

**Molekulargenetische Analyse des *Pax6*-Gens in der
Kortikogenese der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Joachim Berger
aus Mainz

Köln 2003

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie,
Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Institut, in der Abteilung Molekulare Zellbiologie
von Prof. Dr. Peter Gruss durchgeführt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Maria Leptin
Prof. Dr. Peter Gruss

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Nov. 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Die Ausbildung zellulärer Vielfalt im zentralen Nervensystem	7
1.2 Die Entwicklung des Telencephalons	9
1.3 Der Transkriptionsfaktor Pax6	11
1.4 Pax6 im sich entwickelnden Telencephalon der Maus	13
1.5 Der Promotor von Pax6	15
1.6 Analyse von Pax6 durch Überexpression	16
1.7 Zielsetzung	17
2. Ergebnisse	18
2.1 Generierung transgener Mäuse mit CRE-Rekombinaseaktivität	19
2.1.1 Generierung transgener Mäuse mit dem telencephalon Element von Pax6	19
2.1.2 Das telencephalon Element dirigiert spezifische Expression im sich entwickelnden zentralen Nervensystem	21
2.1.3 Sequenzuntersuchung von Pax6	24
2.1.4 Generierung transgener Mauslinien mit dem I8-Element	25
2.1.5 Das I8-Element dirigiert spezifische Expression im sich entwickelnden Embryo der Maus	26
2.1.6 Generierung transgener Mauslinien mit dem E1-ngn2-Element ..	28
2.1.7 Die E1-ngn2-Cre Mauslinie besitzt CRE-Rekombinaseaktivität in spezifischen Regionen des zentralen Nervensystems	29
2.2 Generierung einer transgenen Mauslinie zur Pax6-Überexpression nach erfolgter CRE-Rekombination	31
2.2.1 Das pJoP6 Konstrukt	31
2.2.2 Generierung der transgenen Mauslinie JoP6	35
2.3 Pax6-Überexpression in spezifischen Zellen des Kortex induziert Apoptose	36
2.3.1 Pax6-Überexpression mit der Emx1-Cre Mauslinie	36
2.3.2 Pax6-Überexpression mit der hGFAP-Cre Mauslinie	46

Inhaltsverzeichnis

2.3.3 Pax6-Überexpression mit der E1-ngn2-Cre Mauslinie	49
2.4. Analyse des adulten Kortex nach Pax6-Überexpression	52
2.4.1 Pax6-Überexpression mit der Emx1-Cre Mauslinie führt zu Defekten in der Schichtenbildung des Kortex	52
2.4.2 Pax6-Überexpression mit der hGFAP-Cre Mauslinie führt zu Defekten in der Schichtenbildung des Kortex	55
3. Diskussion	58
3.1 Generierung der JoP6 geflochten transgenen Mauslinie zur konditionalen Überexpression von Pax6	59
3.2 Generierung transgener Mauslinien mit spezifischer CRE-Re kombination im sich entwickelnden Kortex	60
3.3 Pax6-Überexpression führt zu Apoptose und zur Bildung von Zell aggregaten	63
3.4 Pax6 in der funktionellen Determination der kortikalen Schichten	66
4. Material und Methoden	73
4.1 Abkürzungen und Symbole	73
4.2 Material	74
4.2.1 Oligonukleotide	74
4.2.2 Plasmide	75
4.2.3 Plasmidkonstrukte	75
4.2.4 DNA-Längenstandards	78
4.2.5 Bakterienstämme	79
4.2.6 Antibiotika	79
4.2.7 Nährmedien	79
4.2.8 Puffer und Lösungen	79
4.2.8.1 Restriktionspuffer (NEB)	81
4.2.8.2 Restriktionspuffer anderer Enzyme	81
4.2.9 Chemikalien	81
4.2.10 Enzyme	82
4.2.10.1 Restriktionsenzyme	82
4.2.10.2 andere Enzyme	82
4.2.11 Sonstige Materialien	82
4.2.11.1 Plastikmaterialien	82
4.2.11.2 „Kit’s“	82
4.2.11.3 Filme	82
4.2.11.4 Geräte, Computer und Software	83
4.3 Molekularbiologische Methoden	83
4.3.1 Transformation von E. coli	83
4.3.1.1 Präparation und Transformation elektrokompeter E. coli-Zellen	83
4.3.1.2 Blau/Weiß-Selektion zur Identifikation von Plasmid- klonen	84
4.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	84
4.3.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	84
4.3.2.2 Maxi- und Midipräparation von Plasmid-DNA mit dem Qiafilter-Kit (Qiagen)	84

Inhaltsverzeichnis

4.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösungen	85
4.3.3 Enzymatische Manipulation von DNA	85
4.3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	85
4.3.3.2 Auffüllen von 5'-Restriktionsüberhängen mit Klenow-Polymerase	85
4.3.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden	85
4.3.3.4 Phosphorylierung von Oligonukleotiden für die Ligation	86
4.3.3.5 Ligation von DNA-Enden	86
4.3.3.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	86
4.3.4 Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten	87
4.3.4.1 Agarosegelelektrophorese	87
4.3.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Elektroelution	87
4.3.4.3 Aufbereitung von linearen DNA-Konstrukten für die Injektion in Mausocyten (Hogan et al., 1994)	88
4.3.5 Genotypisierung durch PCR	89
4.3.6 Biochemische Standardmethoden	89
4.4 Embryologische und zellbiologische Methoden	90
4.4.1 Erzeugung transgener Mäuse mittels Mikroinjektion	90
4.4.2 Mäuse und Embryonen	91
4.4.3 Injektionen	91
4.4.4 Transfektion von COS Zellen	91
4.5 Histologie	91
4.5.1 Einbetten von Embryonen und Geweben in Paraffin	91
4.5.2 Anfertigen von Gefrierschnitten	92
4.5.3 Immunhistochemie	92
4.5.3.1 Primärantikörper	93
4.5.3.2 Sekundärantikörper	93
4.5.4 Histologischer Nachweis der Zellproliferation	93
4.5.5 Histologischer Nachweis von Apoptose	94
4.5.6 Histochemischer Nachweis von β -Galactosidaseaktivität	94
4.5.6.1 Im Ganzpräparat	94
4.5.6.2 Auf Gefrierschnitten (Lobe et al., 1999)	95
4.5.7 Histochemischer Nachweis von alkalischer Phosphatase Aktivität (Lobe et al. 1999)	96
4.5.7.1 Im Ganzpräparat	96
4.5.7.2 Auf Gefrierschnitten	96
4.5.8 Kontrastfärbung histologischer Schnitte mit Neutralrot	97
4.5.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologische Schnitte	97
4.5.10 Dokumentation und Auswertung histologischer Präparate	98
5. Zusammenfassung	99
6. Abstract	100
7. Literaturverzeichnis	101

Inhaltsverzeichnis

8. Publikationen	116
8.1 Wissenschaftliche Artikel	116
8.2 Tagungsbeiträge	116
9. Danksagung	117
10. Erklärung	118
11. Lebenslauf	119

1. Einleitung

1.1 Die Ausbildung zellulärer Vielfalt im zentralen Nervensystem

Während der Embryonalentwicklung gehen die unterschiedlichen Zelltypen, die den adulten Organismus bilden, aus einer einzigen Zelle, der befruchteten Eizelle, hervor. Die Eigenschaften der verschiedenen Gewebe und Organe des Körpers werden durch die Vielzahl spezialisierter Zelltypen bestimmt. Diese Vielfalt wird durch individuelle Unterschiede im molekularen Profil determiniert, das die Zellidentitäten festlegt (Edlund und Jessell, 1999). Die molekularen Unterschiede beruhen ihrerseits auf der Aktivierung individueller Kombinationen der 30.000-40.000 Gene (Venter et al. 2001; Int. Genome Sequencing consort., 2001) des, bis auf wenige Ausnahmen, für alle Zellen gemeinsamen Genoms.

Das zentrale Nervensystem der Säugetiere ist das extremste Beispiel zellulärer Diversifikation, wobei die genaue Anzahl verschiedener Zelltypen, die nach vorsichtigen Schätzungen bei mehreren hundert liegt, noch immer unklar ist (Stevens, 1998). Der Beginn der Entwicklung des ZNS manifestiert sich mit der Ausbildung der Neuralplatte, der initialen Gruppe neuroepithelialer Zellen, die sich als Resultat der Neuralinduktion aus dem embryonalen Ektoderm bildet (Stern, 2001). Mit dem generischen Programm der Neuralinduktion findet bereits eine Unterteilung der Neuraxis entlang der Kopf-Rumpf (rostrokaudal)-Achse in zukünftiges Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Zwischenhirn) und Metencephalon (Nachhirn), sowie Rückenmark statt (Lumsden and Krumlauf,

1996; Stern, 2001). Die Neuralplatte faltet sich während der Neurulation zum Neuralrohr ein, wobei die lateralen Ränder dorsal fusionieren (Schoenwolf, 1991). Während der frühen Embryogenese setzt sich das Neuralrohr zellulär aus einem scheinbar mehrschichtigen, sich durch Zellteilung multiplizierenden (mitotischen) Neuroepithel zusammen (Jacobson, 1991). Während der Neurogenese verlassen Vorläuferzellen nach und nach den Zellzyklus und migrieren aus der nahe dem Lumen des Neuralrohrs lokalisierten Ventrikularzone radial in die Mantelzone, wo aus diesen postmitotischen Zellen die verschiedenen Subklassen von Neuronen und Gliazellen hervorgehen (Nornes und Carry, 1978, Jacobson, 1991). Die Spezifizierung der verschiedenen Zellschicksale wird dabei durch das Zusammenspiel zweier prinzipieller Klassen von determinierenden Faktoren, sekretierten- und Transmembran-Signalen, die in der lokalen Zellumgebung vorhanden sind, sowie intrinsischen Faktoren, die in einer zellautonomen Weise agieren, determiniert (Edlund und Jessell, 1999).

Die molekulare Analyse des Rückenmarks ist im Vergleich zu anderen Geweben weit fortgeschritten. Hier konnte gezeigt werden, daß im sich entwickelnden Rückenmark und ähnlich in anderen Regionen des ZNS das Ineinandergreifen zweier extrinsischer Signalsysteme entlang der rostrokaudalen und entlang der Rücken-Bauch(dorso-ventral)-Achse zur Etablierung eines Rasters positionaler Information führt (Jessell, 2000). Das Zellschicksal der neuronalen Vorläuferzellen wird hierbei über die Position einer gegebenen Zelle innerhalb dieses Rasters beeinflusst, die die Identität und Konzentration der induktiven Signale, denen die Zellen ausgesetzt sind, festlegt (Gurdon et al., 1998). Im weiteren Verlauf verlieren neuronale Zellen langsam die Abhängigkeit von extrinsischen Faktoren und schalten zunehmend auf zellautonome Differenzierungsprogramme um, die schließlich die Ausbildung bestimmter Motorneurone und Interneurone an den entsprechenden funktionell relevanten Positionen steuern (Tsuchida et al., 1994; Ericson et al., 1997). Die zellautonome Steuerung solcher Differenzierungsprogramme wird durch verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren vermittelt, die die Aktivierung (Expression) bestimmter Zielgene steuern (Goridis and Brunet, 1999). Neugebildete, postmitotische Neurone werden über die selektive Ausbildung zellulärer Kontakte mit einer Vielzahl anderer Neurone, entsprechend ihrer funktionellen Identität in neurale

Schaltkreise einbezogen (O’Leary und Wilkinson, 1999). Die bemerkenswerte Präzision, mit der diese Schaltkreise ausgebildet werden, bildet schließlich die Basis für das Verhaltensrepertoire des adulten Organismus.

1.2 Die Entwicklung des Telencephalons

Das Gehirn der Maus läßt sich aufgrund seiner genetischen Marker entlang der dorso-ventralen und der rostro-caudalen Achse nach dem prosomerischen Modell aufteilen. Nach diesem Modell wird jede genetisch festgelegte Gewebeanlage in ein Gitter eingetragen. Die Neuomere sind die transversalen Einteilungen, die für Metencephalon und Rückenmark in Rombomere 1 bis 7 und im Prosencephalon in Prosomere 1 bis 6 benannt wurden. Die Prosomere 1 bis 4 bilden das Diencephalon und die Prosomere 5 und 6 das Telencephalon (Abb. 2 in 1.4). Das Telencephalon des Mausembryos läßt sich in der dorso-ventralen Achse in Kortex und Basal Ganglion unterteilen. Während der Entwicklung bildet sich aus dem Neuroepithelium der Neuralplatte dorsal der Kortex mit seinen 6 Schichten und ventral die drei Eminenzen, mediale, laterale und caudale Ganglion Eminenz.

Der Kortex teilt sich in vier funktionelle Bereiche: medialer, dorsaler, lateraler und ventraler Kortex (Puelles et al., 1999). Die meisten Neurone des sich entwickelnden dorsalen Kortex werden von E11 bis E17 in der ventrikularen Zone, die an das Ventrikel des Telencephalons angrenzt, gebildet (Gillies und Price, 1993). Während dieser Neurogenese durchlaufen die Vorläuferzellen 11 Zellzyklen (Takahashi et al., 1995). Die Zellteilung der Vorläuferzellen ist an deren Wanderung in der ventrikularen Zone gebunden. Innerhalb eines Zellzyklusses wandert die Vorläuferzelle vom apikalen Rand der ventrikularen Zone des Kortex, wo sie sich geteilt hat, an den basalen (dorsalen) Rand und zurück, wobei sie sich am apikalen Rand erneut teilt. Die ersten so gebildeten postmitotischen Neurone bilden die Präplatte (Abb. 1). Die später gebildeten Neurone des Kortex wandern in die Präplatte ein und unterteilen sie so in marginale Zone (spätere Schicht I) und die Subplatte (spätere Schicht VIb).

Die kortikalen Projektionsneurone werden von dem proliferierenden Neuroepithelium der ventrikularen Zone gebildet, während die Interneurone hauptsächlich von der ventrikularen Zone des Subkortex gebildet werden. Von dort aus wandern sie tangential in die Zielregionen des Kortex ein (Martin und Rubenstein, 2001).

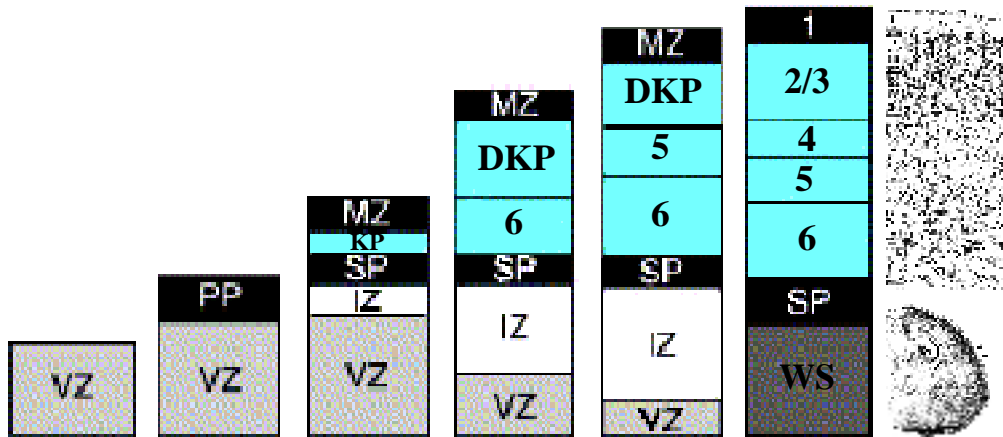


Abbildung 1

Die Entstehung der Schichten des sich bildenden Kortex der Maus (aus O'Leary und Nakagawa, 2002). Abkürzungen: DKP: Dorsale kortikale Platte; KP: Kortikale Platte; MZ: Mediale Zone; PP: Präplatte; SP: Subplatte; VZ: Ventrikuläre Zone; WS: Weiße Substanz.

Anschließend wird eine zweite proliferierende Zone, die subventrikuläre Zone, zwischen der ventrikulären und der marginalen Zone gebildet. Dann wird der Kortex durch den sogenannten "innen-zuerst und außen-zuletzt" Mechanismus gebildet. Um ihren Bestimmungsort in der oberen kortikalen Platte zu finden, wandern die später entstehenden Neurone (Schicht IV bis II) durch die vorher gebildeten Schichten (Schicht VI und V) nach außen (Abb. 1; Angevine und Sidman, 1961; Berry und Rogers, 1965). Wenn die Wanderung der Neurone beendet ist, werden die Neurone durch ihre Axone miteinander vernetzt. In der Maus wird der Hauptteil der Neurone zwischen E11 bis E17 gebildet; in dieser Zeitspanne verlängert sich die S-Phase des Zellzyklusses von 8 Stunden bis auf 18 Stunden (Takahashi et al., 1999). Neurone verschiedener Schichten werden überlappend gebildet. Bei E11 werden die Neurone hauptsächlich für die marginale Zone (Schicht I) und Subplatte (Schicht VIb) gebildet. Bei E12.5 bis E14.5 entstehen die Schichten VI und V, um E15.5 die Schicht IV und anschließend bis E17.5 die Schichten III und II (Abb. 1) (Angevine und Sidman, 1961; Rakic, 1974). Bei der Geburt (E19) proliferieren in der ventrikulären und subventrikulären Zone nur noch sehr wenige Vorläuferzellen (Alvarez-Buylla et al., 1990; Doetsch et al., 1999). Die anderen Zellen werden zur sogenannten weißen Substanz.

Wie Veröffentlichungen zeigen, wird die Akkumulation der spezifischen Schichten in der S-Phase des letzten Mitosezyklus der Vorläuferzelle festgelegt. Man nimmt an, daß die Bildung der kortikalen Schichten sowohl von der Umgebung als auch von intrinsischen Faktoren in dem jeweiligen Entwicklungsstadium abhängig ist (McConnell, 1981, 1995; Schwarz et al., 1991). So wird die laminare Zugehörigkeit durch den Mechanismus des Zellzyklus reguliert. Die ersten drei Zyklen bilden die Schichten VI und Vb, die Zyklen 4 bis 8 bilden die Schichten Va bis III und die letzten drei Zyklen generieren die Schichten III und II (Takahashi et al., 1999).

Der Kortex läßt sich außerdem durch seine unterschiedlichen Aufgaben in verschiedene funktionelle Regionen (visueller, auditorischer, somatosensorischer und motorsensorischer Kortex) aufteilen. Es gibt zwei Hypothesen, wie diese Regionalisierung eventuell entsteht: Das "Protomap" Modell (Rakic, 1988) postuliert eine Regionalisierung aufgrund intrinsischer Faktoren. Dagegen behauptet das "Protokortex" Modell (O'Leary, 1989), daß die Regionalisierung durch extrinsische Faktoren wie Axone, die aus dem Thalamus oder anderen Regionen des Gehirns einwandern, festgelegt wird. Heutzutage wird angenommen, daß die Regionalisierung des Kortex durch regional spezifische Expression von Transkriptionsfaktoren und regulatorische Moleküle in den Vorläuferzellen zusammen mit den Umgebungsfaktoren, die durch einwandernde Axone mitgebracht werden, gebildet wird. Auch wurden Daten erbracht, die zeigen, daß sowohl die Schichtenbildung des Kortex, als auch die funktionelle Regionalisierung des Kortex durch den Mechanismus des Zellzyklus festgelegt werden (Polleux et al., 1997).

1.3 Der Transkriptionsfaktor *Pax6*

Pax6 gehört zu der Familie der hoch konservierten Pax-Transkriptionsfaktoren, die zwei DNA-bindende Domänen besitzen: Eine Homeo- und eine Paired-Domäne (Übersicht in Callaerts et al., 1997). Zuerst wurde *Pax6* im Menschen (Ton et al., 1991) und in der Maus gefunden (Walther und Gruss, 1991). Dann wurde *Pax6* auch in vielen anderen Organismen, wie zum Beispiel *Drosophila melanogaster* (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999), *Cenorhabditis elegans* (Chisholm und Horvitz, 1995; Zhang und Emmons, 1995) oder auch Kopffüßler

Loligo opalescens (Tomarev et al., 1997) und sogar in der Planarie *Dugesia tigrina* (Callaerts et al., 1999) entdeckt.

Das humane *Pax6* Gen wurde als möglicher Kandidat für die neurodegenerative Krankheit Aniridia kloniert. Daraufhin ließen sich dann weitere mutante Allele von *Pax6* in Patienten finden, die an verschiedenen Augensyndromen wie Peter's Anomalie, Keratitis oder ektopischen Pupillen leiden (*Pax6* Allele in Datenbank <http://pax6.hgu.mrc.ac.uk>). Mäuse mit der *Pax6* Mutation *Small eye (sey)*, die zum Verlust der *Pax6* Funktion führt, haben im heterozygoten Zustand unter anderen Defekten kleine Augen (Hill et al., 1991). Auch die Mutation *eyeless* in *Drosophila* hat Augenphänotypen zur Folge, die denen des Menschen und der Maus vergleichbar sind (Quiring et al., 1994). Diese Analogie zeigt, daß es sich bei den genannten *Pax6*-Genen tatsächlich um Homologe mit gleicher Funktion handelt. Dies gibt sogar Antwort auf eines der Hauptprobleme von Charles Darwin in seiner Theorie "The Origin of Species": Sind Organe mit extremer Perfektion und Komplexität wie das Auge konvergent oder divergent entstanden (Darwin, 1882)? Da selbst bei evolutionär entfernten Arten wie Kopffüßler und Mensch die molekulare Grundlage für das Auge der Transkriptionsfaktor *Pax6* ist, kann auf ein Ursprungsauge geschlossen werden (Gehring, 2002). Augen sind nach dieser Theorie also konvergent entstanden.

Um die Bedeutung von *Pax6* für das Auge genauer zu untersuchen, war es nötig, *Pax6* konditional zu inaktivieren, denn homozygote Nullmutanten der Maus sterben während der Geburt (E19). Auf diese Weise konnte herausgefunden werden, daß sich anstelle der sechs verschiedenen Zellklassen nur die Amakrinzellen bilden, wenn *Pax6* in den Vorläuferzellen der Retina inaktiviert wird (Marquardt et al., 2001). Wird *Pax6* im Linsenektoderm ausgeschaltet, so wird keine Linse gebildet (Ashery-Padan et al., 2000).

Aber nicht nur in der Augenentwicklung spielt *Pax6* eine bedeutende Rolle, sondern auch in der Ausbildung der pankreatischen Alphazellen, bestimmten Nasenstrukturen, dem Rückenmark und in verschiedenen Gehirnregionen (St-Onge et al., 1997; Hogan et al., 1986; Ericson et al., 1997; Stoykova et al., 1994).

1.4 *Pax6* im sich entwickelnden Telencephalon der Maus

Das Vorderhirn der Maus besteht aus dem Telencephalon und dem Diencephalon, wobei sich das Telencephalon wiederum in Kortex und Subkortex (Basal Ganglion) unterteilen läßt. Der Transkriptionsfaktor *Pax6* ist schon ab E8.0 im Prosencephalon und in der ventralen Zone des Neuralrohrs exprimiert (Walther und Gruss, 1991). Im Telencephalon von E10.5 bis E18.5 befindet sich *Pax6* in den Vorläuferzellen der ventrikularen Zone des Kortex, in der Amigdala und im ventralen Kortex (Abb.2; Stoykova et al., 1996). Dabei bildet *Pax6* einen Gradienten, mit starker Expression im anterioren (vorderen) lateralen Bereich und schwacher Expression im caudalen (hinteren) medialen Bereich aus (Stoykova und Gruss, 1994). Im sich entwickelnden Diencephalon befindet sich PAX6 in der Mantelzone des ventralen Thalamus und im vorderen Hypothalamus. Dabei wird eine scharfe Grenze zwischen dem dorsalen und dem ventralen Thalamus, die Zona Limitans Interthalami, gebildet. Im dorsalen Thalamus ist die Expression auf die ventrikuläre Zone beschränkt. Nach E13.5 wird die Expression schwächer, aber bei E18.5 ist *Pax6* noch aktiv im ventralen Thalamus, im Epithalamus und im Prätektum (Walther und Gruss, 1991). Sogar noch im adulten Gehirn kann *Pax6* Expression detektiert werden (Stoykova und Gruss, 1994).

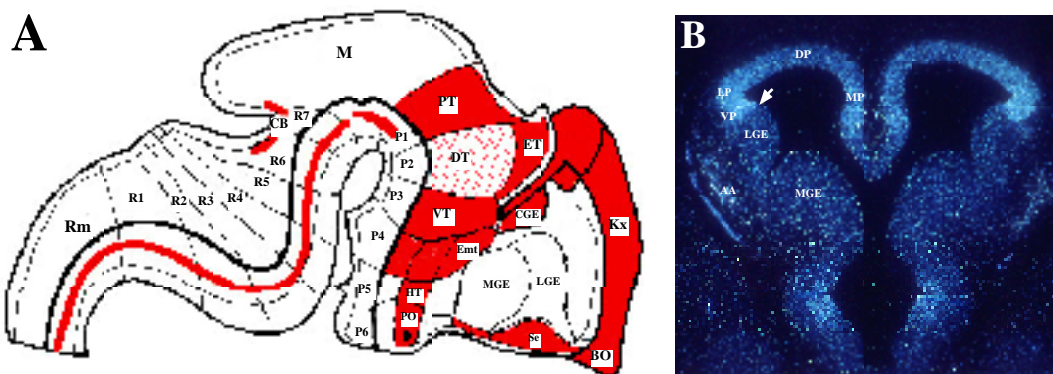


Abbildung 2

Die Expression von *Pax6* im E13.5 Telencephalon (aus Stoykova et al., 1996). (A) Schematische Darstellung nach dem Prosomer-Modell und (B) *in-situ* Hybridisierung mit *Pax6*-Probe auf transversalen Paraffinschnitt. Die rot markierten Bereiche in A sind *Pax6* positiv. In B ist der lateral starke und medial schwache Gradient der *Pax6*-Expression dokumentiert. Abkürzungen: AA: Anteriore Amigdala; BO: Bulbus Olfactorius; CB: Cerebellum; CGE: Caudale Ganglionica Eminenz; DT: Dorsaler Thalamus; DK: Dorsaler Kortex; Emt: Eminentia Thalami; ET: Epithalamus; HT: Hypothalamus; Kx: Kortex; LGE: Laterale Ganglionica Eminenz; LK: Lateraler Kortex; M: Metencephalon; MGE: Mediale Ganglionica Eminenz; MK: Medialer Kortex; P1 bis P6: Prosomere 1 bis 6; Pt: Prätektum; R1 bis R7: Rombomere 1 bis 7; Rm: Rückenmark; Se: Septum; VK: Ventraler Kortex.

