and C. G. Woods (2000). A fifth locus for primary autosomal recessive microcephaly maps to chromosome 1q31. Am J Hum Genet **67**: 1578-80.
- Pennacchio, L. A. and E. M. Rubin (2001). Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. Nat Rev Genet **2**: 100-9.
- Petersen, P. H., K. Zou, J. K. Hwang, Y. N. Jan and W. Zhong (2002). Progenitor cell maintenance requires numb and numblake during mouse neurogenesis. Nature **419**: 929-34.

- Petronczki, M. and J. A. Knoblich (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. Nat Cell Biol **3**: 43-9.
- Prevot, D., A. P. Morel, T. Voeltzel, M. C. Rostan, R. Rimokh, J. P. Magaud and L. Corbo (2001). Relationships of the Antiproliferative Proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the Human Homolog of a Component of the Yeast CCR4 Transcriptional Complex. INVOLVEMENT IN ESTROGEN RECEPTOR alpha SIGNALING PATHWAY. J Biol Chem **276**: 9640-8.
- Privat, A. and C. P. Leblond (1972). The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. J Comp Neurol **146**: 277-302.
- Qian, X., S. K. Goderie, Q. Shen, J. H. Stern and S. Temple (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. Development **125**: 3143-52.
- Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis and S. Temple (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. Neuron **28**: 69-80.
- Raballo, R., J. Rhee, R. Lyn-Cook, J. F. Leckman, M. L. Schwartz and F. M. Vaccarino (2000). Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. J Neurosci **20**: 5012-23.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J Comp Neurol **145**: 61-83.
- Rakic, P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. Science **241**: 170-176.
- Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. Trends Neurosci **18**: 383-8.
- Raouf, A. and A. Seth (2002). Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. Bone **30**: 463-71.
- Reader, S. M. and K. N. Laland (2002). Social intelligence, innovation, and enhanced brain size in primates. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 4436-41.
- Rehkamper, G. and K. Zilles (1991). Parallel evolution in mammalian and avian brains: comparative cytoarchitectonic and cytochemical analysis. Cell Tissue Res **263**: 3-28.
- Reid, C. B., I. Liang and C. Walsh (1995). Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. Neuron **15**: 299-310.

- Reiner, O., R. Carrozzo, Y. Shen, M. Wehnert, F. Faustinella, W. B. Dobyns, C. T. Caskey and D. H. Ledbetter (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. Nature **364**: 717-21.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science **255**: 1707-10.
- Reznikov, K., S. E. Acklin and D. van der Kooy (1997). Clonal heterogeneity in the early embryonic rodent cortical germinal zone and the separation of subventricular from ventricular zone lineages. Dev Dyn **210**: 328-43.
- Roberts, E., A. P. Jackson, A. C. Carradice, V. J. Deeble, J. Mannan, Y. Rashid, H. Jafri, D. P. McHale, A. F. Markham, N. J. Lench and C. G. Woods (1999). The second locus for autosomal recessive primary microcephaly (MCPH2) maps to chromosome 19q13.1-13.2. Eur J Hum Genet **7**: 815-20.
- Röper, K. (2000). Dissertation.
- Rouault, J. P., R. Rimokh, C. Tessa, G. Paranhos, M. Ffrench, L. Duret, M. Garoccio, D. Germain, J. Samarut and J. P. Magaud (1992). BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. Embo J **11**: 1663-70.
- Rouault, J. P., N. Falette, F. Guehenneux, C. Guillot, R. Rimokh, Q. Wang, C. Berthet, C. Moyret-Lalle, P. Savatier, B. Pain, P. Shaw, R. Berger, J. Samarut, J. P. Magaud, M. Ozturk, C. Samarut and A. Puisieux (1996). Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. Nat Genet **14**: 482-6.
- Rouault, J. P., D. Prevot, C. Berthet, A. M. Birot, M. Billaud, J. P. Magaud and L. Corbo (1998). Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. J Biol Chem **273**: 22563-9.
- Roy, N. S., A. Benraiss, S. Wang, R. A. Fraser, R. Goodman, W. T. Couldwell, M. Nedergaard, A. Kawaguchi, H. Okano and S. A. Goldman (2000). Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. J Neurosci Res **59**: 321-31.
- Rubenstein, J. L., S. Martinez, K. Shimamura and L. Puelles (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. Science **266**: 578-80.
- Sauer, F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. J. Comp. Neurol. **62**: 377-405.



- Sawamoto, K., A. Yamamoto, A. Kawaguchi, M. Yamaguchi, K. Mori, S. A. Goldman and H. Okano (2001). Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters. J Neurosci Res **65**: 220-7.
- Schober, M., M. Schaefer and J. A. Knoblich (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. Nature **402**: 548-51.
- Seress, L. (1992). Morphological variability and developmental aspects of monkey and human granule cells: differences between the rodent and primate dentate gyrus. Epilepsy Res Suppl **7**: 3-28.
- Shen, Q., W. Zhong, Y. N. Jan and S. Temple (2002). Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. Development **129**: 4843-53.
- Smart, I. H. (1972b). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse diencephalon, as revealed by recording the number, location, and plane of cleavage of mitotic figures. J Anat **113**: 109-29.
- Smart, I. H. (1973). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. J Anat **116**: 67-91.
- Smart, I. H. (1976). A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain. J Anat **121**: 71-84.
- Smart, I. H. and G. M. McSherry (1982). Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. J Anat **134**: 415-42.
- Smart, I. H. M. (1972a). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the spinal cord in the mouse. J Anat **111**: 365-80.
- Smith, D. J. and E. M. Rubin (1997). Functional screening and complex traits: human 21q22.2 sequences affecting learning in mice. Hum Mol Genet **6**: 1729-33.
- Smith, D. J., M. E. Stevens, S. P. Sudanagunta, R. T. Bronson, M. Makhinson, A. M. Watabe, T. J. O'Dell, J. Fung, H. U. Weier, J. F. Cheng and E. M. Rubin (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. Nat Genet **16**: 28-36.