Die Bedeutung von *Pax6* für die Entwicklung des Telencephalons zeigt sich in der Maus Nullmutanten *Small eye (sey)*. Der Kortex ist hypozellular und die radiale Organisation der Zellen in den Schichten ist gestört. Die germinative Region (die ventrikuläre und subventrikuläre Zone) ist vergrößert und die Vorläuferzellen verbinden sich zu Aggregaten in der intermediären Zone, anstatt sich am unteren apikalen Rand der ventrikulären Zone aufzureihen (Schmahl et al., 1993; Stoykova et al., 1997; Waren und Price, 1999). Auch der Zellzyklus ist gestört, da in *Small eye* ektopische Mitosezellen detektiert werden konnten (Estivill-Torres et al., 2002).

Die dorso-ventrale Musterbildung des Telencephalons ist ebenfalls gestört. Die Expressionsdomänen verschiedener ventraler Gene wie *Dlx1*, *Mash1*, *Vax1*, *Six3*, *Nkx2.1* und *Lhx6* sind in der *sey/sey* Mutanten dorsal erweitert. Durch diese Ventralisierung des Kortex ist das Claustrum, der Piriformkortex und der Endopiriforme Nucleus und der laterale Kortex mißgebildet (Stoykova et al., 2000).

Aber nicht nur die dorso-ventrale Musterbildung, sondern auch die funktionelle Regionalisierung ist in *sey/sey* verschoben. Als Beispiele für eine intrinsische Regionalisierung des Kortex konnten bisher nur die beiden Transkriptionsfaktoren *Pax6* und *Emx2* angeführt werden. *Pax6* und *Emx2*, die in entgegengesetzten Gradienten in der germinativen Zone des Kortex exprimiert sind, legen die Unterteilung des Kortex in seine vier funktionellen Regionen (auditorischer, visueller, somatosensorischer und motorsensorischer Kortex) fest. Deswegen werden in den Nullmutanten von *Pax6* bzw. *Emx2* verschobene Regionalisierungen des Kortex gefunden (Abb. 3) (Bishop et al., 2000; Muzio et al., 2002)

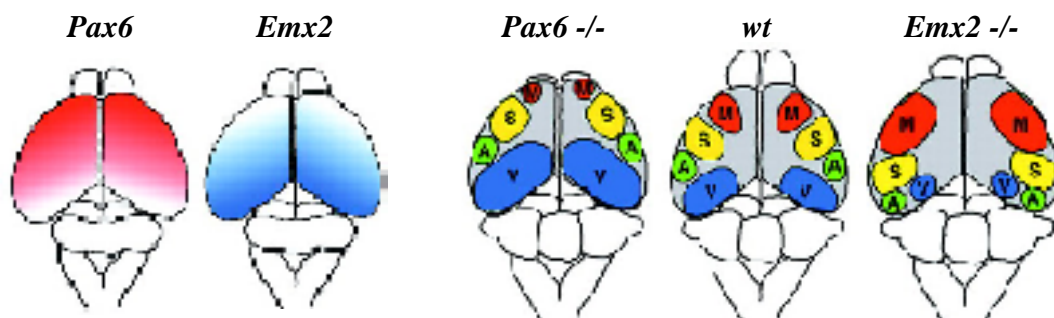


Abbildung 3

Im Wildtyp-Kortex sind *Pax6* und *Emx2* in entgegengesetzten Gradienten exprimiert (aus Muzio und Mallamaci, 2003). In den Nullmutanten von *Pax6* bzw. *Emx2* sind die vier funktionellen Regionen des Kortex verschoben. Abkürzungen: M: Motorsensorischer Kortex; S: Somatosensorischer Kortex; A: Auditorischer Kortex; V: Visueller Kortex.

Die Bedeutung von *Pax6* für die Identität des Kortex wird auch in der *Emx2*; *Pax6* Doppelmutanten deutlich. Werden beide Gene in der Maus ausgeschaltet, so wird kein Kortex mehr gebildet (Muzio, et al., 2002b). Stattdessen findet eine homeotische Transformation des Kortex in Basal Ganglion Gewebe statt.

Radiale Gliazellen sind mitotisch aktiv und besitzen lange Fortsätze, die bis zum äußeren Rand des Kortex reichen. Neurone nutzen diese Fortsätze, um zu ihrem Bestimmungsort zu gelangen. Bisher wurde angenommen, daß die radialen Gliazellen ausschließlich Astrozyten bilden (Voigt et al., 1998; Culican et al., 1990; Leavitt et al., 1999). Dies hat sich jedoch in letzter Zeit geändert. Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, daß die radialen Gliazellen sowohl *in vitro* (Malatesta et al., 2000) als auch *in vivo* (Noctor et al., 2001; Miyata et al., 2001) sowohl Gliazellen als auch Neurone bilden. Deswegen werden die radialen Gliazellen auch als multipotente Vorläuferzellen angesehen. Interessanterweise wird *Pax6* in diesen radialen Gliazellen exprimiert. Wird *Pax6* in den radialen Gliazellen wie bei *sey/sey* inaktiviert, so sind die radialen Gliazellen in ihrem Zellzyklus und ihrer Differenzierung gestört (Götz et al., 1998). In Experimenten zur Untersuchung der Zellabstammung *in vitro* konnte gezeigt werden, daß *Pax6* inaktivierte, radiale Gliazellen weniger Neurone bilden können als die *Pax6* positiven (Malatesta et al., 2000). Desweiteren konnte ebenfalls *in vitro* der Anteil an Neuronen durch *Pax6*-Überexpression erhöht werden (Heins et al., 2002). Diese Ergebnisse implizieren, daß *Pax6* die Neurogenese der radialen Gliazellen/Vorläuferzellen ermöglicht.

Wie die dargelegten Veröffentlichungen zeigen, spielt *Pax6* eine bedeutende Rolle in der Bildung der Identität, Regionalisierung und Proliferation, sowie in der Differenzierung des sich entwickelnden Kortex.

1.5 Der Promotor von *Pax6*

Um die korrekte Transkription zu gewährleisten, besitzt *Pax6* ein sehr komplexes System aus Kontrollelementen. Alternatives Spleißen, verschiedene Translationsstartpunkte und die Zusammenarbeit von vielen verschiedenen cis-Elementen (Enhancer) dirigieren die Expression von *Pax6* in der Maus (Epstein et al., 1994; Kammandel et al., 1999; Xu et al., 1999; Griffin et al., 2002). Der entfernteste Enhancer wurde 150 kb vom Transkriptionsstart entfernt gefunden und dirigiert

Pax6-Expression in der Neuroretina (Kleinjan et al., 2001). Für die Expression in der Neuroretina konnten noch zwei weitere Elemente gefunden werden. Ein Element dirigiert die Expression in die Neuroretina und in den Bulbi Olfactorii der Nase (Griffin et al., 2002) und das andere dirigiert die Expression ausschließlich in die distale Neuroretina (Kammandel et al., 1999; Marquardt et al., 2001). Mit Hilfe transgener Mäuse wurden außerdem Enhancer für Pankreas, Telencephalon, Linse, Cornea und Rückenmark identifiziert (Williams et al., 1998; Xu und Saunders, 1998; Kammandel et al., 1999; Xu et al., 1999). Xu und Saunders geben allerdings in ihrer Veröffentlichung ein *Pax6*-Element an, das sowohl von Marquardt und Mitarbeitern als auch von Kammandel und Mitarbeitern als Neuroretina Element identifiziert und verifiziert werden konnte.

1.6 Analyse von *Pax6* durch Überexpression

Eine weitere Möglichkeit zur Funktionsanalyse von Genen ist neben der Inaktivierung die Überexpression des zu untersuchenden Genes. Auch hierzu wurden mit *Pax6* bereits Experimente durchgeführt.

Mit Hilfe des GAL4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) wurde *eyeless*, das *Pax6*-Homolog der Taufliege *Drosophila*, ektopisch in *Drosophila* exprimiert (Halder et al., 1995). An den Organen, in denen *eyeless* exprimiert wurde, haben sich Augen (Facettenaugen) gebildet. Solche Experimente wurden ebenfalls in dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt (Altmann et al., 1997).

Erste Überexpressionsexperimente mit *Pax6* der Maus wurden in Zellkultur durchgeführt. Wurde *Pax6* in NIH 3T3 Zellen transfiziert, so konnte ein verändertes Zellwachstum festgestellt werden (Maulbecker und Gruss, 1993). Bei anschließender Injektion der *Pax6* positiven NIH 3T3 Zellen in die Bauchhöhle von Mäusen haben sich die *Pax6* positiven Zellen zu Tumoren ausgebildet.

Die Existenz des semidominanten *Sey*-Phänotyps im heterozygoten Zustand spricht dafür, daß die Gendosis von kritischer Bedeutung für die *Pax6*-Funktion ist. Um dies zu überprüfen, wurden transgene Mäuse mit einer unterschiedlichen Anzahl eines künstlichen Hefechromosomen (YAC) generiert (Schedl et al., 1996; Lamb und Gearhart, 1995). Dieses künstliche Hefechromosom war ca. 420 kb groß und enthielt den *Pax6* Genlokus der Maus. Die Insertion von zwei *Pax6*-

YACs konnte den heterozygoten Phänotyp von *Small eye* nicht revertieren. Eine Integration von 5 bis 7 *Pax6*-YACs führte dagegen zur Revertierung des heterozygoten Phänotyps und zu verschiedenen Augendefekten, die bei 10 inserierten *Pax6*-YACs noch stärker ausgeprägt waren. Als Augendefekte wurden, wie auch in der *Pax6*-Nullmutanten *Small eye*, vergrößerte und getrübe Linsen, sowie mißgebildete Retina und Iris beschrieben (Schedl et al., 1996). Die Intensität des resultierenden Phänotyps war also von der *Pax6*-Gendosis abhängig.

Im Pankreas wurde *Pax6* unter der Kontrolle der Promotoren von Insulin bzw. *Pdx1* ektopisch exprimiert. In beiden Fällen entwickelten die Mäuse Diabetes aufgrund nicht funktionstüchtiger beta-Zellen, die eine massive Apoptose zeigten (Yamaoka et al., 2000).

Heins und Mitarbeiter haben mit Hilfe eines Retrovirus *Pax6* in kultivierten Vorläuferzellen (E14.5) und in Astrozyten (adult) überexprimiert (Heins et al., 2002). Nach Expression von *Pax6* konnten sie feststellen, daß der Anteil an gebildeten Neuronen erhöht wurde.

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion des Transkriptionsfaktors *Pax6* während der Kortikogenese, insbesondere in den Vorläuferzellen des Kortex untersucht werden. Dazu sollte *Pax6* gezielt in spezifischen Vorläuferzellen des Kortex überexprimiert werden. Eine konditionale Strategie, basierend auf dem Cre-loxP-Rekombinasesystem (Tsien et al., 1996; Rajewski et al., 1996) sollte dies ermöglichen. Die Generierung zweier transgener Mauslinien wäre dazu nötig: Zum einen eine transgene Mauslinie, die die CRE-Rekombinaseaktivität spezifisch in kortikalen Vorläuferzellen aktiviert, und zum anderen eine Mauslinie, die ausschließlich nach der Cre-Rekombination *Pax6* überexprimiert. Am besten wäre dazu der telencephalische Promotor des *Pax6* Gens geeignet; daher sollte eine Serie von Promotorstudien durchgeführt werden, um ein geeignetes Expressionsmuster zu identifizieren.

Die Analyse molekularer Marker und histologischer Veränderungen im so erzeugten *in vivo*-Modell sollte schließlich Aufschluss über die Funktion von *Pax6* in den Vorläuferzellen des sich entwickelnden Kortex des Mausgehirns geben.

2. Ergebnisse

Um eine konditionelle Überexpression von *Pax6* im Kortex zu ermöglichen, soll das Cre-loxP-System verwendet werden. Das Cre-loxP-System beruht auf der sequenzspezifischen CRE-Rekombinase des Bakteriophagen *P1*, die die Zirkularisierung und Exzision eines DNA-Fragmentes katalysiert, das von zwei der *Cre*-Erkennungssequenzen, den 34 bp umfassenden loxP-Sequenzen, in derselben Orientierung flankiert wird. Basierend auf der Pionierarbeit von Brian Sauer (Sauer und Henderson, 1989) wurde dieses Rekombinasesystem erstmals in den Laboren von Tonegawa und Rajewsky erfolgreich zur gewebespezifischen Inaktivierung von Genen in der Maus benutzt (Tsien et al., 1996; Rajewsky et al., 1996).

Die Nutzung des Cre-loxP-Systems erfordert die Generierung von zwei transgenen Mauslinien: Die erste transgene Mauslinie soll die Expression von *Cre* und somit die CRE-Rekombination in spezifischen Zellen des Kortex steuern und die zweite transgene Mauslinie soll die *Pax6*-Überexpression ausschließlich nach erfolgter CRE-Rekombination gewährleisten. Um die *Pax6*-Überexpression in spezifischen Zellen des sich entwickelnden Kortex zu untersuchen und zu vergleichen, sollen transgene Mauslinien mit verschiedener *Cre*-Expression im Kortex generiert bzw. genutzt werden. Die Verfügbarkeit entsprechender gewebespezifischer Promotoren, die eine gezielte *Cre* Expression gewährleisten, ist dabei der limitierende Faktor der Cre-loxP-Strategie.

2.1 Generierung transgener Mäuse mit CRE-Rekombinaseaktivität

Um die *Pax6*-Überexpression in *Pax6* positiven Vorläuferzellen des Kortex zu dirigieren, wäre ein mögliches Steuerungselement aus dem *Pax6*-Promotor ideal. Um mit einem solchen Element eine transgene *Cre*-Mauslinie zu generieren, wurden verschiedene Promotoruntersuchungen durchgeführt.

2.1.1 Generierung transgener Mäuse mit dem *telencephalon* Element von *Pax6*

Kammandel und Mitarbeiter haben bei ihren Promotoruntersuchungen von *Pax6* ein Element gefunden, das Expression im Kortex einer transient transgenen Maus zeigte (Kammandel et al., 1999). Dabei wurden transient transgene Mäuse mit dem β -gal Reporter gen unter der Kontrolle des ersten Introns und dem P1-Minimalpromotor von *Pax6* generiert und durch β -gal Färbung analysiert. Eine E11.5 transient transgene Maus konnte mit einer schwachen Färbung im Kortex und im Rückenmark identifiziert werden. Aufgründessen wurde das erste Intron als *telencephalon*-Element bezeichnet. Dieses Element wurde genutzt, um transgene Mäuse mit CRE-Rekombinaseaktivität im Telencephalon zu generieren.

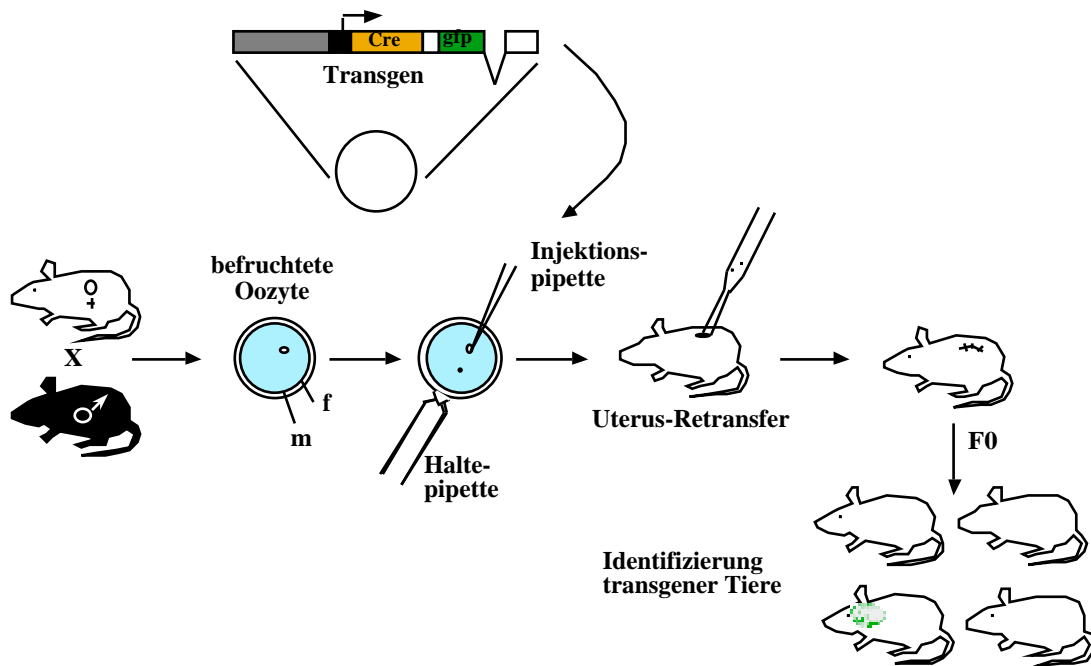
Als erstes wurde das *Cre* Leseraster in einer PCR mit den Primern CRFP und CRRS und dem Plasmid pPGK-Cre(NLS)-bpA (Fellenberg und Rajewsky, 1996) amplifiziert und in die PstI- und SacII-Spaltstellen des Plasmids psl1180-IRES-gfp-intron-pA (Ashery-Padan et al., 2000) kloniert. Anschließend wurde der P1-Minimalpromotor von *Pax6* durch PCR mit den Primern P6.7forN und P6.8revP auf dem Plasmid 6sg18 amplifiziert und in die NheI und PstI Spaltstellen von psl1180-Cre-IRES-gfp-intron-pA ligiert. Das erste Intron von *Pax6*, das das *telencephalon*-Element enthält, wurde mit BamHI aus dem Plasmid 6sg18 herausgespalten, der Restriktionsüberhang mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt und in die ebenfalls aufgefüllte NheI Spaltstelle von psl1180-P1-Cre-IRES-gfp-intron-pA inseriert. Das resultierende Konstrukt wird im folgenden als pTelCre bezeichnet.

Das *telencephalon*-Konstrukt wurde als BglII-SfiI-Fragment aus pTelCre herausgespalten, elektrophoretisch isoliert und über Elektroelution und P-30-Säulen für die Mikroinjektion aufgereinigt. Das aufgereinigte Konstrukt wurde in einer Konzentration von 5 ng/ μ l mittels Mikroinjektion in den männlichen Pronucleus

**Abbildung 4**

Das *telencephalon*-Konstrukt. Das *telencephalon*-Element von *Pax6* dirigiert mit Hilfe des P1-Minipromotors die Expression von *Cre* und *GFP*. Die *IRES* (internal ribosomal entry site)-Sequenz erlaubt die gleichzeitige Translation von CRE und GFP von einer einzigen bicistronischen mRNA.

befruchteter Eizellen injiziert (Abb. 5). Die Oozyten wurden anschließend in den Uterus scheinchwangerer Rezipientenweibchen eingespült. Die DNA aus den resultierenden F0-Mäusen wurde aus Biopsien der Schwanzspitze isoliert und transgene Mäuse durch PCR auf dem integrierten *Cre*-Gen nachgewiesen (siehe Material und Methoden). Hierüber wurden schließlich 16 transgene Mauslinien etabliert, die das Transgen stabil auf die Nachkommen vererbten. Sie werden im weiteren als *telencephalon-Cre* bezeichnet.

**Abbildung 5**

Schematische Darstellung der Herstellung transgener Mäuse mittels der Mikroinjektion (siehe Text). Die aufgereinigte DNA wird in den männlichen Pronucleus befruchteter Mausoozyten injiziert und in den Uterus scheinchwangerer Weibchen eingeführt. Die Nachkommen (F0-Generation) werden auf die Integration und Funktionalität des Transgens analysiert. Abkürzungen: m: männlicher-; f: weiblicher Pronucleus.

2.1.2 Das *telencephalon* Element dirigiert spezifische Expression im sich entwickelnden zentralen Nervensystem

Um die zeitlich-räumliche Dynamik der durch das *telencephalon*-Element dirigierten CRE-Aktivität zu ermitteln, wurden die *telencephalon-Cre* Mauslinien in die *Cre*-Reporterlinie *Z/AP* eingekreuzt (Abb. 6; Lobe et al., 1999).

In der *Z/AP*-Reporterlinie führt die Anwesenheit von CRE-Aktivität zur Exzision einer loxP-flankierten, ubiquitär exprimierten *lacZ-pA*-Kassette, was wiederum

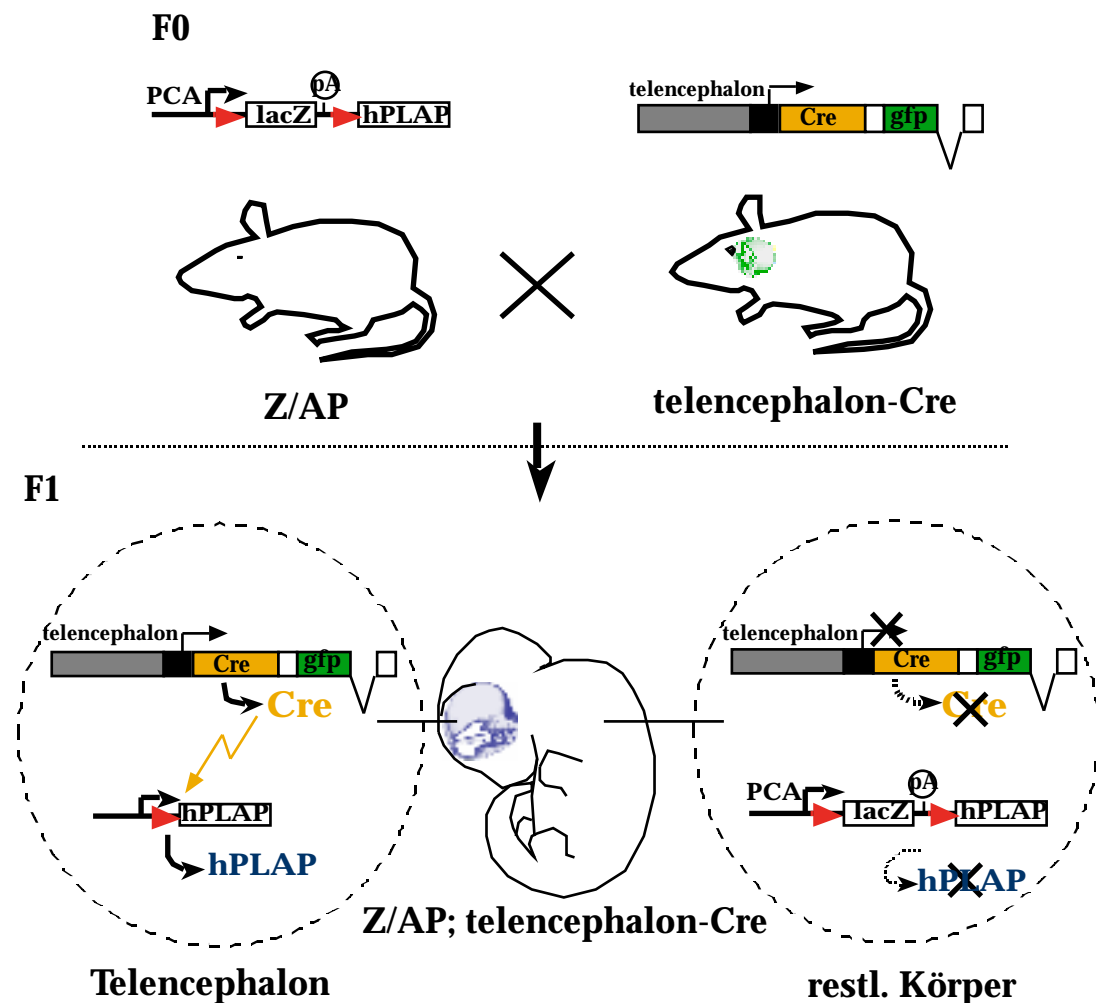


Abbildung 6

Das *Z/AP*-Transgen erlaubt die Detektion von CRE-Rekombinaseaktivität *in situ*. *Telencephalon-Cre*; *Z/AP* doppelt transgene Mäuse und Embryonen (F1-Generation) werden über Verpaarung einzeltransgener Mäuse (F0) hergestellt. Das *Z/AP*-Transgen: Ein ubiquitär-aktiver Promotor (PCA) steuert die Expression von *lacZ*, wobei die Anwesenheit mehrerer *polyA*-Signale (pA) die Expression des nachgeschalteten *hPLAP*-Gens verhindert, solange keine CRE-Aktivität vorhanden ist. Die *lacZ*-Kassette wird durch zwei loxP-Sequenzen (rote Pfeilköpfe) flankiert. (F1) CRE-Aktivität führt zur Exzision von *lacZ-pA* und zur permanenten *hPLAP*-Expression.

die Expression eines *hPLAP* (humane Plazentale Alkalische Phosphatase)-Reportergens ermöglicht. Die *Z/AP*-Reporterlinie erlaubt somit den histochemischen Nachweis von CRE-Aktivität *in situ* (Abb. 6). Da die rekombinierte Konfiguration des *Z/AP*-Transgens einer Zelle nach Mitose auf die Zellnachkommen vererbt wird, können die Abkömmlinge einer Vorläuferzelle über die *hPLAP*-Aktivität identifiziert werden. Über die histochemische Detektion von *hPLAP*-Aktivität (Lobe et al., 1999) in ganzen *telencephalon-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Embryonen wurde die durch *telencephalon-Cre* dirigierte CRE-Rekombinaseaktivität analysiert. Von den 16 generierten *telencephalon-Cre* transgenen Mauslinien zeigten 7 ein ubiquitäres Rekombinationsereignis, 2 konnten nicht erfolgreich verpaart werden und in 7 Linien konnte eine spezifische Expression im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Aber nur eine dieser 7 Mauslinien vererbte das Expressionsmuster stabil auf die Nachkommen weiter. Bei den anderen 6 veränderte sich die *hPLAP*-Expression in den nachfolgenden Generationen. Die stabile Mauslinie wird im folgenden als *telencephalon-Cre* bezeichnet und ihr Expressionsmuster beschrieben.