- Solecki, D. J., X. L. Liu, T. Tomoda, Y. Fang and M. E. Hatten (2001). Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. Neuron **31**: 557-68.
- Song, W. J., L. R. Sternberg, C. Kasten-Sportès, M. L. Keuren, S. H. Chung, A. C. Slack, D. E. Miller, T. W. Glover, P. W. Chiang, L. Lou and D. M. Kurnit (1996). Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome critical region. Genomics **38**: 331-9.
- Stewart, C. C. and S. J. Stewart (2001). Cell preparation for the identification of leukocytes. Methods Cell Biol **63**: 217-51.
- Strom, R. C. and R. W. Williams (1998). Cell production and cell death in the generation of variation in neuron number. J Neurosci **18**: 9948-53.
- Stuckmann, I. (1998). Dissertation.
- Svoboda, P., P. Stein, H. Hayashi and R. M. Schultz (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. Development **127**: 4147-56.
- Takahashi, M., K. Sato, T. Nomura and N. Osumi (2002). Manipulating gene expressions by electroporation in the developing brain of mammalian embryos. Differentiation **70**: 155-62.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski and V. S. Caviness, Jr. (1993). Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. J Neurosci **13**: 820-33.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski and V. S. Caviness, Jr. (1994). Mode of cell proliferation in the developing mouse neocortex. Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 375-9.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski and V. S. Caviness, Jr. (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. J Neurosci **15**: 6046-57.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski and V. S. Caviness, Jr. (1996). The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. J Neurosci **16**: 6183-96.
- Tarabykin, V., A. Stoykova, N. Usman and P. Gruss (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. Development **128**: 1983-93.

- Tejedor, F., X. R. Zhu, E. Kaltenbach, A. Ackermann, A. Baumann, I. Canal, M. Heisenberg, K. F. Fischbach and O. Pongs (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. Neuron **14**: 287-301.
- Terskikh, A. V., M. C. Easterday, L. Li, L. Hood, H. I. Kornblum, D. H. Geschwind and I. L. Weissman (2001). From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs. Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 7934-9.
- Threadgill, D. W., A. A. Dlugosz, L. A. Hansen, T. Tennenbaum, U. Lichti, D. Yee, C. LaMantia, T. Mourton, K. Herrup, R. C. Harris and et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. Science **269**: 230-4.
- Tower, D. B. (1954). Structural and functional organization of mammalian cerebral cortex: The correlation of neuron density with brain size. J. comp. Neurol. **101**: 19-51.
- Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis and R. Parker (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell **104**: 377-86.
- Tuckett, F. and G. M. Morriss-Kay (1985). The kinetic behaviour of the cranial neural epithelium during neurulation in the rat. J Embryol Exp Morphol **85**: 111-9.
- Vaccarino, F. M., M. L. Schwartz, R. Raballo, J. Nilsen, J. Rhee, M. Zhou, T. Doetschman, J. D. Coffin, J. J. Wyland and Y. T. Hung (1999). Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. Nat Neurosci **2**: 246-53.
- Vescovi, A. L., B. A. Reynolds, D. D. Fraser and S. Weiss (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. Neuron **11**: 951-66.
- von Bronin, G. (1941). Side lights on cerebral evolution: Brain size of lower vertebrates and degree of cortical folding. J Gen Psychol **25**: 273-282.
- Vrba, E. S. (1998). Multiphasic growth models and the evolution of prolonged growth exemplified by human brain evolution. J Theor Biol **190**: 227-39.
- Wakamatsu, Y., T. M. Maynard, S. U. Jones and J. A. Weston (1999). NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. Neuron **23**: 71-81.
- Wang, S., A. J. Dibenedetto and R. N. Pittman (1997). Genes induced in programmed cell death of neuronal PC12 cells and developing sympathetic neurons in vivo. Dev Biol **188**: 322-36.

- Weigmann, A., D. Corbeil, A. Hellwig and W. B. Huttner (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 12425-30.
- Wianny, F. and M. Zernicka-Goetz (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. Nat Cell Biol **2**: 70-5.
- Wichterle, H., D. H. Turnbull, S. Nery, G. Fishell and A. Alvarez-Buylla (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. Development **128**: 3759-71.
- Williams, R. W. (2000). Mapping genes that modulate mouse brain development: a quantitative genetic approach. Results Probl Cell Differ **30**: 21-49.
- Wilson, A. C. (1985). The molecular basis of evolution. Sci Am **253**: 164-73.
- Wilson, P. A. and A. Hemmati-Brivanlou (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. Nature **376**: 331-3.
- Winston, W. M., C. Molodowitch and C. P. Hunter (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. Science **295**: 2456-9.
- Wodarz, A., A. Ramrath, U. Kuchinke and E. Knust (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. Nature **402**: 544-7.
- Xuan, S., C. A. Baptista, G. Balas, W. Tao, V. C. Soares and E. Lai (1995). Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. Neuron **14**: 1141-52.
- Yamaguchi, M., H. Saito, M. Suzuki and K. Mori (2000). Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. Neuroreport **11**: 1991-6.
- Yang, S., S. Tutton, E. Pierce and K. Yoon (2001). Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Mol Cell Biol **21**: 7807-16.
- Yoshida, Y., S. Tanaka, H. Umemori, O. Minowa, M. Usui, N. Ikematsu, E. Hosoda, T. Imamura, J. Kuno, T. Yamashita, K. Miyazono, M. Noda, T. Noda and T. Yamamoto (2000). Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. Cell **103**: 1085-97.
- Zernicka-Goetz, M. (2000). Jumping the gun on mouse gene expression. Nature **405**: 733.
- Zhong, W., J. N. Feder, M. M. Jiang, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1996). Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. Neuron **17**: 43-53.

Zhong, W., M. M. Jiang, M. D. Schonemann, J. J. Meneses, R. A. Pedersen, L. Y. Jan and Y. N. Jan (2000). Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 6844-9.