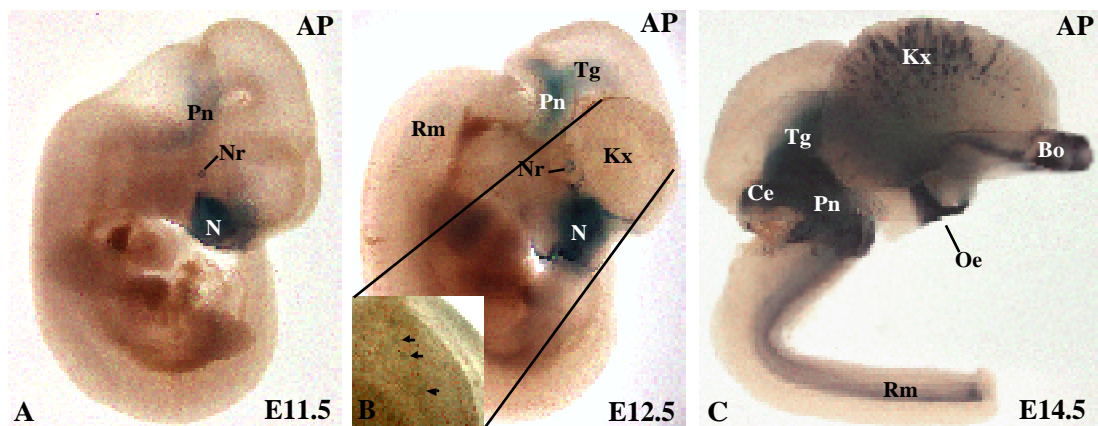


Abbildung 7

Das *telencephalon-Cre* Expressionsmuster bei *telencephalon-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Mäusen. (A) Bei E11.5 kann die *hPLAP*-Färbung in der Nasenhöhle, dem Pons und der Neuroretina detektiert werden. (B) Ab E12.5 ist die Expression zusätzlich auch im Kortex und im Tegmentum des Mesencephalons sichtbar. Die Pfeile in der Vergrößerung von B zeigen auf *hPLAP* positive Zellen im Kortex. Die Expression im Rückenmark ist nur sehr schwach erkennbar. (C) Im isolierten Gehirn eines E14.5 Embryos wird deutlich, daß der Bulbus Olfactorius, die optoeminentiale Zone des Hypothalamus, das Cerebellum und der Pons *hPLAP* exprimieren. Abkürzungen: AP: *hPLAP*-Färbung; Bo: Bulbus Olfactorius; Ce: Cerebellum; Kx: Kortex; Pn: Pons; N: Nasenhöhle; Nr: Neuroretina; Oe: Optoeminentiale Zone; Rm: Rückenmark; Tg: Tegmentum.

Bei E11.5 kann die hPLAP-Färbung in *telencephalon-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Mäusen in der Nasenhöhle, in der Neuroretina und im Pons des Mesencephalons detektiert werden (Abb. 7 A). Diese Expression wird auch bei E12.5 beibehalten, wobei zusätzlich eine Expression im Tegmentum und Kortex evident wird. Die *hPLAP*-Expression im Kortex zeigt sich nur vereinzelt in kortikalen Vorläuferzellen in einem schwachen Muster, das in der Vergrößerung durch Pfeile hervorgehoben ist (Abb. 7 B). Diese Kortex-Expression wird deutlicher bei E14.5. Dann sind auch die postmitotischen Zellen des Kortex, die zwar nicht mehr *Cre*, aber aufgrund der erfolgten Rekombination *hPLAP* exprimieren, gefärbt. Man kann deutliche separierte Zellklone sehen, die auf eine CRE-positive Vorläuferzelle zurückgehen. In Abbildung 7 C wurde ein E14.5 isoliertes Gehirn dargestellt, so daß die schwache hPLAP-Färbung im Rückenmark dokumentiert werden konnte. Desweiteren sind Pons und Cerebellum hPLAP positiv. Mit Hilfe von transversalen Gefrierschnitten konnte aber gezeigt werden, daß die hPLAP-Färbung des Rückenmarks auf Axone zurückzuführen ist, die sich vom Gehirn in das Rückenmark erstrecken (Daten nicht gezeigt). Die *hPLAP*-Expression in der optoemientialen Zone des Hypothalamus und des Bulbus Olfactorius sind bei E14.5 deutlich ausgeprägt (Abb 7 C). Das dokumentierte *hPLAP*-Expressionsmuster entspricht Teilen der in der Einleitung beschriebenen *Pax6*-Expression (Walther und Gruss, 1991; Puelles und Rubenstein, 1993). Da aber nur wenige Vorläuferzellen im Kortex der transgenen Mäuse CRE-Aktivität haben, konnte diese Mauslinie nicht genutzt werden, um die Auswirkungen der *Pax6*-Überexpression auf die Morphologie des gesamten Kortex zu untersuchen. Dennoch kann diese Mauslinie zur Analyse der Zelllinien, die aus *Pax6* positiven Vorläuferzellen entstehen, genutzt werden. Auch könnte sie für eine konditionelle Inaktivierung von *Pax6* in den CRE-rekombinierten Bereichen wie Cerebellum, Tegmentum des Mesencephalons oder in der optoemientialen Zone ermöglichen. Wie die Ergebnisse ebenfalls zeigen, ist das Promotorelement, das die *Pax6*-Expression im Kortex steuert, noch nicht gefunden.

2.1.3 Sequenzuntersuchung von *Pax6*

Eine Möglichkeit, funktionelle Segmente in nicht kodierender DNA zu identifizieren, bietet der Vergleich homologer Sequenzen verschiedener Arten (Hardison, 2000).

Das *Pax6*-Gen ist im gesamten Tierreich konserviert und konnte aus so verschiedenen Organismen wie der Maus (Walther und Gruss, 1991), der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Quiring et al., 1994) und sogar dem Kopffüßler *Loligo opalescens* (Tomarev et al., 1997) isoliert werden. Funktionelle Analysen konnten auch zeigen, daß es sich bei den gefundenen *Pax6* Genen um echte Homologe handelt. Deswegen konnte das Programm VISTA (Mayor et al., 2000) benutzt werden, um den genomischen Locus von *Pax6* des Menschen mit dem der Maus zu vergleichen. Dabei wurde mit Hilfe des Programmes zunächst ein Sequenzvergleich erstellt, der gleiche Basen gegenüber stellt.

Pax6 Sequenzvergleich

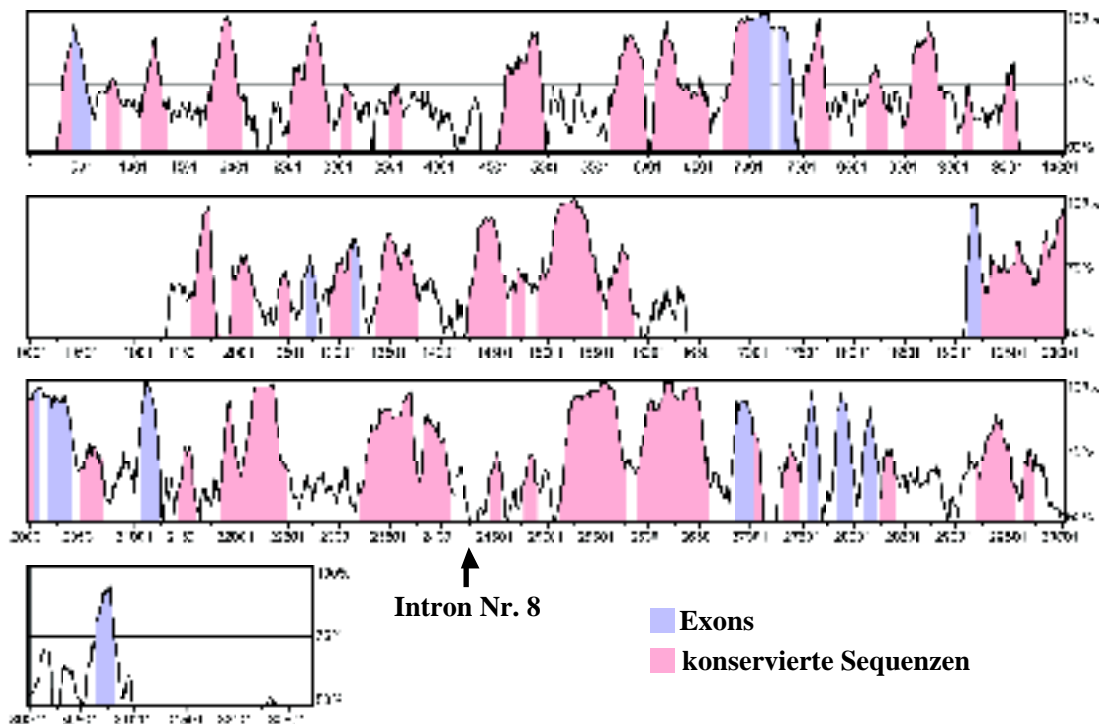


Abbildung 8

Sequenzvergleich zwischen dem *Pax6* Locus des Menschen und der Maus. Die Exons sind mit blau, konservierte Sequenzen mit rosa angezeigt. Auf der Abszisse sind die Basenpaare durchnummeriert und die Ordinate zeigt den Anteil der identischen Basen in Prozent, bei 50% beginnend. Das achte Intron von *Pax6* wurde mit einem Pfeil markiert.

Anschließend wurde für je 50 Basenpaare der Anteil identischer Basen berechnet und in Prozent auf der Ordinate des Diagrammes in der Abbildung 8 eingetragen. Die Abszisse zeigt die Anzahl der Basenpaare des *Pax6* Locus der Maus. Die Exonsequenzen von *Pax6* wurden mit blau, die gefundenen konservierten Regionen mit rosa markiert. Auf diese Weise konnte im achten Intron, das zwischen dem Exon Nr.7 und Nr.8 liegt, ein prozentualer Anteil identischer Basen von 50% bis 100% je 50 Basenpaare gefunden werden. Diese starke Konservierung eines nicht kodierenden Bereiches deutet auf eine mögliche Regulationsfunktion der DNA-Sequenz hin. Deswegen wurden transgene Mäuse generiert, die ein Reportergen unter der Kontrolle des achten Introns haben, um diese Möglichkeit zu überprüfen. Das 5630 bp große achte Intron des *Pax6* Locus wird im folgenden als *I8* Element bezeichnet.

2.1.4 Generierung transgener Mauslinien mit dem *I8*-Element

Zur Identifizierung potentieller Regulationselemente im *I8* Element von *Pax6* *in vivo* wurden transgene Mauslinien generiert, die das Reportergen *gfp* unter Kontrolle des achten Introns im Genom integriert haben. Um Hinweise auf frühe Expressionen im Mausembryo zu erhalten, wurde *gfp* zusammen mit der CRE-Rekombinase und einer *IRES* (internal ribosomal entry site) verwendet. Die *IRES*-Sequenz sollte die gleichzeitige Translation von CRE und des Reporterproteins GFP von einer einzigen bicistronischen mRNA ermöglichen.

Als erstes wurde der P0-Minimalpromotor von *Pax6* durch PCR mit den Primern P6.13revP und P6.14forN und dem Plasmid p6sg21 amplifiziert und in die PstI

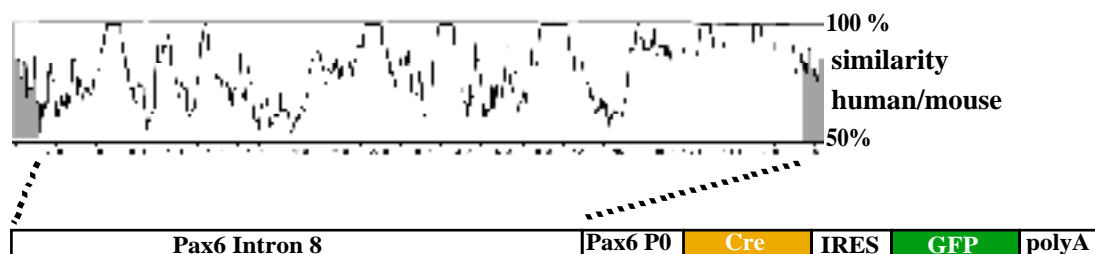


Abbildung 9

Das *I8*-Konstrukt. Die Graphik zeigt den Anteil identischer Basen des Menschen und der Maus in Prozent, bei 50% beginnend. Die Enhancer im *I8*-Element dirigieren die Expression von *Cre* und *gfp* vom P0-Promotor. Die *IRES* Sequenz erlaubt die gleichzeitige Translation von CRE und GFP von einer einzigen bicistronischen mRNA.

und NheI Spaltstellen des Plasmids ps11180-Cre-IRES-gfp-intron-pA kloniert. Das Plasmid wurde mit ps11180-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA benannt. Das *I8*-Element von *Pax6* wurde anschließend in zwei Schritten vor den P0 Promotor kloniert: Der erste Teil wurde aus dem Plasmid p6sg22 (Walther und Gruss, 1991) mit den Primern P6.32SfiI und P6.30NheI amplifiziert, in den Klonierungsvektor pT-Adv inseriert und dann mit NotI und NheI in die entsprechenden Spaltstellen von ps11180-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA kloniert. Anschließend wurde der zweite Teil mit den Primern P6.25F und P6.28R mit genomischer PCR vervielfältigt, mit XbaI gespalten und in die NheI-Spaltstelle inseriert. Das resultierende Konstrukt, ps11180-I8-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA, wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Mit dem *I8*-Konstrukt, das als SfiI-Fragment aus dem Plasmidvektor ps11180-I7-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA isoliert wurde, wurden transgene Mäuse generiert (siehe 2.1.1). Die DNA aus den resultierenden F0-Mäusen wurde aus Biopsien der Schwanzspitze isoliert und transgene Mäuse durch PCR auf dem integrierten *gfp*-Gen nachgewiesen (siehe Material und Methoden). Hierüber wurden schließlich drei transgene Mauslinien etabliert, die das Transgen stabil auf die Nachkommen vererben. Mit Hilfe der Fluoreszenz, die das GFP-Reporterprotein vermittelt, wurde die Expression des *gfp* und somit die Expressionsregulation des *I8*-Elementes von *Pax6* analysiert.

2.1.5 Das *I8*-Element dirigiert spezifische Expression im sich entwickelnden Embryo der Maus

Mit dem *I8*-Konstrukt konnten drei stabile transgene Mauslinien generiert werden. Eine Mauslinie zeigte weder *gfp*-, noch *Cre*-Expression. Die anderen beiden Mauslinien haben ein identisches Expressionsmuster und werden daher in der weiteren Beschreibung nicht näher unterschieden. Durch Kreuzung dieser *I8-Cre* Mäuse mit *Z/AP*-Reportertermäusen (Lobe et al., 1999) konnte eine ubiquitäre Rekombination schon E8.5, ausgelöst durch die CRE-Rekombinase, nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine sehr frühe *Cre* Expression hin, da im weiteren Verlauf der Entwicklung das *gfp*- und durch die *IRES* auch das *Cre*-Expressionsmuster spezifisch wird. Eine *gfp*-Expression zwischen E1.5 bis E2.5 und E6.5 bis E8.0 konnte aber nicht nachgewiesen werden.

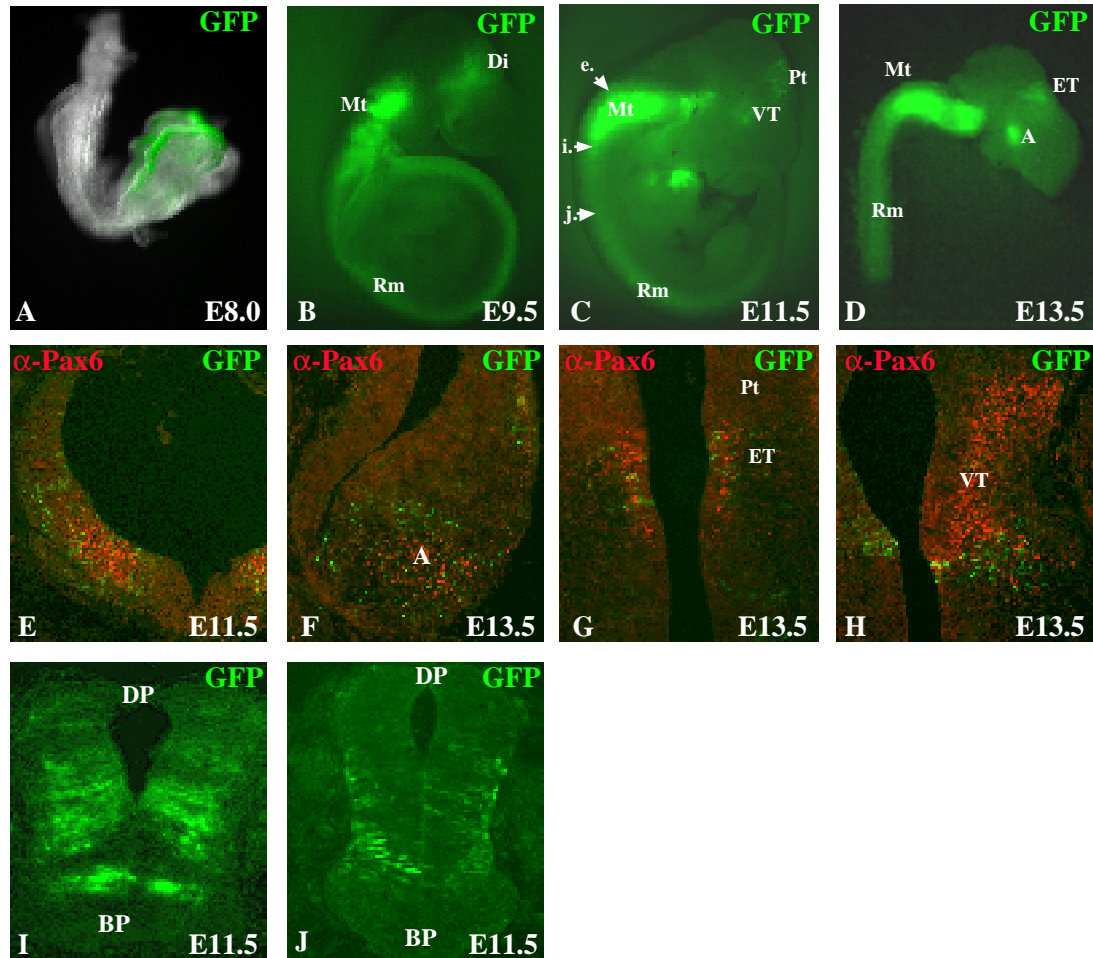


Abbildung 10

GFP-Fluoreszenz in *18-Cre* transgenen Mäuseembryonen. (A) Die GFP-Fluoreszenz startet E8.0 in der ventralen Kopffalte. (B) Bei E9.5 ist die Expression im Rückenmark, in Metencephalon und im Diencephalon sichtbar. (C) Die Expression im Diencephalon spezifiziert sich E11.5 im ventralen Thalamus und Prätektum. e. i. und j. zeigen die Schnittebenen an, deren transversale Gefrierschnitte in E, I und J dargestellt werden. Bei D wurde das zentrale Nervensystem E13.5 isoliert. Es zeigt eine zusätzliche GFP-Fluoreszenz in der Amigdala. In E bis H wurden *Pax6* positive Zellen immunhistochemisch rot markiert. Dadurch wurde die Koexpression von *Pax6* (rot) und *gfp* (grün) in Metencephalon E11.5 (E), in der Amigdala E13.5 (F), im Epithalamus E13.5 (G) und im ventralen Thalamus (H) gezeigt. In I und J sind Gefrierschnitte durch das Rückenmark gezeigt, wobei die Schnittebene von I rostral von der in J liegt. Die *gfp*-Expression reflektiert die bekannte *Pax6*-Expression im Rückenmark. Abkürzungen: A: Amigdala; BP: Bodenplatte; Di: Diencephalon; DP: Dachplatte; ET: Eminentia Thalami; Pt: Prätektum; Mt: Metencephalon; Rm: Rückenmark; VT: Ventral Thalamus.

Die Fluoreszenz des GFP-Reporterproteins startet E8.0 in der dorsalen Kopffalte, in der auch das endogene *Pax6* exprimiert ist (Abb. 10 A; Walther und Gruss, 1991). Bei E9.5 wird die Expression von *gfp* im Rückenmark, im Metencephalon und in der Anlage des Thalamus sichtbar (Abb. 10 B). Die Expression wird bei E11.5 beibehalten (Abb. 10 C). Um die Expression im sich entwickelnden Rückenmark und Metencephalon zu verdeutlichen, wurden 12µm Gefrierschnitte eines E11.5 Tage alten Embryos angefertigt, die den Embryo transversal schneiden. Die Schnittebenen sind in Abbildung 10 C mit Pfeilen markiert. Die Buchstaben e., i. und j. stehen für die Darstellung des Schnittes in Abbildung 10 E, I bzw. J. In beiden Schnitten I und J ist die GFP-Fluoreszenz in der dorsalen und der ventralen Rückenmarksreihe zu sehen. Diese reflektiert die bekannte Expression von *Pax6* (Walther und Gruss, 1991). Die Dachplatte und die Bodenplatte des Rückenmarks, die *Pax6* nicht exprimieren, zeigen auch keine GFP-Fluoreszenz. Um das Expressionsmuster von GFP für E13.5 zu analysieren, wurde das zentrale Nervensystem des Embryos isoliert (Abb. 10 D). Es wurde GFP-Fluoreszenz erneut im Rückenmark und im Metencephalon gefunden. Zusätzlich konnte die Expression von *gfp* in der Amigdala und im Epithalamus dokumentiert werden.

Um die Koexpression von *gfp* und *Pax6* zu analysieren wurden weitere transversale Gefrierschnitte angefertigt und mit Pax6-Antikörpern immunhistochemisch behandelt (Abb. 10 E, F, G und H). So konnte eine Koexpression im Metencephalon (E), in der Amigdala (F), im ventralen Thalamus (G) und im Epithalamus (H) gezeigt werden. Das Expressionsmuster des Reportergens *gfp* entspricht somit Teilen der Pax6 Expression. Mit dem *I8*-Element wurde somit ein neues Regulationselement von *Pax6* gefunden. Aufgrund der ubiquitären CRE-Rekombination, die schon E8.5 gefunden wurde, konnte diese Mauslinie aber nicht zur konditionalen Überexpression von *Pax6* genutzt werden.

2.1.6 Generierung transgener Mauslinien mit dem *E1-ngn2*-Element

Für die gewebespezifische Steuerung der CRE-Rekombinaseaktivität in den *Pax6* positiven Vorläuferzellen des Kortex wurde das *E1-ngn2* Element ausgewählt (Scardigli et al., 2001). Dieses Element ist eines von 4 Elementen des *ngn2* Gens, die Expression im zentralen Nervensystem der Maus steuern. Auch konnte

gezeigt werden, daß das *E1-ngn2* Element von dem *Pax6*-Transkriptionsfaktor im Kortex der Maus reguliert wird (Scardigli et al. 2001). Somit ist das *E1-ngn2* Element auch in den Zellen des Kortex aktiv, in denen das *Pax6* Gen exprimiert wird.

Das 1786 bp große *E1-ngn2* Fragment wurde zusammen mit dem β -globulin Minimalpromotor mit NotI und PstI aus dem Plasmid pE1- β -globulin (Scardigli et al., 2001) herausgespalten und in die entsprechenden Spaltstellen von psl1180-Cre-IRES-gfp-intron-pA kloniert. In dem resultierenden Plasmid dirigiert das *E1-ngn2* Element mit Hilfe der *IRES*-Sequenz die gleichzeitige Expression von *Cre* und *gfp*. Es wird im folgenden als pE1-ngn2-Cre bezeichnet.