6 ANHANG

6.1 Alignment der BTG/Tob-Proteinsequenzen

MmTob1	-----MQLEIQVALNFIISYLYNK--LP	X1BTG1	QAMFKLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEASVPGV-----
HsTob1	-----MQLEIQVALNFIISYLYNK--LP	DrBTG2	QQLFSLLPRELTMMVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEAEPP-----
DrTob1	-----MQLEIQVALNFIISYLYNK--LP	DrBTG1	ERLFSLLPSELTMWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYESTPL-----
DrTob2	-----MQLEIQVALNFIISYLYNK--LP	GgBTG2	ERLQQLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYESPQPG-----
HsTob2	-----MQLEIKVALNFIISYLYNK--LP	RnBTG2	PQLHQLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEAPV-----
BlTob	-----MQVEIQVALNFIISYLYNK--LP	MmBTG2	PQLHRLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEAPV-----
DmTob	-----MHIEIQVALNFIISYLYNK--LP	HsBTG2	PQLHQLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEAPL-----
HsBTG1	-----MHP-FYTR--AATMIGEIAAAVFSISKFLRTRKGLTS	X1BTG2	QHLLSLLPKELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEASAP-----
BtBTG1	-----MHP-FYSR--AATMIGEIAAAVFSISKFLRTRKGLTS	HsPC3B	SHLG--LPKEMTIWVDPYEVCCRYGKKNHPTIASFKGRW-----EWEW----
RnBTG1	-----MHP-FYTR--AATMIGEIAAAVFSISKFLRTRKGLTS	MmPC3B	FHLG--LPKEMTIWVDPYEVCCRYGKKNHPTIASFKGRW-----ENWE----
MmBTG1	-----MHP-FYTR--AATMIGEIAAAVFSISKFLRTRKGLTS	X19.15	NELG--LPKEMTIWVDPYEVCCRYGKKNHPTIASFKGRW-----DGYN----
GgBTG1	-----MHPALYT--RASMIREIAAAVFSISKFLRTRKGLMN	X19.10	NDLG--LPKEMTIWVDPYEVCCRYGKKNHPTIASFKGRW-----DGYN----
X1BTG1	-----MHT-HYP--WANMKPEIAAAVFSITKFLRTRKGLMN	RnBTG3	SDLG--LPKELTLWVDPYEVCCRYGKKNHPTIASFKGRW-----ENKDE----
DrBTG2	-----MTHGTG--AEMTPEVSAASVFCVLLRGRGRSL	MmBTG3	SDLG--LPKELTLWVDPYEVCCRYGKKNHPTIASFKGRW-----ENKDE----
DrBTG1	-----MKTEVSTAAMFVARLLRGTGLLS	HsBTG3	SDLG--LPKELTLWVDPYEVCCRYGKKNHPTIASFKGRW-----ENKDE----
GgBTG2	-----MRTEISTAAVFTVRLRAAGGIG	CeTob	SDVLRLLPTNMIIFANPGHVFVRISENGIETIWIIGDVCNDENYQS-----
RnBTG2	-----MSHGKR--TDMLEPIAAAVGFLTSLLRTRGCVS		: * * : : : * * * : : :
MmBTG2	-----MSHGKR--TDMLEPIAAAVGFLTSLLRTRGCVS		Box B
HsBTG2	-----MSHGKG--TDMLEPIAAAVGFLTSLLRTRGCVS	MmTob1	--LDKEIKNS-----FNPEAQVFMPISDPA-----SSVSSSP
X1BTG2	-----MANGAAPES--QODTLPEIVAANVPLSLLQTR--LN	HsTob1	--LDKEIKNS-----FNPEAQVFMPISDPA-----SSVSSSP
HsPC3B	-----MRDEIATVFFVTRLVKHKDKLS	DrTob1	--LDKEIRNS-----FNPEAQVFMPISEFVG-----VSSSESP
MmPC3B	-----MRDEIATAVFFVTRLVKHKDKLS	DrTob2	--LDKEIKNS-----FNPEAQVFMPISEFVG-----MSPTSSP
X19.15	-----MKEIEAATVFFVTRLVKHKDKLS	HsTob2	--LDKEIKSS-----FNPDQVFPVPIGSQD-----SSLNSP
X19.10	-----MKEIEAATVFFVTRLVKHKDKLS	BlTob	--DKEVISSS--G--FNPDQVFPVPIENTLG-----TLSPKSP
RnBTG3	-----MKNEIAAVVFFVTRLVKHKDKLS	DmTob	--ADREVTKM-----FNPEAQCFRPIADAVNTMMNMSLSPKGGHQSGLSSPHSAASSP
MmBTG3	-----MKNEIAAVVFFVTRLVKHKDKLS	HsBTG1	-----GS-T-Q--NSTNV--QMVDSR-----ISCKEEL
HsBTG3	-----MKNEIAAVVFFVTRLVKHKDKLS	BtBTG1	-----GS-T-Q--NSTNV--QMVDSR-----ISCKEEL
CeTob	-----MYTEVRELVNFCRYLFGH--IP	RnBTG1	-----GS-S-Q--NSTNV--QMVDSR-----ISCKEEL
	* : * :	MmBTG1	-----GS-T-Q--NSTNV--QMVDSR-----ISCKEEL
		GgBTG1	-----GS--Q--NNTNM--QMVDSR-----ISCKEEL
		X1BTG1	-----GV-G--P--NSVG--SLVESR-----ISCKDEL
		DrBTG2	-----T--TSPA--P--SAYD--QM-----ANCKNTY
		DrBTG1	-----A--K--ASKA-----LESR-----SSCKEAW
		GgBTG2	-----A--K--ASKA-----LESR-----SSCKEAW
		RnBTG2	-----A-----TSYG-----L-----LTCNKQM
		MmBTG2	-----A-----ASYG-----L-----LTCNKQM
		HsBTG2	-----A-----ASCY-----L-----LTCNKQV
		X1BTG2	-----STRG-----H-----LNCKSEV
		HsPC3B	--LYQQVSYAV--SR--ASSDVSSGTSDE-----ESCSKEP
		MmPC3B	--LAHQVSCAV--NR--ATGDCSSGTSDE-----ESCSREA
		X19.15	--APKRISNAV--EK--ATSDYHSGTSDE-----EPTNKEP
		X19.10	--APKRISHAV--EK--ATSDYHSGTSDE-----ELTNKEP
		RnBTG3	--ISKKVSRAL--DK--VTSDYHSGTSDE-----EDTSKEV
		MmBTG3	--ISKKVSRAL--DK--VTSDYHSGTSDE-----EDTSKEV
		HsBTG3	--ISKRVTAL--DK--VTSDYHSGTSDE-----EETSKEM
		CeTob	--VPEYVVRTAAR--AEPCCNLGAAGKS-----VLVGGKP
		MmTob1	---SPP---FGHSAAVS-----PTF
		HsTob1	---SPP---FGHSAAVS-----PTF
		DrTob1	---SPPP---FGQASAVS-----PBF
		DrTob2	---SPP---S-----PTF
		HsTob2	---SPP---S-----PTF
		BlTob	---SPP---S-----PTI
		DmTob	TYKGSFNR--TISGSCSSVSGAGSGTSGSRSNSHAPGQTAPGVPVGNATANAAAAAF
		HsBTG1	LL--GR-----
		BtBTG1	LL--GR-----
		RnBTG1	LL--GR-----
		MmBTG1	LL--GR-----
		GgBTG1	LL--GR-----
		X1BTG1	LL--GR-----
		DrBTG2	MMS--GR-----
		DrBTG1	RKE--Q-----
		GgBTG2	RT--GR-----
		RnBTG2	ML--GR-----
		MmBTG2	ML--GR-----
		HsBTG2	LL--GR-----
		X1BTG2	LG-----
		HsPC3B	RVI--PK-----
		MmPC3B	QVI--PK-----
		X19.15	KTI--PK-----
		X19.10	KTI--PK-----