Das *E1-ngn2-Cre*-Konstrukt wurde als SfiI-Fragment aus dem Plasmidvektor pE1-ngn2-Cre herausgespalten, elektrophoretisch isoliert und über Elektroelution und P-30-Säulen für die Mikroinjektion aufgereinigt. Das aufgereinigte Konstrukt wurde mittels Mikroinjektion für die Generierung transgener Mauslinien benutzt (siehe 2.1.1). Die DNA aus den resultierenden F0-Mäusen wurde aus Biopsien der Schwanzspitze isoliert und über PCR auf dem *Cre*-Gen als transgen identifiziert (siehe Material und Methoden). Hierüber wurde schließlich eine transgene Mauslinie etabliert, die das Transgen stabil auf die Nachkommen vererbte. Die durch das GFP-Reporterprotein vermittelte Fluoreszenz erlaubte die Identifizierung transgener Embryonen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Binokulars.

2.1.7 Die *E1-ngn2-Cre* Mauslinie besitzt CRE-Rekombinaseaktivität in spezifischen Regionen des zentralen Nervensystems

Zunächst wurde die Expressionsdynamik des *E1-ngn2-Cre*-Transgens über die durch das *gfp*-Reporterprotein vermittelte Fluoreszenz analysiert. Diese entsprach wie erwartet dem *lacZ*-Expressionsmuster der von Raffaella Scardigli und Mitarbeitern veröffentlichten *E1::lacZ* transgenen Mäusen (Scardigli et al. 2001) (Abb. 11 B). Um die zeitlich-räumliche Dynamik der durch das *E1-ngn2-Cre*-Transgen dirigierten CRE-Aktivität zu ermitteln, wurde *E1-ngn2-Cre* in die *Cre*-Reporterlinie *Z/AP* eingekreuzt (Abb. 7; Lobe et al., 1999).

Über die histochemische Detektion von hPLAP-Aktivität (Lobe et al., 1999) in ganzen *E1-ngn2-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Embryonen und auf transversalen Gefrierschnitten wurde die durch *E1-ngn2-Cre* dirigierte CRE-Rekombinase-

aktivität analysiert. In *E1-ngn2-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Embryonen setzt die *hPLAP*-Expression E9.0 vereinzelt im Neuralrohr ein und wird bis E9.5 konsistent (Abb. 11 A bzw. nicht gezeigt). Somit setzt die *hPLAP*-Expression etwa zur gleichen Zeit wie die *gfp*-Expression ein (nicht gezeigt), was auf eine rasche Kinetik der CRE vermittelten Rekombinaseaktivität in der *E1-ngn2-Cre*-Linie hinweist. Die *hPLAP*-Expression ist im Rückenmark, im Mesencephalon, Diencephalon und im lateralen Kortex zu beobachten, aber zu keinem Zeitpunkt in irgendeinem anderen Gewebe außerhalb des zentralen Nervengewebes (Abb. 11). Dies wurde zusätzlich mit der *floxed ROSA* Maus getestet (Mao et al., 1999). Diese Reporterlinie besitzt einen loxP-flankierten *ROSA* Lokus, der durch CRE-Rekombinaseaktivität die beiden Antibiotikaresistenzen für Ganciclovir und Puromycin aus dem Genom herauspaltet und stattdessen das *lacZ*-Reportergen anschaltet. Das *lacZ*-Expressionsmuster, das durch Kreuzung von *E1-ngn2-Cre* mit *floxed ROSA* Mäusen erhalten wurde, war identisch mit dem *hPLAP*-Expressionsmuster nach Kreuzung mit *Z/AP* (Abb 11 D).

Zur genaueren Untersuchung der *hPLAP*-Aktivität wurden 14µm Gefrierschnitte von *E1-ngn2-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Embryonen angefertigt. Im E12.5 Telencephalon konnte die *hPLAP*-Aktivität im lateralen Kortex, in der Eminentia

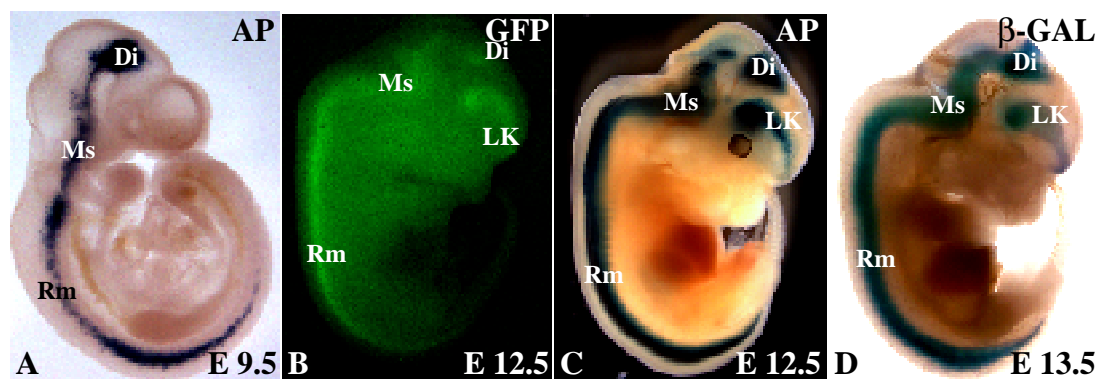


Abbildung 11

Das *E1-ngn2-Cre* Transgen. (B) GFP-Fluoreszenz in E12.5 Mausembryonen und die vermittelte CRE-Rekombinaseaktivität im zentralen Nervensystem. Histochemischer Nachweis von *hPLAP*-Aktivität in ganzen *E1-ngn2-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Mausembryonen E9.5 (A) und E12.5 (C). Bei E9.5 ist die *hPLAP*-Aktivität im Rückenmark, im Mesencephalon und im Diencephalon, bei E12.5 noch zusätzlich im lateralen Kortex zu detektieren. (D) Histochemischer Nachweis von *lacZ*-Aktivität in ganzen *E1-ngn2-Cre; floxed ROSA* doppelt transgenen Mausembryonen E13.5. Die *lacZ*-Aktivität in *E1-ngn2-Cre; floxed ROSA* ist identisch mit der *hPLAP*-Aktivität in *E1-ngn2-Cre; Z/AP* Transgenen. Abkürzungen: Rm: Rückenmark; Di: Diencephalon; Ms: Mesencephalon; LK: lateraler Kortex.

Thalami, in der Amigdala, sowie im dorsalen und ventralen Thalamus des Diencephalons detektiert werden (Abb. 12 A-C). Im Rückenmark wurde die hPLAP-Aktivität in der ventralen Rückenmarksreihe detektiert (Abb. 12 D). Nach E13.5 weitet sich die *hPLAP*-Expression vom lateralen Kortex dorsal im Kortex aus, so daß bei E15.5 eine deutliche hPLAP-Färbung der subventrikulären Zone als auch der postmitotischen Zellen in der Kortexplatte zu sehen ist. Auch der Epithalamus und das Prätektum zeigen bei E15.5 hPLAP-Aktivität. Dieses Expressionsmuster wird auch E18.5 und in adultem Gehirn beibehalten. In dem sagitalen Gefrierschnitt von E18.5 ist auch die hPLAP-Aktivität im Pons und im Bulbus Olfactorius zu sehen (Abb. 12 H).

2.2 Generierung einer transgenen Mauslinie zur *Pax6*-Überexpression nach erfolgter CRE-Rekombination

Für eine konditionale Überexpression sind zwei transgene Mauslinien notwendig: eine *Cre*-Mauslinie, die die CRE-Rekombination in spezifischen Zellen dirigiert und eine Mauslinie, die ausschließlich nach der *Cre*-Rekombination *Pax6* überexprimiert.

2.2.1 Das pJoP6 Konstrukt

Für die konditionale Überexpression von *Pax6* ist ein Konstrukt nötig, das durch CRE-Rekombination eine gefloxtete Stop-Kassette herauspaltet und dadurch das *Pax6* Gen angeschaltet wird. So wurde das pJoP6 Konstrukt kloniert, das einen starken Fusionspromotor aus dem *CMV*-Promotor und dem *β -actin*-Promotor des Huhns (Niwa et al., 1991) enthält, der im ungeflochten Zustand das *gfp*-Reporter gen anschaltet. Zwei *polyA*-Signale liegen 3'-Strich vom *gfp*-Reporter und schalten so die Transkription nach dem *gfp*-Reporter aus. Diese *gfp-polyA*-Kassette ist von zwei *loxP* Sequenzen flankiert, durch die diese Kassette durch CRE-Rekombination herausgespalten werden kann. Nach der Rekombination wird vom selben Fusionspromotor das *Pax6* Gen und, über die *IRES* Sequenz, ein weiterer Reporter, *lacZ*, angeschaltet (Abb. 13).

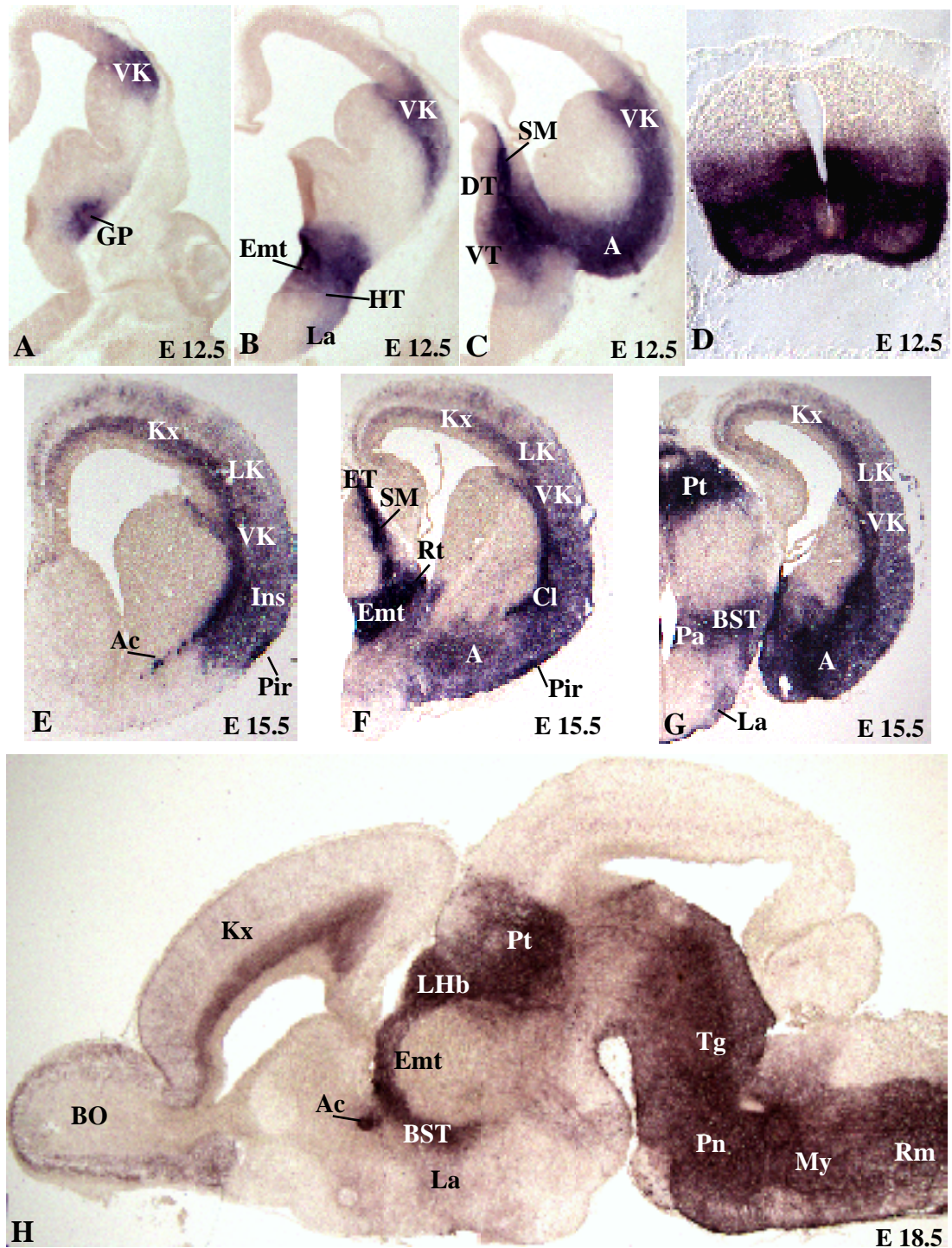


Abbildung 12

E1-ngn2-Cre vermittelte CRE-Rekombinaseaktivität im zentralen Nervensystem. Histochemischer Nachweis von hPLAP-Aktivität auf 14µm transversalen Gefrierschnitten von *E1-ngn2-Cre; Z/AP* doppelt transgenen Mausembryonen. (A und B) Bei E12.5 ist die hPLAP-Aktivität in Telencephalon, im ventralen Kortex, in der Amigdala, im Globus Pallius und im lateralen Amigdaloiden Nucleus zu detektieren. (C) Im E12.5 Diencephalon ist die Aktivität im Hypothalamus, ventralen Thalamus, in der Stria Medularis Region des Thalamus und in der Eminentia Thalami zu erkennen. (D) Im E12.5 Rückenmark wird die ventrale Rückenmarksreihe durch hPLAP-Aktivität blau gefärbt. (E) Mit

zunehmender Entwicklung nach E15.5 erweitert sich die hPLAP-Aktivität im Kortex, so daß der gesamte Kortex mit der ventralen, lateralen und insularen sowie der piriformen Region bis hin zur anterioren Commissure betroffen ist. (F und G) Im Diencephalon ist die hPLAP-Aktivität zusätzlich im retikularen Nucleus, im Prätektum, im paraventrikularen Nucleus des Hypothalamus und im Nucleus Stria Terminalis zu detektieren. In H wurde ein sagitaler Gefrierschnitt dargestellt, der die oben genannten Aktivitätsdomänen für E18.5 nochmals zeigt. Desweiteren wird hier die *hPLAP*-Expression im Bulbus Olfactorius, sowie dem Tegmentum, dem Pons, dem Myelencephalon und dem Rückenmark gezeigt. Abkürzungen: A: Amigdala; Ac: Anterior Commissure; BO: Bulbus Olfactorius; BST: Nucleus Stria Terminalis; Cl: Claustrum; DT: Dorsaler Thalamus; Emt: Eminentia Thalami; ET: Epithalamus; GP: Globus Pallius; HT: Hypothalamus; Ins: Insularkortex; Kx: Kortex; La: Lateral Amigdaloid Nucleus; LHb: Lateral Habenular Nucleus; LK: Lateraler Kortex; My: Myelencephalon; Pa: Paraventrikularer Hypothalamus Nucleus; Pir: Piriformkortex; Pn: Pons; Pt: Prätektum; Rm: Rückenmark; Rt: Retikularer Nucleus; SM: Stria Medularis des Thalamus; Tg: Tegmentum; VK: Ventraler Kortex; VT: Ventraler Thalamus.

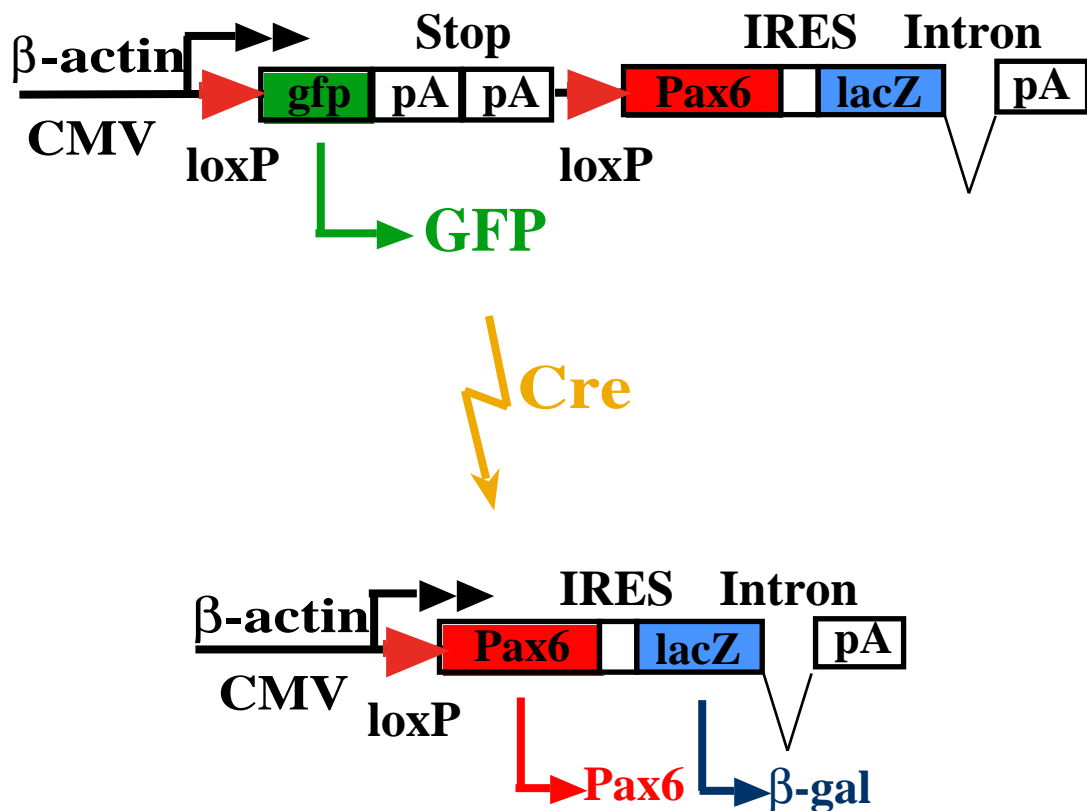


Abbildung 13

Das Prinzip der konditionalen Überexpression mit Hilfe des Cre-loxP-Systems. Das Konstrukt pJoP6 besitzt einen Fusionspromotor aus *CMV* und *β-actin* (Niwa et al., 1991), der die Expression von *gfp* steuert. Durch CRE-Rekombination läßt sich die *gfp-PolyA-PolyA*-Kassette herausspalten, so daß anschließend *Pax6* und über die *IRES* Sequenz auch *lacZ* exprimiert wird.

Die Klonierung von pJoP6 wurde folgendermaßen durchgeführt: Mit den Primern GF1 und GR2 wurde auf dem pIRES-eGFP Plasmid (Clontech) eine PCR durchgeführt, die eine Fusion aus einer loxP-Sequenz gefolgt von *gfp-PolyA* amplifiziert. Diese Kasette wurde mit EcoRI in die EcoRI-Spaltstelle von pCAGGS (Niwa et al., 1991) kloniert. So wurde das Plasmid pJojo1 erhalten. Anschließend wurde in die PstI und HindIII Spaltstelle ein hybridisiertes Linkerfragment aus den Oligonukleotiden Linkera und Linkerb eingefügt, das die Spaltstellen XhoI und NotI enthält. In diese XhoI und NotI Spaltstelle von pJojo2 wird ein zweites hybridisiertes Linkerfragment aus den Oligonukleotiden flox1 und flox2, mit der zweiten *loxP* Sequenz eingefügt. Dies ist das Plasmid pJojo3. Als nächstes wurde aus dem Plasmidvektor pKC253 die *IRES* und das *LacZ* Leseraster mit XhoI und NotI herausgespalten und in XhoI und NotI von pJojo3 kloniert. In das resultierende Plasmid pJojo4 wurde in die XhoI Spaltstelle die cDNA von *Pax6* inseriert. Das resultierende Konstrukt wurde mit pJoP6 benannt.

Um die Funktionalität des pJoP6-Konstruktes zu testen, wurde das Konstrukt in COS Zellen transformiert und die GFP-Fluoreszenz nachgewiesen (Abb. 14 A). Anschließend wurde pJoP6 in den *E. Coli* Stamm 294-*Cre* transfiziert (Buchholz et al., 1996). Dieser *E. coli* Stamm exprimiert *Cre*, so daß man nach der Transformation mit pJoP6 das mit CRE rekombinierte Plasmid erhält, das pJoP6C genannt wurde. Auch mit pJoP6C wurden COS Zellen transfiziert und eine X-Gal-Färbung durchgeführt, um die Funktionalität des zweiten Reportergens *lacZ* nachzuweisen (Abb. 14 B). Um die Expression des *Pax6* zu zeigen, wurde ein Western-Blot angefertigt (Abb. 14 C). Die erste Reihe des Western-Blottes enthält den Proteinstandard. Die zweite Reihe enthält die Positivkontrolle mit PAX6-Protein, das durch Transfektion von COS Zellen mit dem *Pax6*-Expressionsplasmid pCMV-Pax6 (L. St.-Onge, dieses Labor) erhalten wurde. Die dritte Reihe wurde mit Proteinextrakt der Transfektion mit pJoP6 und die vierte Reihe mit Proteinextrakt der Transfektion mit pJoP6C beladen (Abb. 14 C). Als primärer Antikörper im Western-Blot wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen benutzt, der gegen PAX6-Protein gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper war mit einer Peroxidase markiert, so daß das PAX6-Protein mit Hilfe der Antikörper über eine Substratoxidation nachgewiesen wurde.

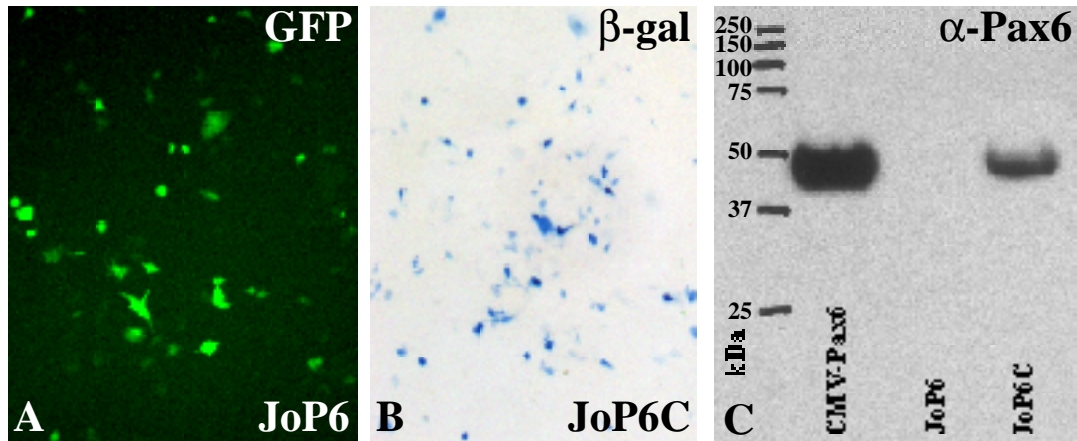


Abbildung 14

Das pJoP6 Konstrukt in COS Zellen. (A) COS Zellen wurden mit pJoP6-DNA transfiziert und am folgenden Tag auf GFP-Fluoreszenz getestet. Das rekombinierte Konstrukt pJoP6C wurde in COS Zellen transfiziert und die Zellen nach 24 h mit X-Gal gefärbt. (B) Die Blaufärbung zeigt die Anwesenheit von β -Galaktosidase in den Zellen an. (C) Western-Blot mit Pax6-Antikörper. In der ersten Reihe wurde der Proteinstandard und in der zweiten Reihe ein Proteinextrakt aus COS Zellen, die mit pCMV-Pax6 transfiziert wurden, aufgetragen. Die dritte Reihe enthält Proteinextrakt aus COS Zellen, die mit pJoP6 transfiziert wurden und die vierte Reihe Proteinextrakt aus COS Zellen, die mit pJoP6C transfiziert wurden. Die beiden Banden in der zweiten und in der vierten Reihe weisen die Anwesenheit von PAX6-Protein nach.

2.2.2 Generierung der transgenen Mauslinie *JoP6*

Die Insert-Kassette aus dem Plasmid pJoP6 wurde mit SalI herausgespalten und isoliert (siehe 2.1.1). Nach dem Aufreinigen wurde die DNA mittels Mikroinjektion in den männlichen Pronukleus befruchteter Eizellen injiziert und transgene Mäuse generiert. Durch GFP-Fluoreszenz wurden schließlich zwei transgene Linien isoliert, von denen die eine Mauslinie aufgrund der stärkeren GFP-Fluoreszenz für die weiteren Experimente ausgewählt wurde. Von einem E13.5-Mausembryo der Linie *JoP6* wurde das Gehirn isoliert und die GFP-Fluoreszenz in den verschiedenen Gehirnregionen nachgewiesen (Abb. 15). Heterozygote *JoP6* Mäuse sind lebensfähig und phänotypisch identisch zu Wildtyp-Mäusen desselben Wurfs.

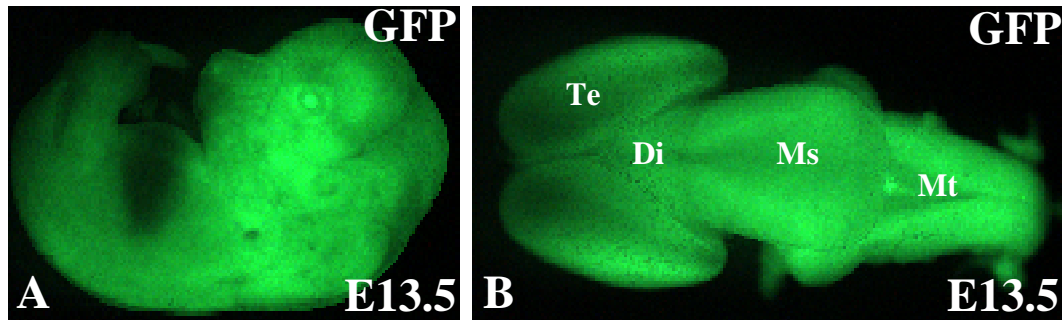


Abbildung 15

GFP-Fluoreszenz eines E13.5 *JoP6* transgenen Mausembryos. (A) GFP-Fluoreszenz im ganzen Mausembryo. (B) GFP-Fluoreszenz des isolierten Gehirnes. Abkürzungen: Di: Diencephalon; Ms: Mesencephalon; Mt: Metencephalon; Te: Telencephalon.