MmTob1	RRRVNIFGEELERLLKKYEGHWPEKPKYKSGFRCHVIG--EKVDPVIEQASKESGLDI
HsTob1	RRRVNIFGEELERLLKKYEGHWPEKPKYKSGFRCHVIG--EKVDPVIEQASKESGLDI
DrTob1	RRRVNIFGEELERLLKKYEGHWPEKPKYKSGFRCHVIG--EKVDPVIEQASKESGLDI
DrTob2	RRRVNIFGEELERLLKKYEGHWPEKPKYKSGFRCHVIG--EKVDPVIEQASKESGLDI
HsTob2	RRRADLFGELERLLKKYEGHWPEKPKYKSGFRCHVIG--EMVDPVVELAARSGGLAV
BlTob	RRRVNIFAEALAKLAKFEHGWPEKPKYKSGYRCIRIS--TTLDPVVLKACDASGLDI
DmTob	RRRVNIFGEELERLLKADKQDHWPEKPKYKSGFRCHVIG--DPIISVLEAARSGVPI
HsBTG1	ERQLQTFSSQSLQELLAEHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPLIGQAQRIGLSS
RnBTG1	ERQLQTFSSQSLQELLAEHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPLIGQAQRIGLSS
MmBTG1	ERQLQTFSSQSLQELLAEHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPLIGQAQRIGLSS
GgBTG1	ERQLQTFSSQSLQELLAEHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPLIGQAQRIGLSS
X1BTG1	DLDLQTFNQLQELLAADHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPLIGQAQRIGLSS
DrBTG2	DAQLQVFRDQLAQLSEHYQHWFPPDPKQKSGYRCIRIN--HEMDPLIGRAAQRIGLSS
DrBTG1	EEQLQVFRDQLAQLSEHYQHWFPPDPKQKSGYRCIRIN--HEMDPLIGRAAQRIGLSS
GgBTG2	EEQLQVFRDQLAQLSEHYQHWFPPDPKQKSGYRCIRIN--HEMDPLIGRAAQRIGLSS
RnBTG2	EQRLKVFSTRALQDALTDHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPIISKVASQIGLSQ
MmBTG2	EQRLKVFSTRALQDALTDHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPIISKVASQIGLSQ
HsBTG2	EQRLKVFSTRALQDALTDHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPIISKVASQIGLSQ
X1BTG2	EQRLKVFSTRALQDALTDHYKHHWPEKPKYKSGYRCIRIN--HKMDPIISKVASQIGLSQ
HsPC3B	KQKIEKFAAKLTILFETYSRHHWSDCPKQAFRCIRINNNQKDPILERACVESNVDF
MmPC3B	TQQTETFAKLTILFETYSRHHWSDCPKQAFRCIRINNNQKDPILERACVESNVDF
X19.15	KQKIEKFAAKLTILFETYSRHHWSDCPKQAFRCIRINNEQALDAVLEACTESNVDF
X19.10	KQKIEKFAAKLTILFETYSRHHWSDCPKQAFRCIRINNEQALDAVLEACTESNVDF
RnBTG3	KEAVERFAEKLTLQLEQYKHHWPEKPKYKSGYRCIRINVKFQVDPVLDKACEDSCILY
MmBTG3	KEAVERFAEKLTLQLEQYKHHWPEKPKYKSGYRCIRINVKFQVDPVLDKACEDSCILY
HsBTG3	KEAVERFAEKLTLQLEQYKHHWPEKPKYKSGYRCIRINVKFQVDPVLDKACEDSCILY
CeTob	RRPVGIFGAELGNLVSHFSSTWVHHPKNGEMKRIMINT--TSLCFASSAAEAGVPP
	* * * : * * * * : . . . :
	Box A

MmTob1	DDVRGNLPQDLSVWIDPFVSYQIGEGKPVKLVYVDDSSSETGC-----E-----
HsTob1	DDVRGNLPQDLSVWIDPFVSYQIGEGKPVKLVYVDDSSSETGC-----E-----
DrTob1	EDVRNLPQDLSVWIDPFVSYQIGEGKAVKLVYIDDSSENGS-----E-----
DrTob2	EDVRNLPQDLSVWIDPFVSYQIGEGKAVKLVYVDDSSNDNL-----E-----
HsTob2	EDVRANVPEELSVWIDPFVSYQIGEGKAVKLVYLDSEGCAP-----E-----
BlTob	TDVKGHLPEELSVWIDPFVSYQIGEGKAVKLVYLDSEGCAP-----E-----
DmTob	GDILENLPELNVWIDPFVSYQIGEGKAVKILYIENNEHEDS-----HS-----
HsBTG1	QELFRLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEASAPAG-----
BtBTG1	QELFRLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEASAPAG-----
RnBTG1	QELFRLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEASAPAG-----
MmBTG1	QELFRLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEASAPAG-----
GgBTG1	QELFRLLPSELTLWVDPYEVSYRIGEDGSGICVLYEASAPAG-----