2.3 *Pax6*-Überexpression in spezifischen Zellen des Kortex induziert Apoptose

2.3.1 *Pax6*-Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie

Zunächst wurde die *Pax6*-Überexpression mit der kürzlich veröffentlichten *Emx1-Cre* transgenen Mauslinie durchgeführt (Gorski et al., 2002). Im Kortex von *Emx1-Cre* transgenen Mäusen startet die Rekombination mit Hilfe von CRE E10.5 in den Vorläuferzellen und in den postmitotischen Projektions-Neuronen und betrifft so ca. 88% der Zellen des Kortex (Gorski et al., 2002). Um die CRE-Rekombination in *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgenen Mäusen zu überprüfen, wurden zunächst die Expression der beiden Reportergene *gfp* und *lacZ* untersucht. Die GFP-Fluoreszenz ist in *JoP6* einfach transgenen Mäusen zuverlässig zu erkennen. Nach der Rekombination durch die CRE-Rekombinase in *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgenen Mäusen ist die Fluoreszenz im Kortex weitestgehend ausgeschaltet, das der Rekombinationseffizienz der *Emx1-Cre* Mäuse entspricht (Abb. 16 A) (Gorski et al., 2002). Nur wenige Zellen, die vom Striatum in den Kortex einwandern oder von CRE negativen Zellen abstammen, zeigen weiterhin GFP-Fluoreszenz. Somit haben diese Zellen auch keine *Pax6*-Überexpression. Durch das *lacZ* Reportergen läßt sich das Telencephalon und der Bulbus Olfactorius blau färben (Abb. 16 C). Der Bulbus Olfactorius wird ebenfalls angefärbt, da Zellen im rostralen migratorischen Strom vom Kortex in den Bulbus einwandern. Sowohl das einfach *JoP6* transgene Kontrollgehirn, als auch die CRE

negativen Regionen des *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgenen Gehirns werden ebenfalls leicht im medialen Bereich angefärbt, da der Plexus Choroideus der Gehirnventrikel eine unspezifische Blaufärbung hat. Um die CRE Rekombination nachzuweisen wurde eine genomische PCR mit den Primern JoP6F und JoP6R durchgeführt. Diese Primer binden stromaufwärts bzw. stromabwärts von dem geflochtenen *gfp* Gen des *JoP6*-Konstruktes. Ist das *gfp* Gen integriert, wird ein DNA-Strang von 1831 bp amplifiziert. Ist das *gfp* Gen durch CRE Rekombination herausgespalten, so wird ein DNA-Strang von 249 bp amplifiziert. Für die Negativkontrolle wurde genomische DNA aus einem E14.5 Wildtyp-Gehirn isoliert und für die Positivkontrolle wurde das pJoP6 Plasmid benutzt. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA aus dem Kortex von *JoP6* einfach transgenen Mäusen isoliert. Um die erfolgte CRE Rekombination in *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgenen Mäusen zu testen wurde genomische DNA aus dem Kortex dieser Mäuse in der PCR eingesetzt. In den Kontrollen wurden die erwarteten DNA-Amplifikate von 1831 bp bzw. kein Amplifikat erhalten, während in der PCR mit der *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgenen Maus sowohl der 1831 bp, als auch der 249 bp lange DNA-Strang amplifiziert wurde (Abb. 16 D). Somit wurde die erfolgte CRE Rekombination im Genom der doppelt transgenen Tiere nachgewiesen.

Anschließend wurde überprüft, ob sich nach der erfolgten CRE-Rekombination auch das PAX6-Protein in kortikalen Zellen nachweisen läßt. Dazu wurden transversale 10µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, die mit Pax6-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt wurden. Im sich entwickelnden Kortex befindet sich die *Pax6*-Expression nur im proliferierenden Neuroepithelium (der ventrikularen und subventrikularen Zone). Obwohl das proliferierende Neuroepithelium bei E14.5 im *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgenen Kortex eine stärkere PAX6-Immunreaktivität zeigt als im *JoP6* einfach transgenen Kortex (Abb 17 A und B), ist eine ektopische *Pax6*-Expression in der kortikalen Platte nicht erkennbar. Dies ändert sich, nachdem die postmitotischen Tochterzellen der rekombinierten Vorläuferzellen im Stadium E18.5 durch die intermediäre Zone in die kortikale Platte eingewandert sind. In diesen Zellen konnte die ektopische *Pax6*-Überexpression mit Hilfe des Pax6-Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 17 E und H). Die

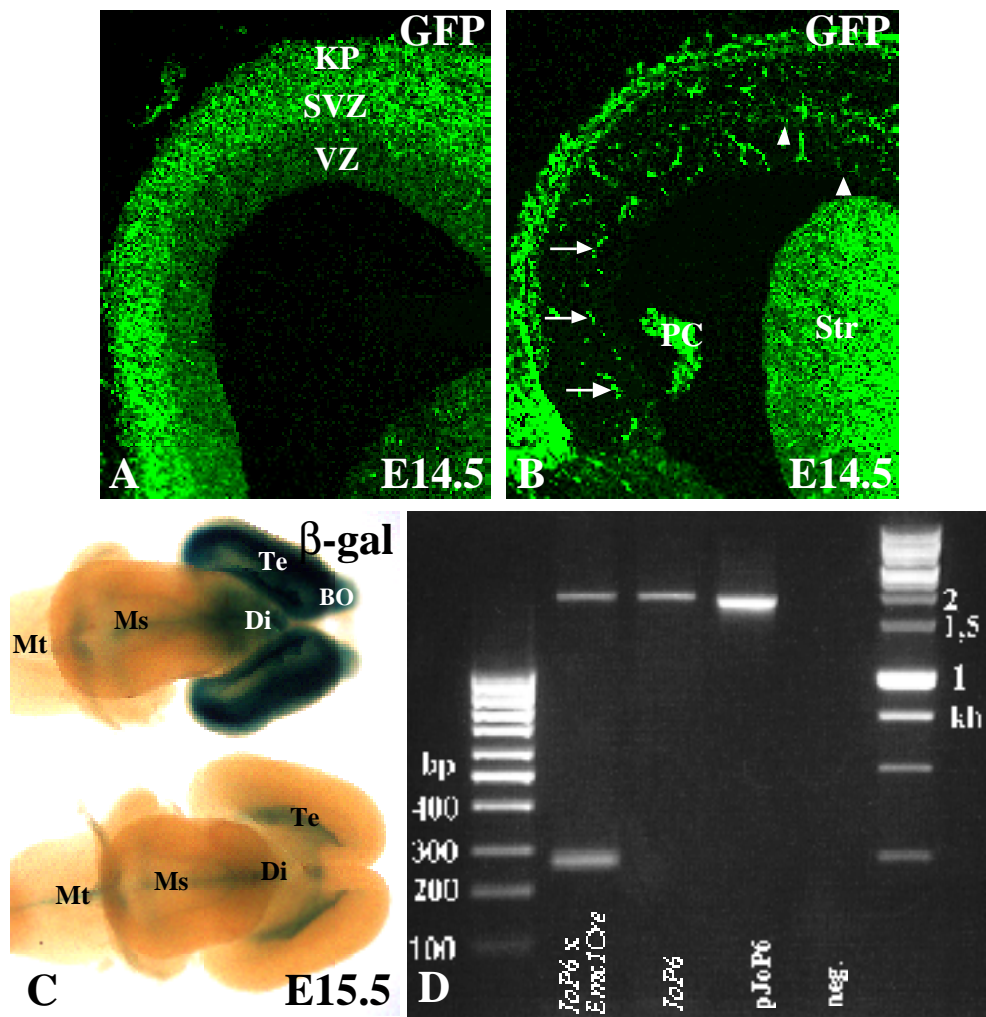


Abbildung 16

Testen der CRE-Rekombination in *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Mäusen. (A) Transversaler Gefrierschnitt durch den Kortex einer E14.5 *JoP6* einfach transgenen Maus mit GFP-Fluoreszenz. (B) Im Kortex der *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Maus ist diese GFP-Fluoreszenz auf transversalen Gefrierschnitten nicht zu sehen. Stattdessen sind die mit Pfeilen markierten Blutadern grün gefärbt. Einige grün fluoreszierende Zellen, die aus dem Striatum eingewandert sind oder nicht CRE positiv sind, wurden mit Pfeilköpfen markiert. (C) Die Expression des zweiten Reportergens *lacZ* wurde mit X-Gal gefärbten E15.5 Gehirnen überprüft. Das Telencephalon und der Bulbus Olfactorius des *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Gehirns sind blau gefärbt und kleiner (oben) im Vergleich zum *JoP6* einfach transgenen Gehirn (unten). Das Kontrollgehirn zeigt nur die unspezifische schwache Blaufärbung des Plexus Choroideus der einzelnen Ventrikel. (D) Genomische PCR mit den Primern *JoP6F* und *JoP6R*. Die DNA wurde isoliert aus: Wildtyp (*neg.*), *pJoP6* Plasmid, *JoP6* Kortex und *JoP6; Emx1-Cre* Kortex. Abkürzungen: BO: Bulbus Olfactorius; Di: Diencephalon; KP: Kortikale Platte; Ms: Mesencephalon; Mt: Metencephalon; PC: Plexus Choroideus; Str: Striatum; SVZ: Subventrikuläre Zone des Kortex; Te: Telencephalon; VZ: Ventrikuläre Zone des Kortex.

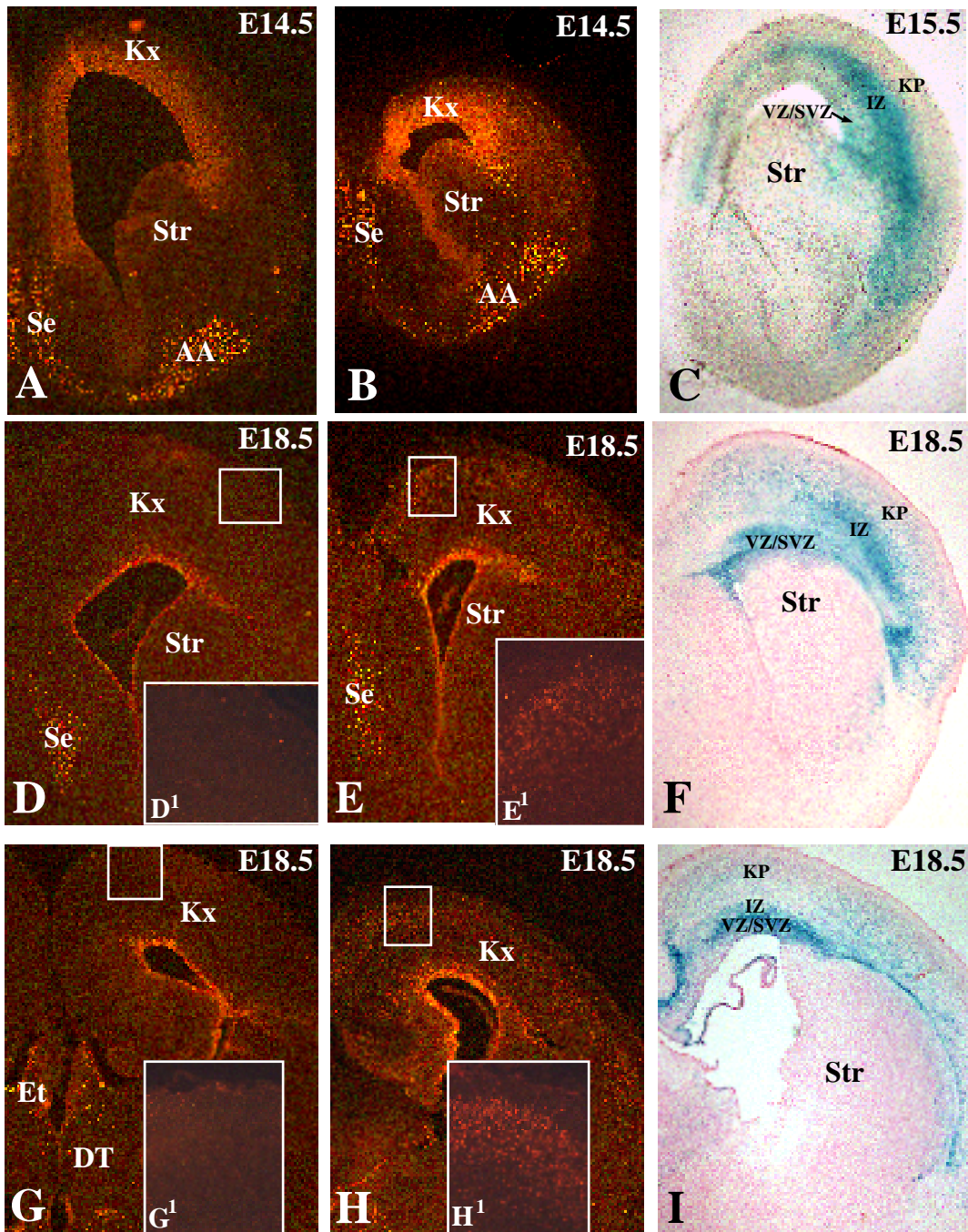


Abbildung 17

Nachweis von ektopischem PAX6 in der Kortikalen Platte nach *Pax6*-Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie. Transversale 10µm Gefrierschnitte, die mit Pax6-Antikörper (rot in A, B, D, E, G, H) bzw. X-Gal-Färbung (blau in C, F, I) behandelt wurden. Im E14.5 Kortex der *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Maus zeigt sich eine nur schwache Expression an ektopischem PAX6 in der kortikalen Platte (B) im Vergleich zum *JoP6* einfach transgenen Kortex (A). (C) X-Gal-Färbung eines E15.5 transversalen Gefrierschnittes einer *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Maus in der ventrikulären und subventrikulären Zone, sowie in der intermediären Zone. Im E18.5 Kortex der *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Maus ist die ektopische *Pax6*-Expression deutlich erkennbar (E, H) und in der Vergrößerung (E¹, H¹) dargestellt. (D) und (G) zeigen die Wildtyp-Expression von

Ergebnisse

Pax6. (F) und (I) X-Gal-Färbung von E18.5 transversalen Gefrierschnitten verdeutlichen die Koexpression von *Pax6* und *lacZ*. Abkürzungen: AA: Anteriore Amigdal; Et: Epithalamus; DT: Dorsaler Thalamus; IZ: Intermediäre Zone; KP: Kortikale Platte; Kx: Kortex; Se: Septum; Str: Striatum; SVZ: Subventrikuläre Zone; VZ; Ventrikuläre Zone.

Expression des *lacZ*-Reporters zeigt den selben Verlauf in der Entwicklung des Kortex. Wie in Abbildung 17 C dokumentiert, kann im Stadium E15.5 die *lacZ*-Expression nur in der proliferierenden und der intermediären Zone detektiert werden. Im späteren Stadium E18.5 können dagegen auch in der kortikalen Platte Zellen mit X-Gal gefärbt werden (Abb. 17 F und I).

Wie in Abbildung 17 ersichtlich, konnten auf E14.5 Gefrierschnitten wenige und auf E18.5 Gefrierschnitten viele ektopische, *Pax6* exprimierende Zellen in der kortikalen Platte detektiert werden. Der Vergleich zu Gefrierschnitten, die mit X-Gal gefärbt wurden, macht die Kolokalisation von PAX6 mit dem Reporterprotein β -Galaktosidase deutlich. Anschließend wurde die Expression des *Pax6*-Zielgens *ngn2* untersucht. Wie Scardigli und Mitarbeiter dargelegt haben, bindet der Transkriptionsfaktor *Pax6* an das *E1-ngn2*-Element von *ngn2* und schaltet es unter anderem im Kortex an (Scardigli et al., 2001). In Abbildung 18 ist eine nicht radioaktive *in-situ*-Hybridisierung mit *ngn2*-Probe dargestellt. Nach der *Pax6*-Überexpression durch die *Emx1-Cre* Mauslinie in *Pax6* positiven und negativen Vorläuferzellen, zeigen mehr Zellen eine *ngn2*-Expression (Abb 18 B).

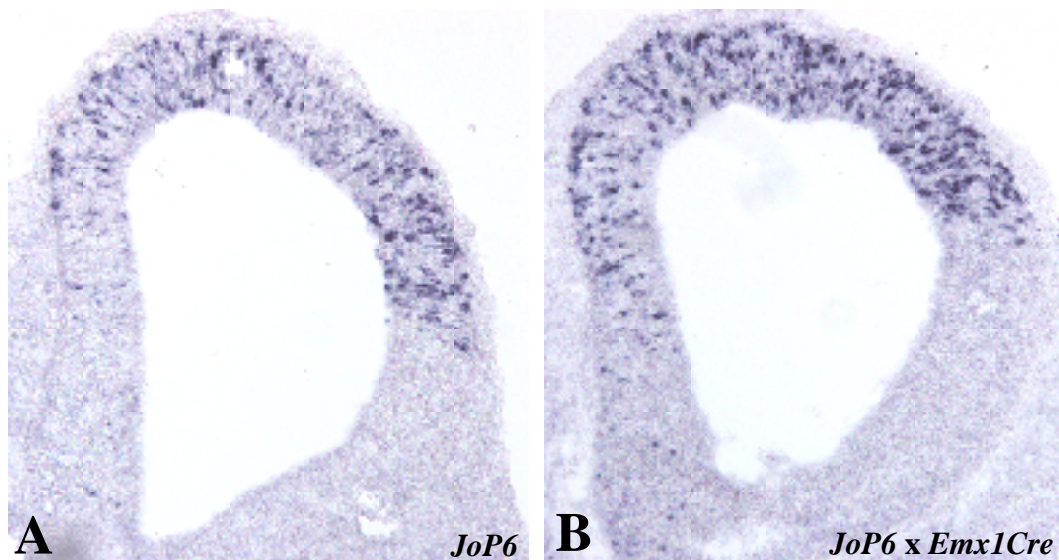


Abbildung 18

Die *ngn2*-Expression im Stadium E10.5 auf 16 μ m Gefrierschnitten detektiert mit *in-situ* Hybridisierung. (A) *JoP6* einfach transgener Kontrollkortex. (B) *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgener Kortex.

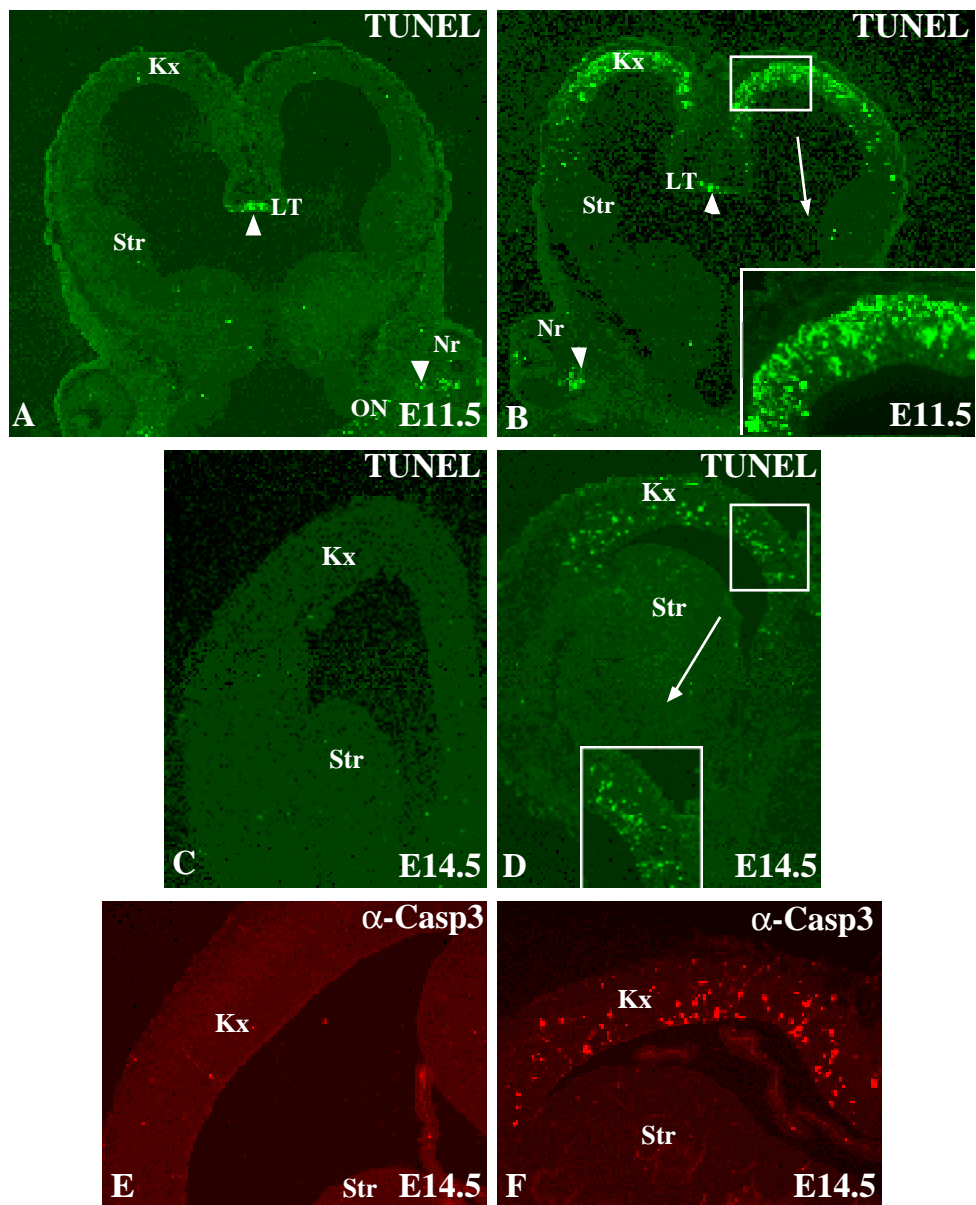


Abbildung 19

Detektion von Apoptose im Kortex auf transversalen Gefrierschnitten nach *Pax6*-Überexpression mit *Emx1-Cre*. (A) TUNEL-Reaktion (grün) einer E11.5 *JoP6* einfach transgenen Kontrollmaus und (B) einer *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Maus. Der Kortex wurde nochmals vergrößert in (B) dargestellt. Die Peilköpfe markieren die endogene Apoptose in der Retina und in Lamina terminalis. Im Gegensatz zu der Kontrollmaus zeigt die Maus mit *Pax6*-Überexpression massive Apoptose im Kortex. (C) TUNEL-Reaktion (grün) auf Telencephalon einer E14.5 *JoP6* einfach transgenen Kontrollmaus ohne detektierte Apoptose und (D) einer E14.5 *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Maus, die Apoptose im Kortex zeigt. Bei *Pax6*-Überexpression bei E14.5 sterben ebenfalls Zellen durch Apoptose. Das gleiche Resultat wurde auch E14.5 mit Immunhistochemie mit Antikörpern gegen aktivierte *Caspase3* (rot) erhalten. (E) Einfach *JoP6* transgene Kontrollmaus und (F) *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgene Maus. Abkürzungen: Kx: Kortex; LT: Lamina terminalis; Nr: Neuroretina; ON: Optischer Nerv; Str: Striatum.

Auch ist erkennbar, daß *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgene Mäuse einen kleineren Kortex als die einfach *JoP6* transgenen Kontrollmäuse besitzen. Daher wurde als nächstes die Apoptose im Kortex überprüft.

Die per TUNEL-Reaktion gewonnenen Daten zeigen eine starke Apoptose im Kortex von E11.5 *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Mäusen im Vergleich zu *JoP6* einfach transgenen Tieren (Abb. 19). Apoptose ist auch bei E14.5 zu detektieren, aber nicht so ausgeprägt wie bei E11.5. Bei E18.5 konnte keine zusätzliche Apoptose im Vergleich zu den Kontrollmäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um den Signalweg der Apoptose genauer zu bestimmen, wurde Immunhistochemie mit Antikörper gegen aktivierte Caspase3 durchgeführt (Abb 19 E und F). Da mit dem Antikörper gegen Caspase3 genauso viele Zellen wie mit der TUNEL Reaktion angefärbt werden können, kann auf eine Apoptose geschlossen werden, die durch aktivierte Caspase3 funktioniert. Damit wurde nachgewiesen, daß die Apoptose durch das Apoptosom aktiviert wird (Kuan et al., 2000).

Da die Apoptose möglicherweise auf eine zu starke Proliferation zurückzuführen ist, wurde die Proliferation mit Hilfe von BrdU-Einlagerung untersucht. Dazu wurde schwangeren Mäusen BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridin) interperitoneal injiziert und die Nachkommen nach 90 Minuten isoliert. Die Telencephali der so behandelten E11.5 Embryonen wurden transversal geschnitten und die Paraffinschnitte mit BrdU-Antikörper immunhistochemisch behandelt. Damit erreicht man eine Markierung aller Zellen, die während der 90 Minuten in der S-Phase des Zellzyklus BrdU inkorporieren. Im sich entwickelnden Kortex der Maus ist die S-Phase ca. 4 Stunden, die G₂- mit der M-Phase ca. 2 Stunden und die G₁-Phase ca. 2 Stunden lang (Takahashi et al., 1999). Aufgrund der interkinetischen Wanderung der Zellkerne der Vorläuferzellen in der ventrikularen Zone des Kortex befinden sich die Zellen, die die S-Phase durchlaufen, am basalen Rand der ventrikularen Zone und die Zellen in der M-Phase am apikalen Rand. So sind im Wildtyp-Kortex nach einem 90 minütigen BrdU-Impuls die markierten Zellen in der S-Phase im basalen Bereich der ventrikularen Zone. Die Zellen, die sich während des 90 minütigen BrdU-Impulses am Ende der S-Phase befunden haben und in die M-Phase übergegangen sind, befinden sich am apikalen Rand der ventrikularen Zone (Pfeile in Abb. 20 A¹). Im Kortex von *JoP6; Emx1-Cre* doppelt

transgenen Mäusen konnte diese Ordnung der Zellen in verschiedenen Zellteilungsstadien nicht beobachtet werden (Abb.20 B¹). Durch *Pax6*-Überexpression wird also die interkinetische Wanderung der Zellkerne gestört. Die Inaktivierung von *Pax6* in *Small eye* führt ebenfalls zu Defekten in der interkinetischen Zellkernwanderung (Stoykova et al., 1997). Auch konnten nach *Pax6*-Überexpression Zellaggregate gefunden werden, die in der Morphologie ähnlich sind zu denen, die nach *Pax6*-Inaktivierung sowohl *in vivo* (Schmahl et al., 1993; Stoykova et al., 1997; Talamillo et al., 2003) als auch *in vitro* (Götz et al., 1998) gefunden wurden.

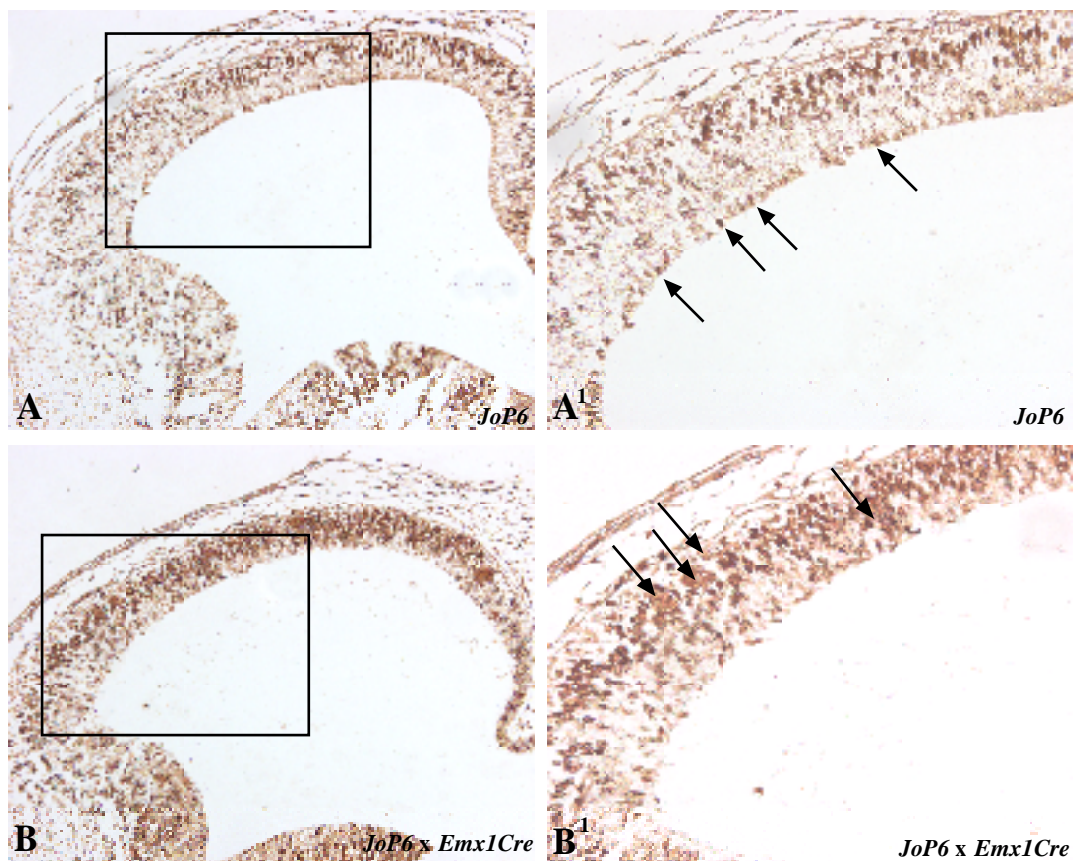


Abbildung 20

Immunhistochemie E11.5 mit BrdU-Antikörper in *JoP6* einfach transgenem Kortex (A und A¹) und *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenem Kortex (B und B¹). Die Pfeile in A¹ deuten auf die mitotisch aktiven Zellen am unteren apikalen Rand der ventrikulären Zone. Die Pfeile in B¹ zeigen einige Zellaggregate nach *Pax6*-Überexpression.

Um die Proliferationseigenschaften des *Pax6* überexprimierenden Kortex genauer zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Markierung mit ki67-Antikörper durchgeführt. ki67-Antikörper markieren alle Zellen, die sich in einer

der Zellteilungsphasen G₁, S, G₂ oder M befinden. Dadurch wurde ersichtlich, daß die Zellen in den Zellaggregaten nicht mit ki67-Antikörper markiert werden und so keine Zellteilungen mehr vornehmen (Abb 21 B). Die Behandlung der Zellaggregate mit der TUNEL-Reaktion konnte dagegen darstellen, daß die Zellaggregate durch Apoptose absterben (Abb 21 D). Dabei wurden nicht nur Zellaggregate von mehreren Zellen, sondern auch einzelne Zellen mit gleicher Morphologie und Eigenschaft bezüglich der Zellteilung und Apoptose gefunden (Pfeile in 21 C). Um eine Differenzierung der Zellaggregate in Neurone zu analysieren, wurde Immunhistochemie mit Tuj1-Antikörper durchgeführt. *Tuj1* ist der früheste bekannte Marker, den Neurone unmittelbar nach ihrer Differenzierung exprimieren. Durch die interkinetische Zellmigration findet die Zellteilung der Vorläuferzellen immer am apikalen Rand der ventrikularen Zone statt. Differenziert sich eine der Tochterzellen nach der Teilung der Vorläuferzelle in ein Neuron, so wandert sie dorsal in die kortikale Platte. Der erste Zellmarker für diese frühen Neurone ist *Tuj1*, den sie aufgrund der interkinetischen Zellwanderung ungefähr ab der Mitte der ventrikularen Zone exprimieren. Im *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Kortex dagegen konnten auch *Tuj1* positive Zellen am apikalen Rand der ventrikularen Zone dokumentiert werden (Pfeilköpfe in 21 E). Die Zellaggregate in *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenem Kortex sind *Tuj1* negativ und somit keine Neurone (Pfeile in Abb 21 E).

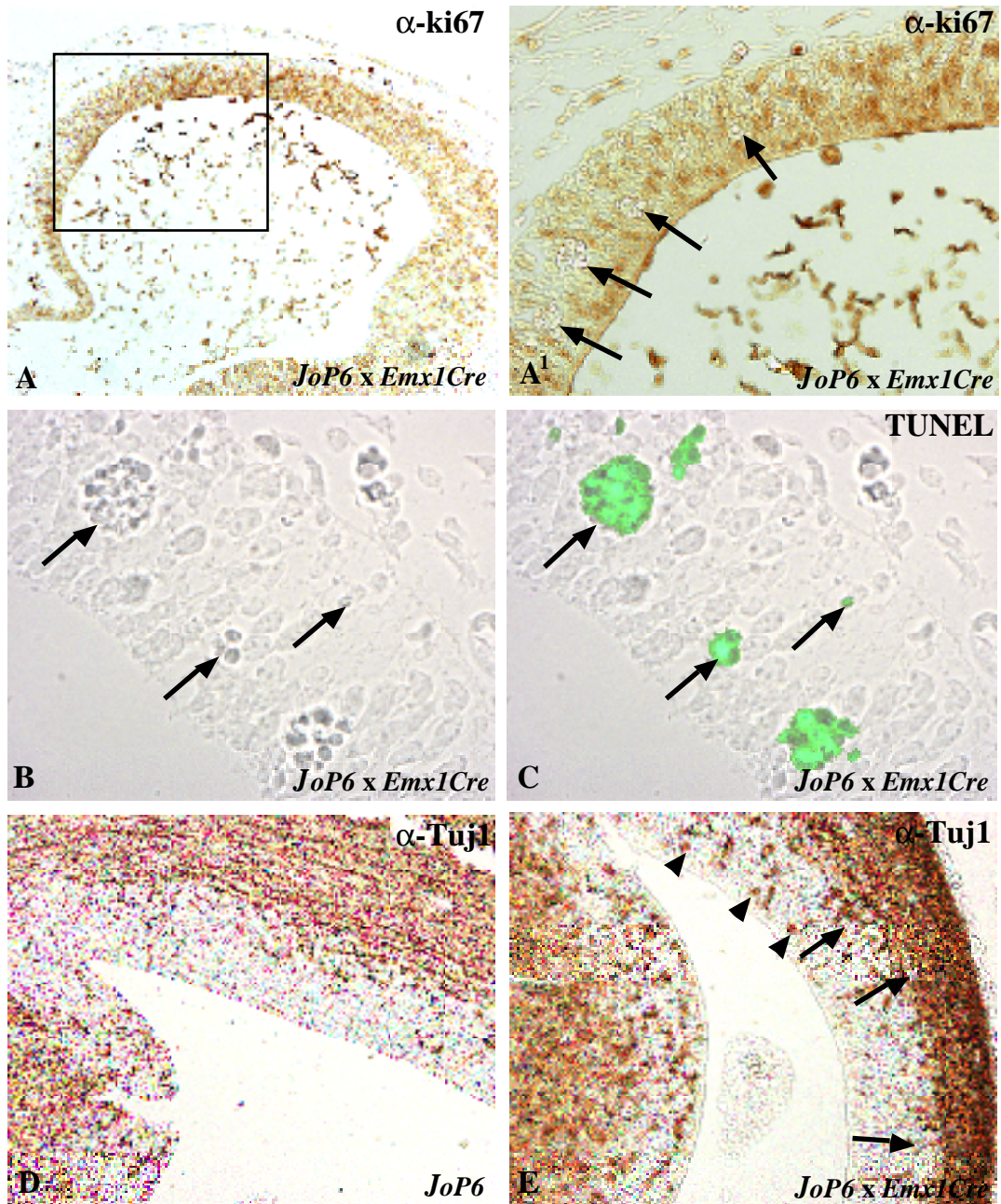


Abbildung 21

Untersuchung der Zellaggregate auf E11.5 Paraffinschnitten von *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Telencephali (A, A1, B, C, E) und *JoP6* einfach transgenem Telencephalon (D). (A) Immunhistochemie mit ki67-Antikörper nach *Pax6*-Überexpression (braun). (A1) die Vergrößerung von A zeigt die *ki67* negativen Zellaggregate, die mit Pfeilen hervorgehoben wurden. (B) Hellfeldaufnahme verschieden großer Zellaggregate nach *Pax6*-Überexpression. (C) Überlagerung der Hellfeldaufnahme in B mit TUNEL markierten Zellen (grün). (D) Immunhistochemie mit Tuj1-Antikörper auf *JoP6* einfach transgenem Kortex. (E) Immunhistochemie mit Tuj1-Antikörper auf *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenem Kortex. Die Pfeile deuten auf die *Tuj1* negativen Zellaggregate und die Pfeilköpfe auf *Tuj1* positive Zellen, die sich am apikalen Rand der ventrikulären Zone befinden.

2.3.2 *Pax6*-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie

Gorski und Mitarbeiter haben mit ihrer Analyse der *Emx1-Cre* Mauslinie zeigen können, daß bei E12.5 sowohl fast alle Zellen der proliferierenden Zone als auch der postmitotischen Zone im medialen, dorsalen und lateralen Kortex von der CRE-Rekombination betroffen sind. Im ventralen Kortex dagegen durchlaufen nur wenige Zellen die CRE-Rekombination (Gorski et al., 2002). Durch Analyse der Zelllinien haben sie weiterhin gefunden, daß 88% der Projektionsneurone des postnatalen Kortex rekombiniert sind und daher Tochterzellen von *Emx1-Cre* positiven Zellen sind. Da CRE-Rekombination auch in den postmitotischen Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen wurde (Gorski et al., 2002), können die Defekte nach *Pax6*-Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie von zwei möglichen Effekten herrühren: Sie könnten einerseits auf die *Pax6*-Überexpression in schon endogenen *Pax6* positiven Vorläuferzellen, andererseits auf die ektopische *Pax6*-Überexpression in *Pax6* negativen Zellen zurückzuführen sein. Um gezielt *Pax6*-Überexpression in den endogenen *Pax6* positiven Vorläuferzellen des Kortex zu dirigieren, wurde für die *Pax6*-Überexpression die transgene *hGFAP-Cre* Mauslinie benutzt (Zhuo et al., 2001). Der *hGFAP*-Promotor steuert Expression in den *RC2* und *GLAST* positiven radialen Gliazellen ab E13.5, die zu 80% auch *Pax6* exprimieren (Heins et al., 2002). Kürzlich veröffentlichte Daten schließen eine *Cre*-Expression in anderen kortikalen Vorläuferzellen als den radialen Gliazellen aus (Malatesta et al., 2003). Auch im adulten zentralen Nervensystem kann die CRE-Immunreaktivität nicht in Neuronen, Ependymalzellen, Oligodendrozyten oder anderen Gliazellen, bis auf die *hGFAP* positiven Astrozyten, nachgewiesen werden.

Nach *Pax6*-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie wurde als erstes die Überexpression von PAX6-Protein mit *Pax6*-Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen (Abb. 22). Wie die so behandelten transversalen Gefrierschnitte von E18.5 Telencephali zeigen, kann sowohl die *Pax6*-Überexpression als auch die Expression des *lacZ*-Reporters nachgewiesen werden.

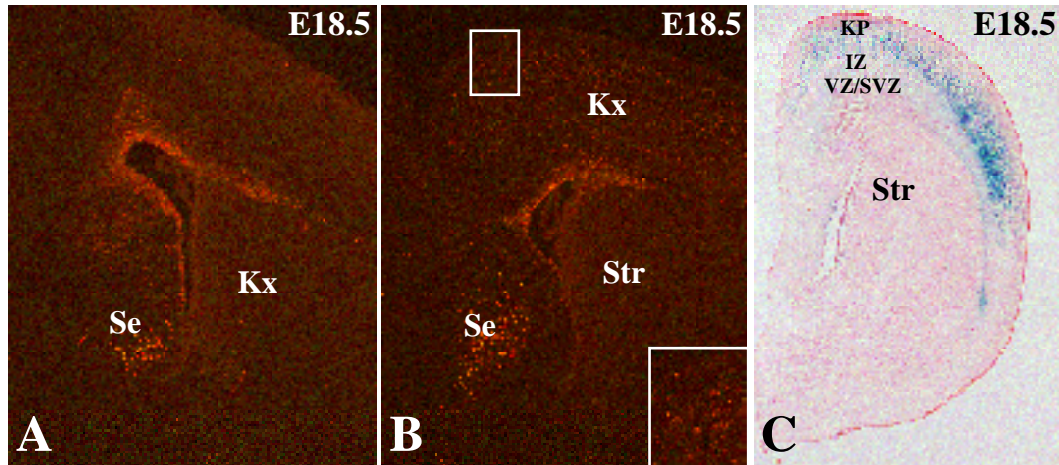


Abbildung 22

Pax6- und *lacZ*-Expression im *JoP6*; *hGFAP-Cre* doppelt transgenen Gehirn im Vergleich zum *JoP6* einfach transgenem Gehirn. (A) Immunhistochemie mit Pax6-Antikörper (rot) auf *JoP6* einfach transgenem Gefrierschnitt. (B) Der Pax6-Antikörper auf *JoP6*; *hGFAP-Cre* doppelt transgenem Gehirn. (C) X-Gal-Färbung eines *JoP6*; *hGFAP-Cre* doppelt transgenen Gehirns. Abkürzungen: IZ: Intermediäre Zone; KP: Kortikale Platte; Kx: Kortex; Se: Septum; Str: Striatum; SVZ: Subventrikuläre Zone; VZ: Ventrikuläre Zone.

Nachdem die *Pax6*-Überexpression verifiziert wurde, wurden die *JoP6*; *hGFAP-Cre* doppelt transgenen Gehirne auf Apoptose hin untersucht. Per TUNEL-Reaktion konnte nachgewiesen werden, daß radiale Gliazellen bei *Pax6*-Überexpression Apoptose durchführen (Abb. 23).

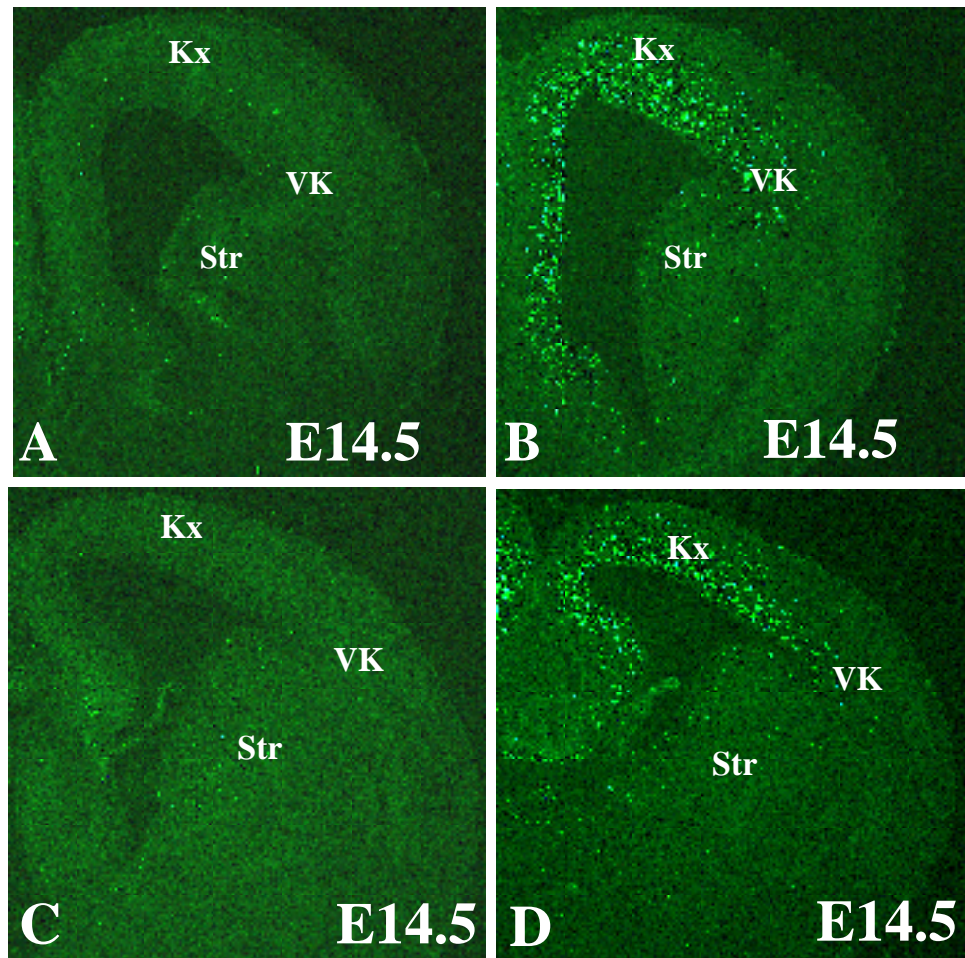


Abbildung 23

Apoptose in *JoP6*; *hGFAP-Cre* doppelt und *JoP6* einfach transgenen Gehirnen. TUNEL-Reaktion auf E14.5 transversalen Gefrierschnitten. (A und C) Einfach *JoP6* transgenes Telencephalon. (B und D) *JoP6*; *hGFAP-Cre* doppelt transgenes Telencephalon. Abkürzungen: Kx: Kortex; Str: Striatum; VK: Ventraler Kortex.

Wie im *JoP6*; *Emx1-Cre* doppelt transgenen Kortex fallen auch nach *Pax6*-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie Zellaggregate auf. E14.5 Gefrierschnitte wurden daher mit *ki67*-Antikörper immunhistochemisch rot gefärbt. Anschließend wurden die Aufnahmen von den Zellaggregaten und von den *ki67*-Antikörper markierten Zellen überlagert. Dadurch war erkennbar, daß die Zellaggregate *ki67* negativ sind und keine Zellteilung durchlaufen (Pfeile in Abb 24 B). Auf gleiche Weise wurde mit der Aufnahme der TUNEL-Reaktion verfahren. So ließ sich feststellen, daß die Zellaggregate aufgrund von Apoptose sterben (Pfeile in Abb 24 C).

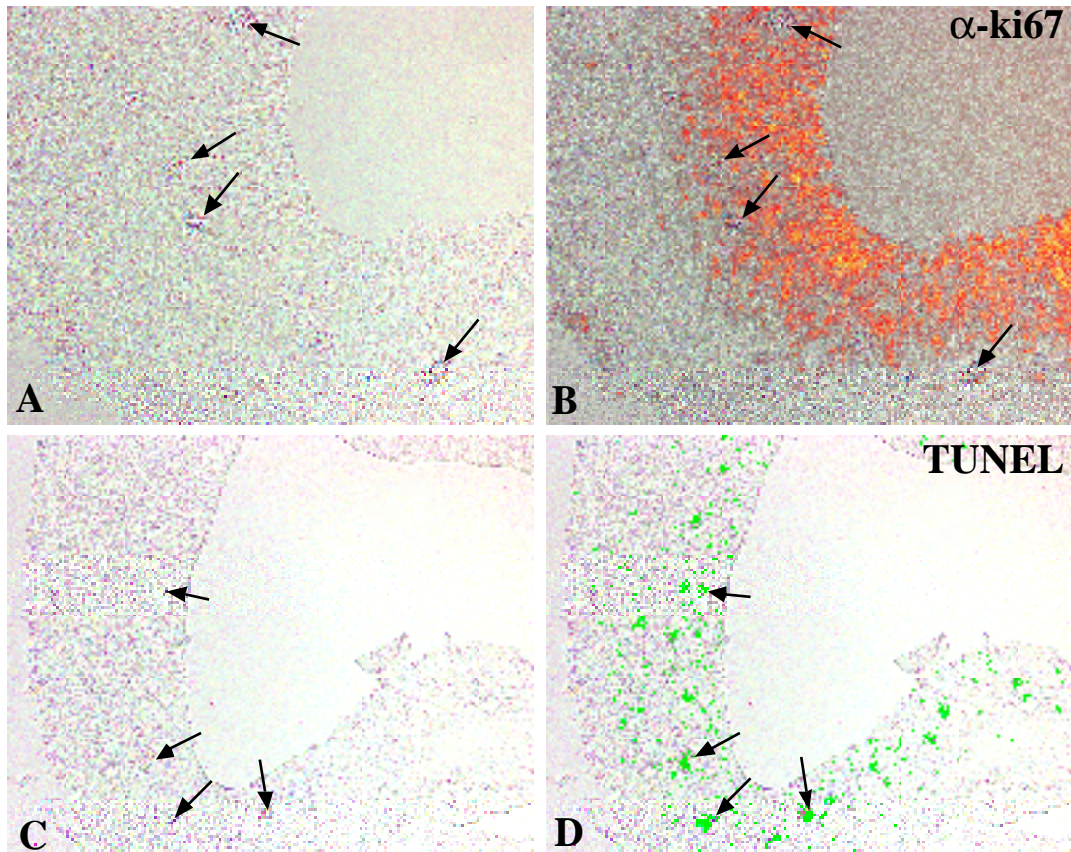


Abbildung 24

Analyse der Zellaggregate auf E14.5 Gefrierschnitten vom *JoP6; hGFAP-Cre* doppelt transgenem Kortex. (A) Hellfeldaufnahme verschieden großer Zellaggregate. (B) Überlagerung der Hellfeldaufnahme in A mit ki67 markierten Zellen (rot). (C) Hellfeldaufnahme verschieden großer Zellaggregate. (D) Überlagerung der Hellfeldaufnahme in C mit TUNEL markierten Zellen (grün).

2.3.3 *Pax6*-Überexpression mit der *E1-ngn2-Cre* Mauslinie

Wie auch in der Einleitung beschrieben, ist *Pax6* in einem Gradienten im Kortex exprimiert: Die Expression ist stark im rostro-lateralen und schwach im caudo-medialen Kortex (Stoykova et al., 1997; Muzio et al., 2002). Damit ist die Expression von *Pax6* im ventralen Kortex stärker als im medialen, dorsalen oder lateralen Kortex. Nach *Pax6*-Überexpression mit den transgenen Mauslinien *Emx1-Cre* und *hGFAP-Cre* wurde im ventralen Kortex weniger Apoptose als in den anderen Bereichen des Kortex detektiert, obwohl die *Emx1-Cre* und die *hGFAP-Cre* Mauslinien im ventralen Kortex CRE-Rekombination durchführen (Gorski et al., 2002; Malatesta et al., 2003).

Um die *Pax6*-Überexpression in den kortikalen Vorläuferzellen des Kortex zu untersuchen, die stark endogenes *Pax6* exprimieren, wurde die *E1-ngn2-Cre* Mauslinie zur *Pax6*-Überexpression genutzt. Wie in Kapitel 2.1.7 und von Scardigli und Mitarbeitern dargestellt, sind im Kortex der *E1-ngn2-Cre* transgenen Mauslinie nur Vorläuferzellen von der CRE-Rekombination betroffen, die stark *Pax6* exprimieren (Scardigli et al., 2003). Somit wird durch Kreuzen der transgenen Linien *JoP6* und *E1-ngn2-Cre* das *Pax6* im Kortex nur in denjenigen Zellen überexprimiert, die schon stark endogenes *Pax6* exprimieren oder von ihnen abstammen.