RnBTG3 EVK--PSAV-----  
MmBTG3 DVK--PSSV-----  
HsBTG3 EVK--PSSV-----  
CeTob LLT---N-----  
  
MmTob1 MP-RSTQPLFTTTATFAATKFGSTKMKNSGRSSKVRTSPINLGLTVNHNLLKQKAISS  
HsTob1 MP-RSTQPLFTTTATFAATKFGSTKMKNSGRSNKVRTSPINLGL--NVNDDLKQKAISS  
DrTob1 MPQRSAQPLFTTTASFAA-----  
DrTob2 -----  
HsTob2 IP-RSAQPIFTTTASFAATKFGSTKMKKGGGAASGGVASSGAGGQPPQQRMARSPTN  
BlTob FQ-RNTTP-TMTNAEFAQTKFGSTKPKTKQKKS-----GPR-----MSPT EYMKQKASQY  
DmTob MQRGAQPLFTTTATFAQTKFGSTKTKTSSKRTN--SSSAYRMSPT-TEFSNYIKQRAMQO  
HsBTG1 ---TSFSKYNMNTVSG-----  
BtBTG1 ---TSFSKYNMNTVSG-----  
RnBTG1 ---TSFSKYNMNTVSG-----  
MmBTG1 ---TSFSKYNMNTVSG-----  
GgBTG1 ---TSFSKYNMNTVSG-----  
XlBTG1 ---TSFSKYNMNTVSG-----  
DrBTG2 ---RSPKNNLLM-VSS-----  
DrBTG1 ---QSPKSFMMTCSS-----  
GgBTG2 ---SSPSKYNMNTVSS-----  
RnBTG2 ---SSPSKYNM-TVSS-----  
MmBTG2 ---SSPSKYNM-AVSS-----  
HsBTG2 ---SSPSKYNM-AVSS-----  
XlBTG2 ---SSSTPHYLMTVT-----  
HsPC3B ---VSNPKSIYQVENLKQP-FQSWLQIPRKKNVVD-G-----RVGLLGNTHYGSQKHPK  
MmPC3B ---VNNPKSVYQVENFKQS-LQPWFCLPRKHLAD-G-----RGFLGAACHPVKSSK  
X19.15 ---VSNPNSIYQCADYTA-IPSWSQYPRRKNYQNDG-----YP-HQPMFYYPQKPYK  
X19.10 ---VSNPNSIYQCADYSQA-IPSWSQYPRRKNYQNNQ-----YPPNPFMYYPQKAYK  
RnBTG3 ---ATTPSPVYQISELIFPPLPMWHPLPRKKPGMYRGGGHQSHYPPVFFAYSPGRKKN  
MmBTG3 ---AATPSVYQISELIFPPLPMWHPLPRKKPGMYRGSQHQTHYPPVFFAYPNPGRKKN  
HsBTG3 ---TAAASVYQISELIFPPLPMWHPLPRKKPGMYRGNHGHQHYPPVFFAYPNQGRKKN  
CeTob ---DKAALMVMWYMSPLAREKDDINANLSHREMYFFRFVYKPSAQTFSGVEFSQT

MmTob1 SVHSLYGLGLSQQQPQFPQQ-QQQQPSSQPPPLPQQQQQQPQQQQQQQQQ--TS  
HsTob1 SMHSLYGLGLSQQQP-----QQQQPAQPPPPPPPPQQQQQ-----K-----TS  
DrTob1 -----  
DrTob2 -----  
HsTob2 SLLKHKSLSLSMHSLN-----FITANPAPQQLSPNAKEFVYN-----G  
BlTob PTN-----VPTNKPARALSPNAKEFVYN-----  
DmTob QMHGHAVVPSAGSSVSAAYG---GMDAVSPARLSPNPLSLAGNQSVSGSSADSYYY  
HsBTG1 -----  
BtBTG1 -----  
RnBTG1 -----  
MmBTG1 -----  
GgBTG1 -----  
XlBTG1 -----  
DrBTG2 -----  
DrBTG1 -----  
GgBTG2 -----  
RnBTG2 -----  
MmBTG2 -----  
HsBTG2 -----  
XlBTG2 -----  
HsPC3B CYRPA-----MHRDRIL-----  
MmPC3B WCRPA-----SRRVDRYHWNALQFSGQTAPGEPGEALSSLK  
X19.15 AFRRSASTFS-----GPRVDRYHWNMKR-----  
X19.10 AFRQS-SAFS-----GPRVDRYHWNMKRSAIS-----  
RnBTG3 AFRP IPVTWVP-----PPGMHCDRNHWINPHMLAPH-----  
MmBTG3 PFRP IPVTWVP-----PPGMHCDRNHWINPHMLAPH-----  
HsBTG3 PYRP IPVTWVP-----PPGMHCDRNHWINPHMLAPH-----  
CeTob RFGSSKS-----RPLQTMDEVIKYLSQQVSSS-----

MmTob1 ALS-----PNAKEFIPP-----NMQCGSSTNGMPPGDS-----  
HsTob1 ALS-----PNAKEFIPP-----NMQCGSSTNGMPPGDS-----  
DrTob1 -----  
DrTob2 -----  
HsTob2 G-----GSPSLFFD-----AADGGSGTGGPFGGSGAGT-----  
BlTob -----PQPKMAD-----TLGFNNLIQNTFG-----  
DmTob PNMPIN--MYPQYGNRCLFESHFSADVSSMGLYVSGTAGAAVAVGSGVANKYSTYLEP  
HsBTG1 -----  
BtBTG1 -----  
RnBTG1 -----  
MmBTG1 -----  
GgBTG1 -----  
XlBTG1 -----

DrBTG2 -----  
DrBTG1 -----  
GgBTG2 -----  
RnBTG2 -----  
MmBTG2 -----  
HsBTG2 -----  
XlBTG2 -----  
HsPC3B -----  
MmPC3B QK-----  
X19.15 -----  
X19.10 -----  
RnBTG3 -----  
MmBTG3 -----  
HsBTG3 -----  
CeTob -----SSPSFTYS-----SINDQMRYSRPF-----

MmTob1 -----LNL-----  
HsTob1 -----LNL-----  
DrTob1 -----  
DrTob2 -----  
HsTob2 -----CNS-----  
BlTob -----FGL-----  
DmTob CYYGNGHANTQQHSQQQTRVGMDRPNSSSECFGLNVDCGSVVLEDSSSSSAAAAVAVT  
HsBTG1 -----  
BtBTG1 -----  
RnBTG1 -----  
MmBTG1 -----  
GgBTG1 -----  
XlBTG1 -----  
DrBTG2 -----  
DrBTG1 -----  
GgBTG2 -----  
RnBTG2 -----  
MmBTG2 -----  
HsBTG2 -----  
XlBTG2 -----  
HsPC3B -----  
MmPC3B -----  
X19.15 -----  
X19.10 -----  
RnBTG3 -----  
MmBTG3 -----  
HsBTG3 -----  
CeTob -----

MmTob1 -----SFLQYSNAFDFVFAAYGGLNEKS  
HsTob1 -----SFLQYSNAFDFVFAAYGGLNEKS  
DrTob1 -----  
DrTob2 -----  
HsTob2 -----SSFDMAQVFGGANSFLFLEKTP  
BlTob -----GGFDQMPSPNNMDS-----AKS  
DmTob IAGDSSAENSPLSTPTLAAVNVGKATSPPTNSTNNSSSHPIQQEQPSSSSGNGNGNANA  
HsBTG1 -----  
BtBTG1 -----  
RnBTG1 -----  
MmBTG1 -----  
GgBTG1 -----  
XlBTG1 -----  
DrBTG2 -----  
DrBTG1 -----  
GgBTG2 -----  
RnBTG2 -----  
MmBTG2 -----  
HsBTG2 -----  
XlBTG2 -----  
HsPC3B -----  
MmPC3B -----  
X19.15 -----  
X19.10 -----  
RnBTG3 -----  
MmBTG3 -----  
HsBTG3 -----  
CeTob -----

MmTob1 FVDGLNFS-----LNNMQYSNQFPQVMAN-  
HsTob1 FVDGLNFS-----LNNMQYSNQFPQVMAN-

DrTob1	-----	RnBTG2	-----
DrTob2	-----	MmBTG2	-----
HsTob2	FVEGLSYN-----LNTMQYPSQQPQPVLAN	HsBTG2	-----
BlTob	YLDGLNFN-----LNTIQYFGQPYQVMVAN	Xl1BTG2	-----
DmTob	NANGNNGNNSNTKLDIGLSSFYGTGSSYQQLLVAN	HsPC3B	-----
HsBTG1	-----	MmPC3B	-----
BtBTG1	-----	Xl19.15	-----
RnBTG1	-----	Xl19.10	-----
MmBTG1	-----	RnBTG3	-----
GgBTG1	-----	MmBTG3	-----
Xl1BTG1	-----	HsBTG3	-----
DrBTG2	-----	CeTob	-----
DrBTG1	-----		
GgBTG2	-----		

**Abb. 38. Alignment der BTG/Tob-Proteinfamilie.** Die konservierten Bereiche Box A und Box B sind farblich markiert. (Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Bt: *Bos taurus*; Rn: *Rattus norvegicus*; Gg: *Gallus gallus*; Xl: *Xenopus laevis*; Dr: *Danio rerio*; Bl: *Branchiostoma lanceolatum*; Dm; *Drosophila melanogaster*; Ce: *Caenorhabditis elegans*).

## 6.2 Abkürzungen

a/p	anterior/posterior	E	Embryonaltag
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>	ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
BMC	<i>basal mitotic cell</i>	EF	embryonale <i>feeder</i> -Zellen
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	ES	embryonale Stammzellen
bp	Basenpaar	esiRNA	<i>endoribonuclease III prepared small interfering RNA</i>
BrdU	Bromodesoxyuridin	EtBr	Ethidiumbromid
BSA	<i>bovine serum albumine</i>	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
BTG2	<u><i>B-cell translocation gene 2</i></u>	FCS	<i>fetal calf serum</i>
CD	<i>cluster od differentiation</i>	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
CMV	Cytomegalovirus	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
CP	<i>cortical plate (Corticalplatte)</i>	FP	<i>foor plate</i>
d/v	dorsal/ventral	g	Erdbeschleunigung
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride	G	Gliazelle
DE	Diencephalon	GFP	grün fluoreszierendes Protein
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	GMC	<i>ganglion mother cell</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure	GP	Gliavorläufer
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>	HSV	Herpes simplex-Virus



IGF	<i>insulin-like growth factor</i>	RMS	<i>rostral migratory stream</i>
IGFR	<i>insulin-like growth factor receptor</i>	RNA	Ribonucleinsäure
IRES	<i>internal ribosome entry side</i>	RNAi	RNA-interference
kb	Kilobasenpaar	RT	Raumtemperatur
KI1	<i>knock in 1</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
LGE	<i>lateral ganglionic eminence</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
MGE	<i>medial ganglionic eminence</i>	ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
MS	Mäuseserum	SV40	<i>simian virus 40</i>
N	Neuron	SVZ	Subventrikularzone
NE	Neuroepithelzelle	TE	Tris/EDTA
Neo	Neomycin	TG1	<u>Transgen 1</u>
NL	<i>neuronal layers</i>	TIS21	<i>TPA-induced sequence 21</i> (steht für eine TPA-induzierte cDNA in Fibroblasten; BTG2-Ortholog in Maus)
Nuc	Kernlokalisierungssignal	TK	Thymidinkinase
ORF	<i>open reading frame</i>	Tob1	<i>transducer of Erb 2 1</i>
pA	Polyadenylierungssignal	U/min	Umdrehungen pro Minute
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	ün	über Nacht
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	UTR	untranslatierte Region
PC3	<u>PC12-cDNA 3</u> (steht für eine klonierte NGF-induzierte cDNA, BTG2-Ortholog in Ratte)	VZ	Ventrikularzone
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	wt	Wildtyp
RE	Rhombencephalon	ZNS	Zentralnervensystem
RG	radiale Gliazelle		