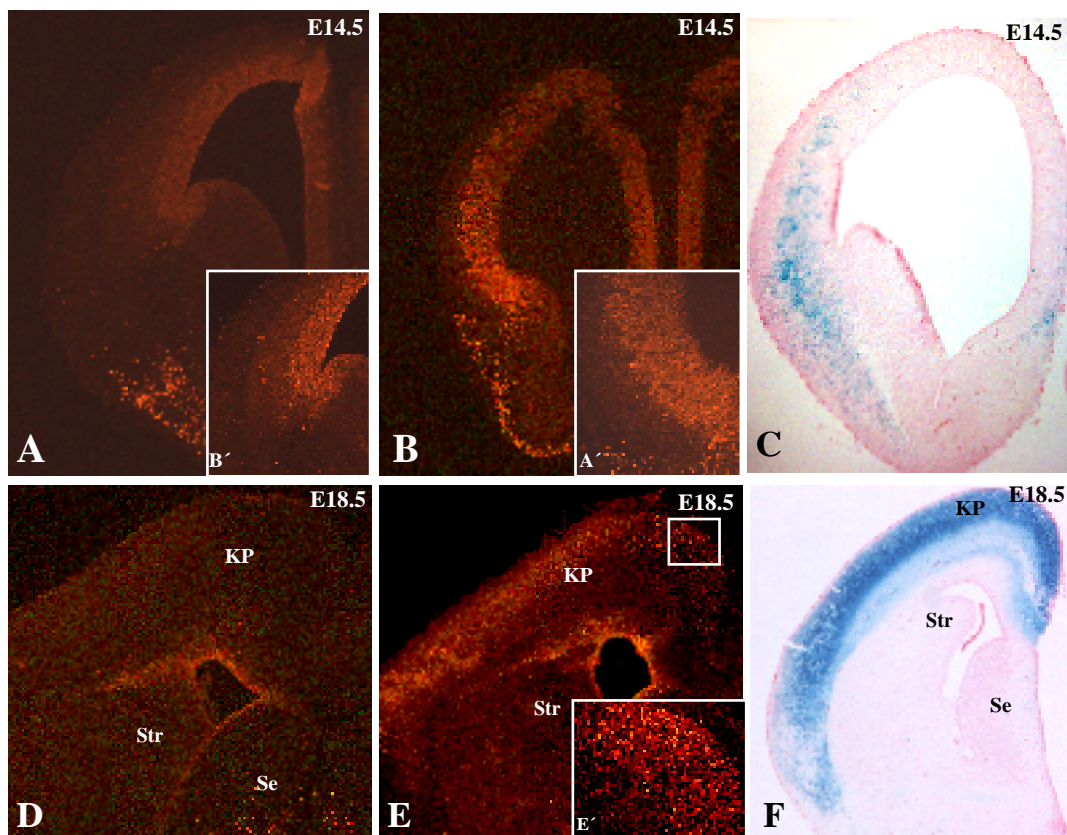


Abbildung 25

Die *Pax6*- und *lacZ*-Expression in *JoP6; E1-ngn2-Cre* doppel- und *JoP6* einfach transgenen Telencephali. Immunhistochemie mit *Pax6*-Antikörper auf transversalen Gefrierschnitten in E14.5 *JoP6; E1-ngn2-Cre* doppel- (B) und *JoP6* (A) einfach transgenen Telencephali. (D und E) Immunhistochemie mit *Pax6*-Antikörper auf transversalen Gefrierschnitten in E18.5 *JoP6; E1-ngn2-Cre* doppel- (E) und *JoP6* (D) einfach transgenen Telencephali. A1 bzw. E1 sind ausschnittsweise Vergrößerungen von A bzw. E. (C und F) *lacZ*-Expression in *Pax6* überexprimierenden Telencephali. Abkürzungen: KP: Korticale Platte; Str: Striatum; Se: Septum.

Wiederum als erstes wurde die Expression von *lacZ* und *Pax6* überprüft. Bei E14.5 ist nur eine Intensivierung der *Pax6*-Expression in *Pax6* endogenen Bereichen des lateralen Kortex zu erkennen. Dies wird durch die *lacZ*-Expression in diesem Bereich unterstützt (Abb. 25 C). Bei E18.5 ist die *Pax6*-Überexpression dagegen in der kortikalen Platte erkennbar (Abb. 25 E). Mit der TUNEL Reaktion, die auf transversalen 10µm Gefrierschnitten von *JoP6*; *E1-ngn2-Cre* doppelt transgenem Gehirn durchgeführt wurde, konnte sowohl bei E11.5 als auch bei E14.5 keine Zunahme der Apoptose festgestellt werden (Abb. 26).

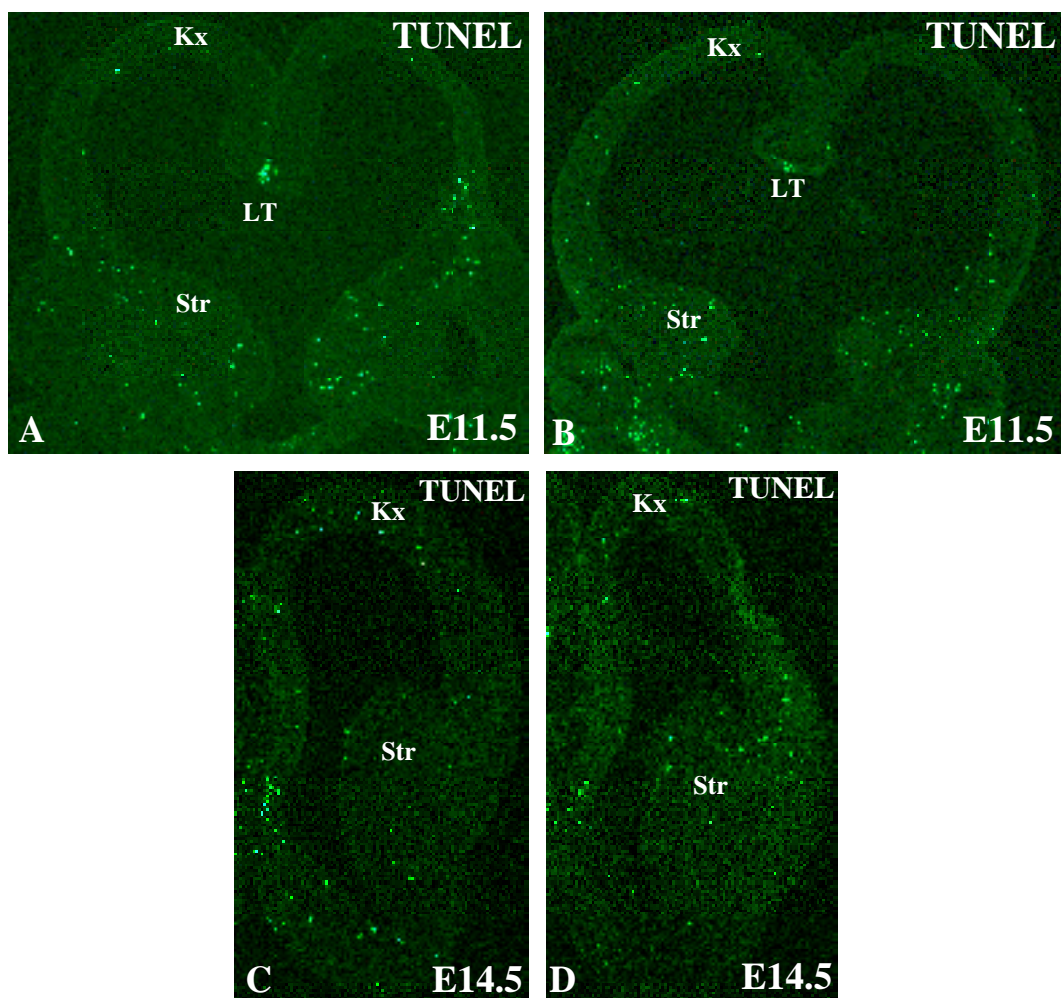


Abbildung 26

Detektion von Apoptose mit TUNEL-Reaktion (grün) im Kortex auf transversalen Gefrierschnitten nach *Pax6*-Überexpression mit *E1-ngn2-Cre*. (A) Telencephalon einer E11.5 *JoP6* einfach transgenen Kontrollmaus und (B) einer *JoP6*; *E1-ngn2-Cre* doppelt transgenen Maus. Eine vermehrte Apoptose ist nicht festzustellen. E14.5 Kortex einer (C) *JoP6* einfach transgenen Kontrollmaus und (D) einer *JoP6*; *E1-ngn2-Cre* doppelt transgenen Maus, ebenfalls ohne Zunahme der Apoptose. Abkürzungen: Kx: Kortex; LT: Lamina terminalis; Str: Striatum.

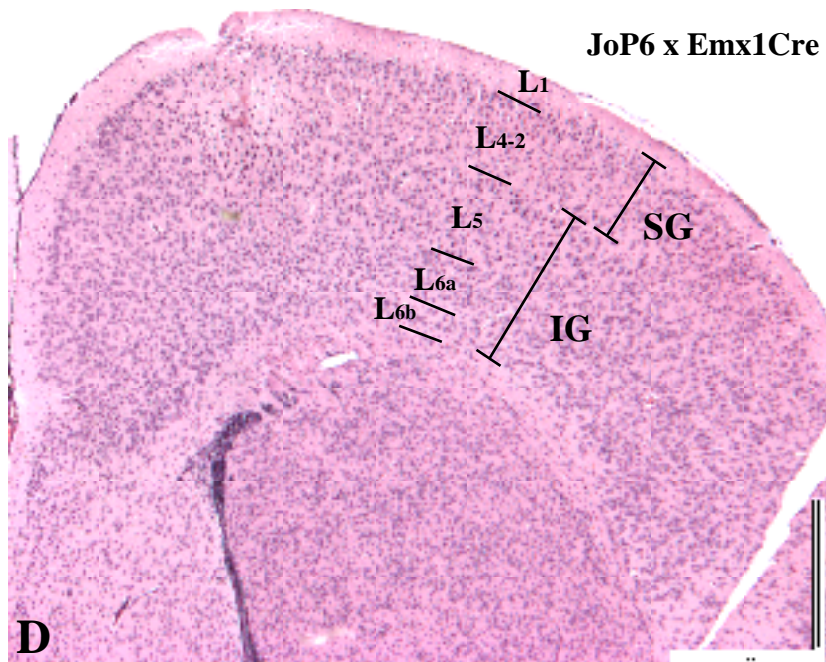
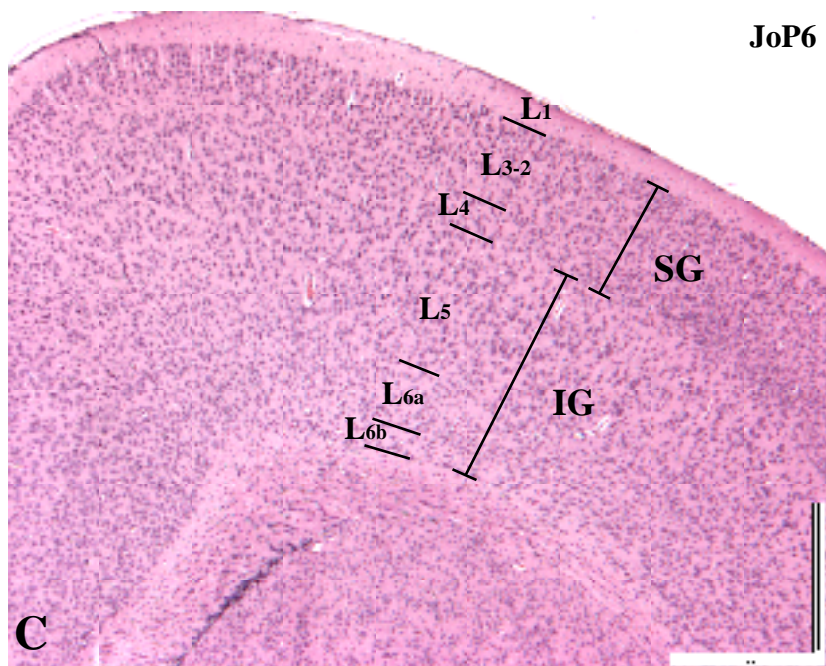
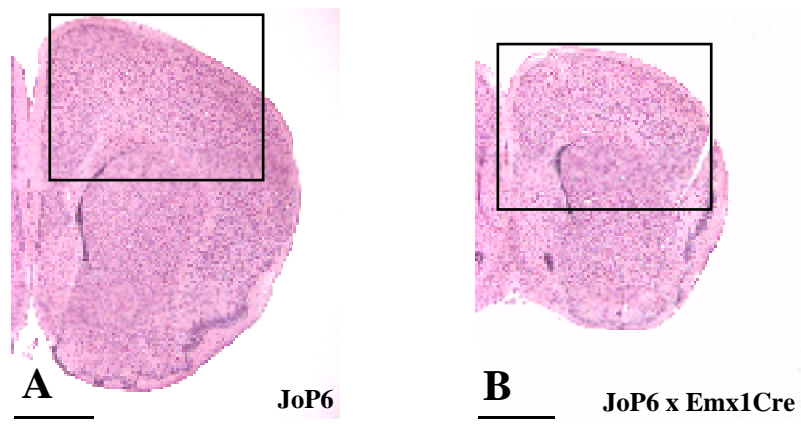
2.4. Analyse des adulten Kortex nach *Pax6*-Überexpression

Durch die Nutzung des Cre-loxP-Systems für die *Pax6*-Überexpression war es möglich, adulte Mäuse mit *Pax6*-Überexpression im Kortex zu erhalten. Damit konnte der Effekt der *Pax6*-Überexpression auf die Schichtenbildung des Kortex, die erst nach der Geburt abgeschlossen ist, untersucht werden.

2.4.1 *Pax6*-Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie führt zu Defekten in der Schichtenbildung des Kortex

Um die Morphologie des adulten Kortex zu dokumentieren, wurden Gehirne aus *JoP6* einfach und *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Mäusen isoliert, mit Paraffin transversal 10µm dick geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Im *JoP6; Emx1-Cre* doppelt transgenen Gehirn ist die Größe und die Dicke des Kortex geringer als die des Kortex in einfach *JoP6* transgenen Kontrollgehirnen (Abb. 27). Der Kortex ist nach *Pax6*-Überexpression fast halb so dick wie in den Kontrollgehirnen. Dieser Effekt ist auf rostralen Schnitten deutlicher als auf caudalen Schnitten. Eine genauere Untersuchung des Aufbaues des Kortex zeigte, daß die Dichte der jeweiligen Kortexschichten mit *Pax6*-Überexpression vergleichbar mit denen der Kontrollgehirne war. Die Dicke der Schichten war dagegen deutlich geringer, wobei die Supra-Granulatschichten (Schicht IV bis II) mehr als die Infra-Granulatschichten (Schicht VI und V) betroffen sind. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollschicht im *JoP6* einfach transgenen Kortex ist die Supra-Granulatschichten im *Pax6* überexprimierenden Kortex auf 50% und die Infra-Granulatschichten auf 70% reduziert (gemittelt über 4 Schnittebenen und auf Zehner-Potenz gerundet). Die Schicht IV ist sogar kaum noch erkennbar. Vergleicht man das relative Verhältnis der Schichten und Bildet einen Quotienten aus Supra-Granulatschichten (im Zähler) und Infra-Granulatschichten (im Nenner), so erhält man für den Wildtypkortex 0,6 und für den *Pax6* überexprimierenden Kortex 0,5. Auch nach dieser Berechnung wird deutlich, daß die Supra-Granulatschichten stärker als die Infra-Granulatschichten betroffen sind.

Ergebnisse



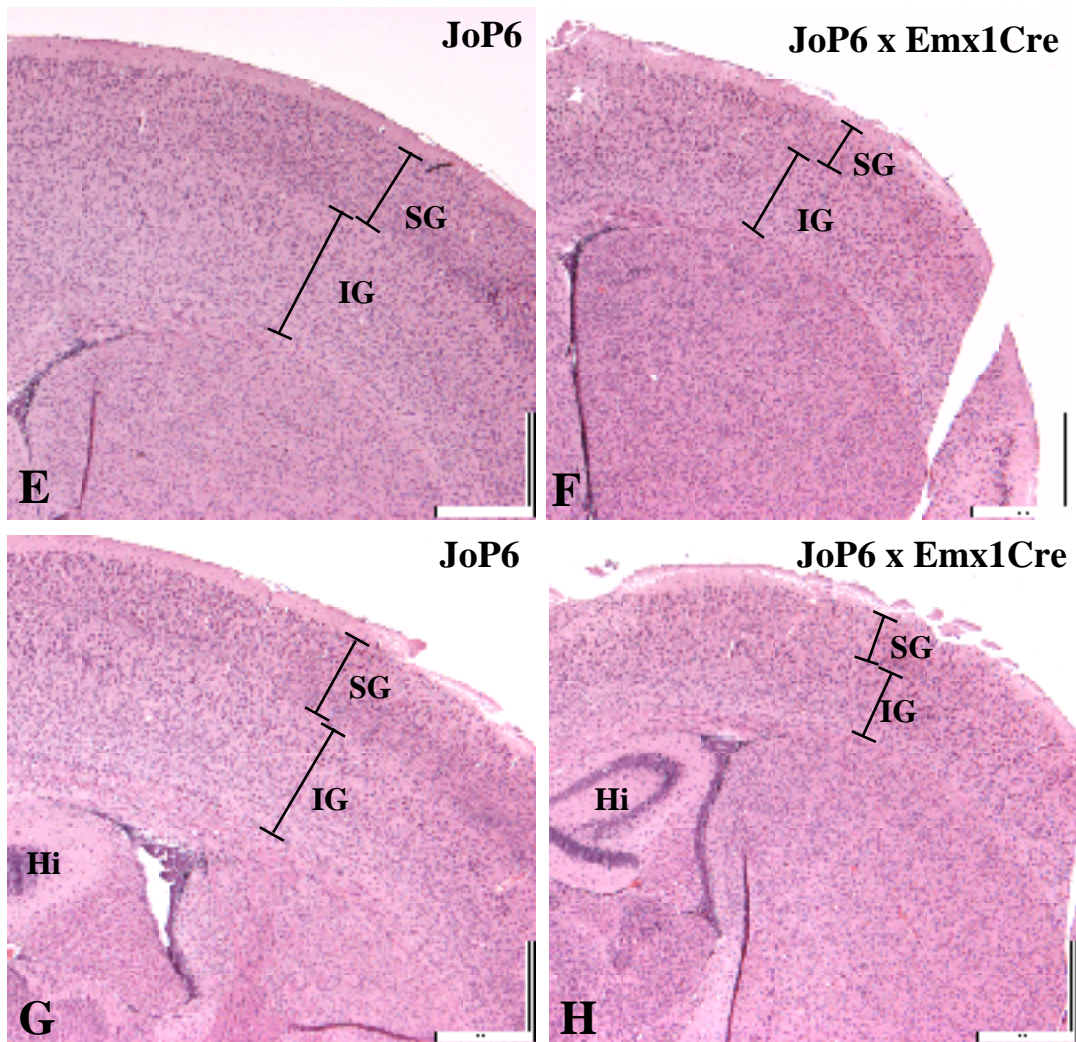


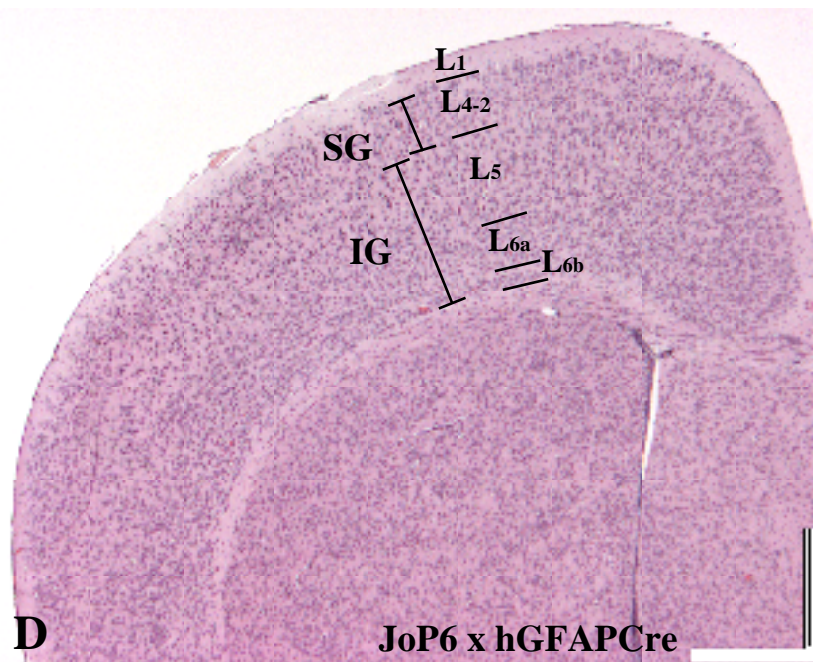
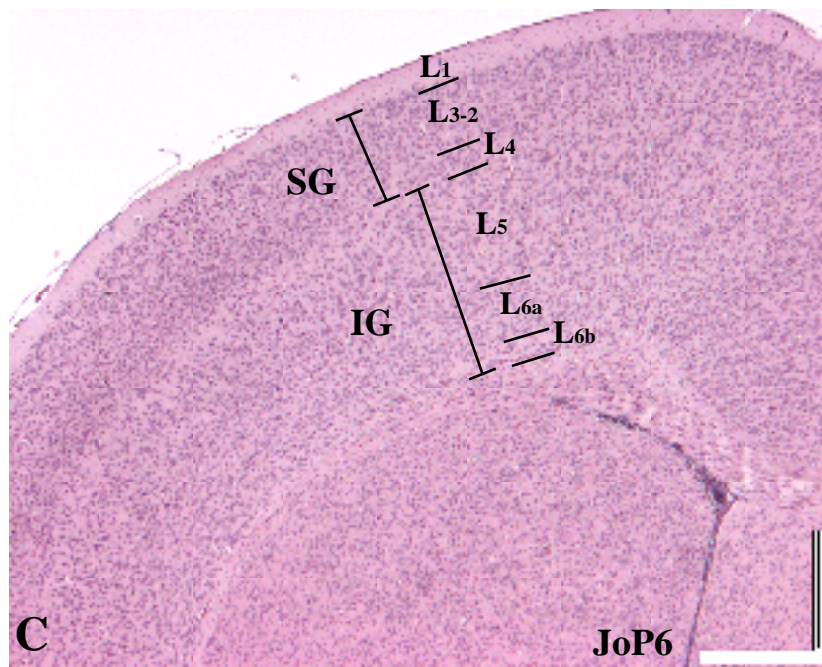
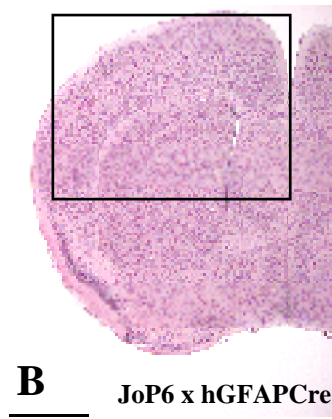
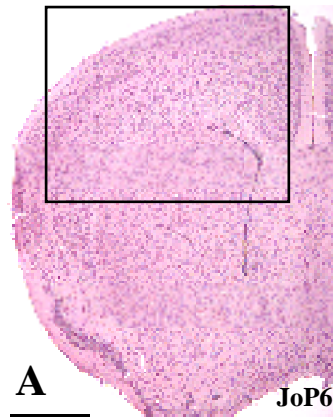
Abbildung 27

Hämatoxylin-Eosin-Färbung von transversalen 10µm Paraffinschnitten von P21 Telencephali. Die Dicke der Infra-Granulatschichten (Schichten VI und V) und Supra-Granulatschichten (Schichten IV bis II) sind markiert. Die Dicke des Kortex nach *Pax6*-Überexpression ist im Vergleich zum Kontrollkortex deutlich kleiner, während die Morphologie des Hippocampus nicht verändert ist. (A und C) Übersicht und Vergrößerung eines *JoP6* einfach transgenen Telencephalons. (B und D) Übersicht und Vergrößerung eines *JoP6*; *Emx1-Cre* doppel transgenen Telencephalons. Im *JoP6*; *Emx1-Cre* doppel transgenen Gehirn ist die Schicht IV im Gegensatz zum Kontrollgehirn nur schwer zu erkennen. In E bis H sind weitere transversale Schnitte in anderen Schnittebenen gezeigt. Die Dicke der Infra- und Supra-Granulatschichten ist markiert. Abkürzungen: L1 bis L6b: Schichten (Layer) I bis VI; Hi: Hippocampus; IG: Infra-Granulatschichten; SP: Supra-Granulatschichten.