## EIGENE PUBLIKATIONEN

- Haubensak, W., F. Narz, R. Heumann and V. Lessmann (1998). BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. Journal of Cell Science **111**: 1483-1493.
- Kohrmann, M., W. Haubensak, I. Hemraj, C. Kaether, V. J. Lessmann and M. A. Kiebler (1999). Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons. Journal of Neuroscience Research **58**: 831-835.
- Cid-Arregui, A. and W. Haubensak (2000). Gene Transfer into Brain Slices from Mouse Embryos Using Herpes Simplex Amplicons. Viral Vectors in Gene Therapy and Basic Research. A. Cid-Arregui and A. Garcia. Natick, Eaton Publishing.
- Calegari, F\*, W. Haubensak\*, D. Yang, W. B. Huttner and F. Buchholz (2002). Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 14236-40.
- Kosodo, Y\*, K. Roper\*, W. Haubensak\*, D. Corbeil and W. B. Huttner. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neuron-generating divisions of mammalian neuroepithelial cells. Manuskript in Vorbereitung.
- Haubensak, W. and W. B. Huttner. Analysis of the TIS21 promoter in transgenic mice. Manuskript in Vorbereitung
- Haubensak, W. and W. B. Huttner. Characterization of neuron-generating cell divisions of neural stem cells using multiphoton imaging of cultured neural tube from TIS21-GFP knock-in mouse embryos. Manuskript in Vorbereitung

## ABSTRACTS

- Lessmann, V., W. Haubensak, F. Narz and R. Heumann (1998). Presynaptic enhancement of glutamatergic synaptic transmission by BDNF or NT-4/5. European Journal of Neuroscience **10**: 7802.
- Haubensak, W., F. Narz, M. Hartmann, R. Heumann and V. Lessmann (1999). BDNF-GFP is targeted to secretory vesicles and accumulates close to synaptic junctions of cultured cortical neurons. Proceedings of the 27th Göttingen Neurobiology Conference. N. Elsner and U. Eysel. Stuttgart, Thieme.

Lessmann, V., M. Hartmann, W. Haubensak, F. Narz, K. Erdmann and R. Heumann (1999). Monitoring release of neurotrophins using BDNF-GFP transfected cortical neurons. Society for Neuroscience Abstract **25**.

Lessmann, V., W. Haubensak, M. Hartmann, F. Narz, K. Erdmann, M. Klau, B. Salmen and R. Heumann (1999). Neurotrophins as endogenous mediators of synaptic plasticity. Journal of Neurochemistry **73**: S110-S110

Haubensak, W. and W. B. Huttner (2000). The Use of the TIS21 Gene to study Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. Society for Neuroscience Abstract **26**.

Kosodo, Y., K. Roper, W. Haubensak, D. Corbeil and W. B. Huttner (2002). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neuron-generating divisions of mammalian neuroepithelial cells. American Society for Cell Biology Abstract.

---

\*geteilte Erstautorenschaft

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Wieland B. Huttner für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Betreuung dieser Arbeit und die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre – und nicht zuletzt für das entgegengebrachte Vertrauen in die Umsetzung des Themas.

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Hans-Hermann Gerdes für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Winfried Denk möchte ich für Kooperation, Rat und Hilfe bei der experimentellen Umsetzung der Videomikroskopie und die Zurverfügungstellung der Laboreinrichtungen danken.

Bei Prof. Hannah Monyer möchte ich mich für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen und Materialien für die ES-Zellkultur bedanken.

Federico Calegari gilt mein Dank für Kooperation und die zur Verfügung gestellten Daten in Bezug auf Experimente zu RNAi und Zellzykluslänge im Neuroepithel. Frank Buchholz sei für Initiative und Betreuung des RNAi-Projektes gedankt.

Yoichi Kosodo und Katja Röper möchte ich für Zusammenarbeit und die zur Verfügung gestellten Daten bzgl. der Verteilung apikaler Membran bei Zellteilungen im Neuroepithel danken.

Daniel Freund danke ich für die Übernahme der Charakterisierung des Blutbildes in der *TIS21*-GFP-Mauslinie.

Insbesondere bin ich Björn Oback und Angel Cid-Arregui für Ideen und Diskussionen zum Konzept der Arbeit und experimenteller Umsetzung zu Dank verpflichtet.

Christoph Lorra, Denis Corbeil und Anne-Marie Marzesco danke ich für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft und Rat bei wissenschaftlichen Fragen.

Mein Dank gilt Patricia Vegh und Ruth Jelinek für die Durchführung vieler Experimente, Frank Zimmermann und Ronald Naumann für Rat und die Durchführung transgener Maustechniken, Petra Hornsberger, Jussi Helppi und Anke Münch-Wuttke für die Betreuung der Mauslinien.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Heidelberger und Dresdner Besetzung möchte ich ausdrücklich für Hilfsbereitschaft und gute Arbeitsatmosphäre danken.