2.4.2 Pax6-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie führt zu Defekten in der Schichtenbildung des Kortex

Um die Auswirkungen der *Pax6*-Überexpression, induziert durch die *hGFAP-Cre* Mauslinie, auf das ausgewachsene Gehirn zu analysieren, wurden P21 Gehirne transversal 10µm geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Wie auch bei der Überexpression mit *Emx1-Cre* konnte eine deutliche Verkleinerung der kortikalen Schichten besonders der Supra-Granulatschichten festgestellt werden. Im Vergleich zum *JoP6* einfach transgenen Kontrollkortex sind die Supra-Granulatschichten nach der *Pax6*-Überexpression auf 60%, und die Infra-Granulatschichten auf 80% reduziert (gemittelt über 4 transversale Ebenen) (Abb. 28). Da mit der *Emx1-Cre* Mauslinie zusätzlich die nicht radialen Gliazellen betroffen sind, ist die Verkleinerung des Kortex nach *Pax6*-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie nicht so ausgeprägt wie mit der *Emx1-Cre* Mauslinie. Trotzdem sind wieder die Supra-Granulatschichten stärker betroffen als die Infra-Granulatschichten. Dies wird auch deutlich, wenn man zum relativen Vergleich den Quotienten aus Supra-Granulatschichten (im Zähler) und Infra-Granulatschichten (im Nenner) bildet. Für den Wildtypkortex erhält man wiederum den Wert 0,6 und für den *Pax6* überexprimierenden Kortex den Wert 0,5. Somit sind nach *Pax6*-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie genau wie mit der *Emx1-Cre* Mauslinie die Supra-Granulatschichten stärker als die Infra-Granulatschichten von der Verkleinerung betroffen.

Ergebnisse



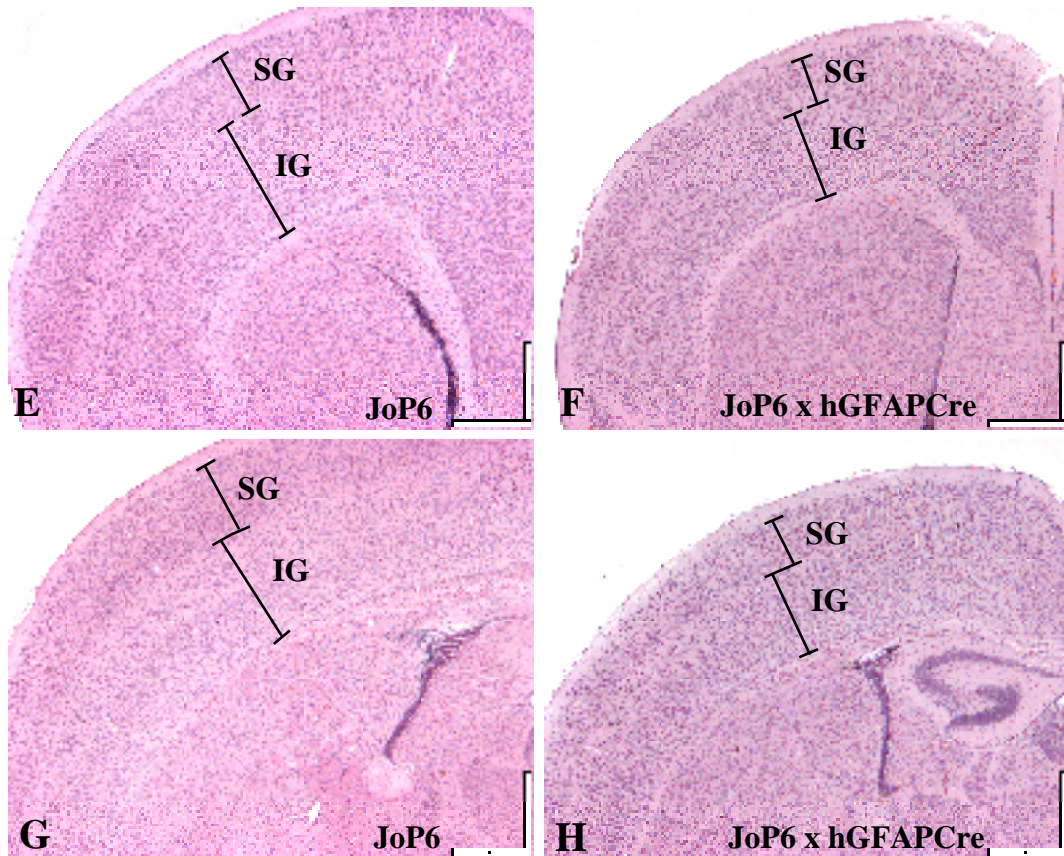


Abbildung 28

Hämatoxylin-Eosin-Färbung von transversalen 10µm Paraffinschnitten von P21 Telencephali. Die Dicke der Infra- und Supra-Granulatschichten sind angezeigt. (A und C) Übersicht und Vergrößerung eines *JoP6* einfach transgenen Telencephalons. (B und D) Übersicht und Vergrößerung eines *JoP6; hGFAP-Cre* doppelt transgenen Telencephalons. In E bis H sind weitere transversale Schnitte in anderen Schnittebenen gezeigt. Die Supra-Granulatschichten (Schichten II bis IV) und die Infra-Granulatschichten (Schichten V und VI) wurden in ihrer Dicke markiert. Abkürzungen: L1 bis L6b: Schichten (Layer) I bis VI; IG: Infra-Granulatschichten; SP: Supra-Granulatschichten.

3. Diskussion

Eine der Herausforderungen des 21igsten Jahrhunderts ist die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen der Gehirnentwicklung, die die Grundlage des menschlichen Verhaltens sind. Das zentrale Nervensystem der Säugetiere ist das extremste Beispiel zellulärer Diversifikation und Komplexität. Die genaue Anzahl verschiedener Zelltypen, die nach vorsichtigen Schätzungen bei mehreren hundert liegt, ist noch immer unklar (Stevens, 1998).

Die meisten Veröffentlichungen über *Pax6* behandeln die Funktion von *Pax6* im Auge. Über die Bedeutung von *Pax6* für die Entwicklung des Kortex ist dagegen nur wenig bekannt. Auch beziehen sich die meisten Analysen auf die Inaktivierung von *Pax6*. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit *Pax6* konditional im sich entwickelnden Kortex der Maus überexprimiert werden. Um die konditionale Überexpression zu ermöglichen wurde eine Strategie nach dem Cre-loxP-System entwickelt.

Im Kortex besitzt die endogene Expression von *Pax6* einen deutlichen Gradienten, der auf eine mögliche Funktion der PAX6-Konzentration hinweist. Die Bedeutung der Konzentration an PAX6 für die Augenentwicklung konnte erstmals von Schedl und Mitarbeitern aufgezeigt werden (Schedl et al., 1996). Heins und Mitarbeiter konnten mit kultivierten, *Pax6* positiven kortikalen Vorläuferzellen belegen, daß *in vitro* nach *Pax6*-Überexpression die Vorläuferzellen ihre Proliferation beenden und verstärkt Neuronen bilden (Heins et al., 2002).

Sogar postnatale Astrozyten konnten nach *Pax6*-Überexpression *in vitro* zu Neuronen differenziert werden.

Eine Untersuchung der Kortexentwicklung in der *Pax6* Nullmutanten *Small eye* ist nur begrenzt möglich, da die Tiere bei der Geburt (E19) sterben, aber der Kortex erst drei Wochen später (P21) voll entwickelt ist. Auch fehlen *Small eye* Axone und Fortsätze, die von anderen Gehirnbereichen in den Kortex des Telencephalons einwandern und so dessen Entwicklung beeinflussen. Eine Unterscheidung von intrinsischen und extrinsischen Effekten ist so nicht möglich. Daher wurde für die Überexpression von *Pax6* eine konditionale Strategie gewählt, um Aufschluß über dessen Funktion im adulten und im sich entwickelnden Kortex zu erhalten. Nur so sind mögliche Veränderungen im Kortex unabhängig von beeinflussenden Veränderungen anderer Gewebe zu studieren. Das Cre-loxP-System bietet hierfür ein ideales neues Werkzeug, da es zeit- und gewebespezifisch wirkt (Übersicht in Kwan, 2002; Tsien et al., 1996; Rajewsky et al., 1996).

3.1 Generierung der *JoP6* geflochten transgenen Mauslinie zur konditionalen Überexpression von *Pax6*

Die Nutzung des Cre-loxP-Systems erfordert die Generierung von zwei transgenen Mauslinien. Die erste transgene Mauslinie soll die Expression von *Cre* und somit die CRE-Rekombination in spezifischen Zellen des Kortex steuern und die zweite transgene Mauslinie soll die *Pax6*-Überexpression ausschließlich nach erfolgter CRE-Rekombination gewährleisten.

Die transgene Mauslinie *JoP6* zur Überexpression wurde durch Insertion des "schlafenden" Gens *Pax6* nach einer geflochtenen STOP-Kassette und einem starken, ubiquitären Promotor erhalten. Als Promotor hierfür wurde ein Fusionspromotor aus dem β -actin-Promotor des Huhns und dem Cytomegalovirus-Promotor (CMV) benutzt (Niewa et al., 1991). Um die ubiquitäre Expressionssteuerung in der transgenen Mauslinie analysieren zu können, wurde in die von diesem Promotor kontrollierte STOP-Kassette das *gfp*-Reportergen integriert. Das *gfp*-Reportergen wurde ausgewählt, da es für Zellen nicht toxisch ist und die Expression in der lebenden Maus per Fluoreszenz verfolgt werden kann (Hadjantonakis et al., 1998). Mit Hilfe dieses Reporters konnte die ubi-

quitäre Expressionssteuerung in der *JoP6* transgenen Maus gezeigt werden. Stromabwärts des mit *Cre* rekombinierbaren Transkriptionsstops wurden dann die Gene *Pax6* und *lacZ* inseriert. Dabei wurde darauf geachtet, daß nach erfolgter CRE-Rekombination die verbleibende loxP-Sequenz nicht den Translationsstart der mRNA beeinflusst. Das Reporter-gen *lacZ* wurde dazu genutzt, um vor der CRE-Rekombination ein Funktionieren der STOP-Kassette zu überprüfen und nach erfolgter CRE-Rekombination das Anschalten der “schlafenden” Gene *lacZ* und *Pax6* zu verfolgen. Die gleichzeitige Expression des Reporters *lacZ* und des zu analysierenden Gens *Pax6* wurde durch eine *IRES*-Sequenz gewährleistet. Die Funktionen der jeweiligen Genkassetten im klonierten Konstrukt wurden vor der Generierung der Transgenen *in vitro* per GFP-Fluoreszenz, X-Gal-Färbung und Pax6-Westernblot kontrolliert (Abb. 14). Auch in der anschließend generierten transgenen Maus *JoP6* zeigten die *lacZ*- und *gfp*-Reporter-gene ihre erwartete Funktion.

3.2 Generierung transgener Mauslinien mit spezifischer CRE-Rekombination im sich entwickelnden Kortex

Um die *Pax6*-Überexpression in spezifischen Zellen des sich entwickelnden Kortex untersuchen und vergleichen zu können, sollten transgene Mauslinien mit verschiedener *Cre*-Expression im Kortex generiert bzw. genutzt werden.

Um *Cre*-Expression auch in *Pax6* positiven Zellen des Kortex zu ermöglichen, wäre ein Steuerungselement aus dem *Pax6*-Promotor ideal. So wäre gewährleistet, daß die Expression in den *Pax6* positiven Zellen aktiviert wird. Kammandel und Mitarbeiter haben bei ihren Promotoruntersuchungen von *Pax6* ein Element gefunden, das Expression im Kortex einer transient transgenen Maus zeigte (Kammandel et al., 1999). Dieses sogenannte *telencephalon*-Element wurde genutzt, um transgene *Cre*-Mauslinien zu generieren. Von den 16 generierten *telencephalon-Cre* transgenen Mauslinien zeigten 7 eine ubiquitäre CRE-Rekombination, 2 konnten nicht erfolgreich verpaart werden und in 7 Linien konnte eine spezifische Expression im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Aber nur eine dieser 7 Mauslinien vererbte das Expressionsmuster stabil auf die Nachkommen weiter. Solche Unterschiede in der Expression können auf Integrationseffekte zurückgeführt werden. Ist der verwendete

Promotor nicht stark genug, um Umgebungseffekte oder strukturelle und chemische DNS Veränderungen auszugleichen, so wird ihre Expressionssteuerung beeinflusst (Übersicht in Dobie et al., 1997). Auch die Anzahl der in einem Locus inserierten Konstrukt kopien kann zu Variationen in der Stärke der Expression führen (Garrick et al., 1998; Henikoff et al., 1998).

Durch Kreuzen der stabilen *telencephalon-Cre* Mauslinie mit der *Cre*-Reportermauslinie *Z/AP* (Lobe et al., 1999) konnte das CRE-Rekombinationsmuster analysiert werden. Die *telencephalon-Cre* Mauslinie zeigt spezifische CRE-Rekombination in der Nasenhöhle, der Neuroretina, der optoemientialen Zone des Hypothalamus, sowie im Pons, Cerebellum, Tegmentum und Kortex. Das dokumentierte Rekombinationsmuster entspricht Teilen der in der Einleitung beschriebenen *Pax6*-Expression (Walther und Gruss, 1991; Stoykova und Gruss, 1994). Außerhalb von *Pax6* exprimierendem Gewebe wurde keine CRE-Rekombination beobachtet. Da aber nur wenige Vorläuferzellen im Kortex der transgenen Mäuse CRE-Aktivität haben, konnte diese Mauslinie nicht genutzt werden, um die Auswirkungen der *Pax6*-Überexpression auf die Morphologie des gesamten Kortex zu untersuchen. Dennoch kann diese Mauslinie zur Analyse der Zelllinien, die aus *Pax6* positiven Vorläuferzellen entstehen, genutzt werden (derzeit in Bearbeitung). Auch könnte sie eine konditionelle Inaktivierung von *Pax6* in den *Cre*-rekombinierten Bereichen wie dem Tegmentum, der externen germinalen Schicht des Cerebellums oder der optoemientialen Zone ermöglichen. Bisher wurden keine Promotoren für diese spezifischen Gehirnregionen identifiziert und somit konnte keine *Cre*-Mauslinien generiert werden. Wie die Ergebnisse ebenfalls zeigen, ist das Promotorelement, das die vollständige *Pax6*-Expression im Kortex steuert, noch nicht gefunden worden.

Stark konservierte, untranslatierte Sequenzen homologer Gene können Regulationsfunktion besitzen (Hardison, 2000). Funktionelle Analysen haben gezeigt, daß es sich bei dem *Pax6* Gen der Maus und des Menschen um echte Homologe handelt (Übersicht in Callaerts et al., 1997). Daher wurde die Gensequenz des *Pax6* Locus der Maus mit dem homologen *Pax6* Locus aus dem Menschen verglichen, um konservierte Elemente für eine Expression im Kortex zu finden. Das Programm VISTA (Mayor et al., 2000) bietet ein ausgezeichnetes Werkzeug, um große Genabschnitte (hier 33 kb) zu vergleichen. Ein, bezogen auf je 50 Basen-

paare, zu 50% bis 100% identischer und bisher nicht untersuchter Genabschnitt wurde im achten Intron gefunden. Aufgrund dieser hohen Konservierung wurde eine transgene Linie generiert, um das Steuerungspotential dieser Sequenz zu analysieren. In dem dabei verwendeten Konstrukt steuert das achte Intron mit dem P0-Minimalpromotor von *Pax6* über eine *IRES*-Sequenz die beiden Gene *Cre* und *gfp*. Durch das *Cre*-Gen ist eine frühe Expressionssteuerung über eine erfolgte CRE-Rekombination detektierbar und durch das *gfp*-Gen läßt sich *in utero* die Expression im jeweiligen Entwicklungsstadium dokumentieren. Wie die anschließende Analyse der so generierten *I8-Cre* Mauslinie zeigte, wird eine frühe CRE-Aktivität induziert. Bei E8.5 exprimieren die *I8-Cre*; *Z/AP* doppelt transgenen Embryonen schon ubiquitär *hPLAP*. Da die GFP-Fluoreszenz in diesem Stadium auf den ventralen Bereich der Kopffalte beschränkt ist und eine gleichzeitige Expression von *gfp* und *Cre* durch die *IRES*-Sequenz gewährleistet wird, deutet dies auf eine frühere CRE-Aktivität hin. Da *Pax6*-Expression auch in embryonalen Stammzellen der Maus zu finden ist (Mansouri, persönliche Mitteilungen), könnte die frühe CRE-Aktivität auf ein neu entdecktes *Pax6*-Element hindeuten, das die *Pax6*-Expression in den embryonalen Stammzellen steuert. Zwischen E1.5 bis E2.5 und E6.5 bis E7.5 konnte aber in *I8-Cre* transgenen Embryonen keine *gfp*-Expression nachgewiesen werden. So kann die *I8* induzierte Expression in diesen frühen Stadien entweder zu schwach für eine detektierbare GFP-Fluoreszenz sein, oder zwischen E2.5 bis E6.5 liegen. Bei E8.5 und darauffolgend wird die *gfp*-Expression spezifisch. Sie beginnt E8.0 in der ventralen Kopffalte und wird E9.5 im Rückenmark, im Metencephalon und in der Anlage des Thalamus sichtbar. E13.5 konnte die Expression zusätzlich in der Amigdalula und im Epithalamus dokumentiert werden. Mit Hilfe von Immunhistochemie konnte gezeigt werden, daß die *gfp*-Expressionsdomänen auch PAX6 positiv sind. Das Expressionsmuster des Reportergens *gfp* entspricht somit Teilen der *Pax6*-Expression. Mit dem *I8*-Element wurde ein neues Regulationselement von *Pax6* gefunden. Aufgrund der ubiquitären CRE-Rekombination, die schon E8.5 gefunden wurde, konnte diese Mauslinie aber nicht zur konditionalen Überexpression von *Pax6* genutzt werden.

Als nächstes wurde für eine gewebespezifische Steuerung der CRE-Rekombinaseaktivität in den *Pax6* positiven Vorläuferzellen des Kortex das *E1-*

ngn2-Element ausgewählt (Scardigli et al., 2001). Dieses Element ist eines von 4 Elementen des *ngn2* Gens, die Expression im zentralen Nervensystem der Maus steuern. Die Expressionsmuster der Gene *Pax6* und *ngn2* überlappen größtenteils. Bei der Inaktivierung von *Pax6* ist die *ngn2*-Expression besonders im ventralen Kortex inhibiert (Stoykova et al., 2000). Auch konnte gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor PAX6 an das *E1-ngn2*-Element bindet (Scardigli et al., 2001). *In vivo* wurde gezeigt, daß das *E1-ngn2*-Element im Kortex der Maus durch hohe Konzentrationen an *Pax6* aktiviert wird (Scardigli et al., 2003). Somit ist das *E1-ngn2* Element in den Zellen des Kortex aktiv, in denen das *Pax6* Gen stark exprimiert wird, vornehmlich im ventralen Kortex. Die mit diesem Element generierte *E1-ngn2-Cre* transgene Mauslinie zeigt die erwartete CRE-Rekombination. Im sich entwickelnden Kortex beginnt die Expression E10.5 im ventralen Bereich und weitet sich dann E13.5 dorsal aus, so daß E15.5 der gesamte Kortex betroffen ist. Weitere spezifische Expressionsdomänen sind im Rückenmark, Metencephalon und Diencephalon zu finden. Die dokumentierten rekombinierenden Bereiche entsprechen dem veröffentlichten *E1-ngn2* Expressionsmuster (Scardigli et al., 2001).

3.3 Pax6-Überexpression führt zu Apoptose und zur Bildung von Zellaggregaten

Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems in Säugetieren wird die Anzahl der Zellen durch Zellteilung und Apoptose, dem programmierten Zelltod, reguliert. Viele neuronale Zellpopulationen regulieren ihre Zellanzahl, indem sie zuerst viele Zellen generieren und anschließend die überschüssigen durch Apoptose absterben (Oppenheim et al., 1990). In manchen untersuchten postmitotischen Zellpopulationen sterben bis zu 50 % der generierten Zellen. Diese Apoptose ist davon abhängig, ob die Neurone vom Bestimmungsort (zum Beispiel Muskelgewebe, Drüsen oder andere Neurone) trophische Signale erhalten oder nicht (Williams und Herrup, 1988). Auch sterben die Neurone, wenn sie dazu gezwungen werden, in den Zellzyklus zurückzukehren (Herrup und Busser, 1995). Es wird daher angenommen, daß Nervenzellen, die die Kontrolle über den Zellzyklus verloren haben, durch Apoptose absterben. Kürzlich wurde sogar eine weitere Möglichkeit entdeckt, die Anzahl der Zellen in neuro-

nalem Gewebe zu regulieren. In *Drosophila* konnte nämlich gezeigt werden, daß auch die Anzahl der neuronalen Vorläuferzellen durch Apoptose reguliert wird. Hierbei konnte das Gen *Abdominal-A*, das zur Familie der *Hox* Gene gehört, als eines der Regulationsmoleküle identifiziert werden (Bello et al., 2003). Bisher konnte für *Pax6* keine Regulationsfunktion in der Apoptose nachgewiesen werden.

Wird *Pax6* mit der *E1-ngn2-Cre* Mauslinie in den kortikalen Vorläuferzellen im Stadium E9.5 überexprimiert, die schon eine sehr starke Expression an endogenem *Pax6* besitzen, so konnte kein Effekt auf die Apoptose detektiert werden (Abb 26). Mit Hilfe der Mauslinie *hGFAP-Cre* konnte *Pax6* ab E14.5 auch in den Vorläuferzellen überexprimiert werden, die eine schwache endogene *Pax6*-Expression haben (Walther und Gruss, 1991; Malatesta et al., 2003). In *JoP6; hGFAP-Cre* doppelt transgenem Kortex konnte eine massive Apoptose detektiert werden. Durch immunhistochemische Markierung mit Casp3-Antikörper wurde nachgewiesen, daß die Protease *Caspase3* aktiviert wird (Abb 19). Somit wurde gezeigt, daß die Apoptose über den Apoptosom-Weg durchgeführt wird (Übersicht in Kuan et al., 2000). Nach *Pax6*-Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie wird die Überexpression schon bei E10.5 in 88% der kortikalen Zellen induziert (Gorski et al., 2002). In diesem Stadium befinden sich im Kortex ausschließlich Vorläuferzellen. Sie exprimieren *Pax6* in einem Gradienten, der von gar keiner *Pax6*-Expression bis sehr starker *Pax6*-Expression reicht. Auch hier wurde eine massive Apoptose gefunden. Mit Hilfe beider *Cre*-Mauslinien kann die Apoptose auf *Pax6* exprimierende Vorläuferzellen sowohl im Stadium E10.5 als auch E14.5 lokalisiert werden.

Heins und Mitarbeiter konnten *in vitro* nach *Pax6*-Überexpression in *Pax6* positiven Vorläuferzellen keine Apoptose feststellen (Heins et al., 2002). Dies kann vermutlich auf die Behandlungen der Zellen *in vitro* zurückgeführt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß bei der *Pax6*-Überexpression in der Zellkultur andere Konzentrationen an *Pax6* erreicht wurden als *in vivo*. Yamaoka und Mitarbeiter dagegen konnten nach der *Pax6*-Überexpression in den Inselzellen des Pankreas *in vivo* ebenfalls Apoptose dokumentieren (Yamaoka et al., 2000).

Nach der Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie in endogen schwach *Pax6* positiven Zellen konnten Zellaggregate dokumentiert werden, die nicht im *JoP6; El-ngn2-Cre* doppelt transgenen Kortex oder im Wildtyp-Kortex gefunden wurden (Abb 24). Zellaggregate mit der gleichen Morphologie konnten auch für die Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie gezeigt werden.

Eine genauere Analyse der Zellaggregate zeigte, daß die Aggregate negativ für *Tuj1* und für *ki67* sind (Abb 21 und 24). *Tuj1* ist der erste Marker, den neu generierte Neurone exprimieren. Die Zellaggregate differenzieren sich also nicht in Neurone. *ki67* wird von den Zellen exprimiert, die sich in einem aktiven Zyklus der Zellteilung befinden. Die Zellen der Zellaggregate befinden sich also in der postmitotischen G₀-Phase. Dagegen konnte dokumentiert werden, daß sie positiv für die TUNEL-Reaktion sind, also durch Apoptose absterben (Abb 21). Es ist daher wahrscheinlich, daß einige Vorläuferzellen nach *Pax6*-Überexpression sowohl ihre Zellteilungs- als auch ihre Zelladhäsionseigenschaften verändern und aufgrund dessen durch Apoptose abgetötet werden.

Auch nach *Pax6*-Inaktivierung wurden Veränderungen in der Zelladhäsion gefunden. Nach *Pax6*-Inaktivierung treten ähnliche Phänotypen auf wie nach der *Pax6*-Überexpression. Im Auge konnten Schedl und Mitarbeiter ebenfalls dokumentieren, daß nach *Pax6*-Überexpression ähnliche Phänotypen auftreten, wie nach *Pax6*-Inaktivierung (Schedl et al., 1996). In Linsen mit *Pax6*-Inaktivierung konnten Chauhan und Mitarbeiter mit einer cDNA-Mikroarray-Analyse Veränderungen in der Expression verschiedener Zelladhäsionsproteine finden (Chauhan et al., 2002). Unter anderem waren die Zelloberflächenmoleküle *Paralemmin* und *TangerinA* mißreguliert. In kultivierten, *Pax6* inaktivierten Zellen wurden ebenfalls Zellaggregate beobachtet (Götz et al., 1998) und in Aggregationsversuchen wurde dargelegt, daß sich kortikale Zellen mit *Pax6*-Inaktivierung von den kortikalen Zellen des Wildtyps abtrennen (Stoykova et al., 1997). In Experimenten mit Wildtyp-*Small eye*-Transplantationen konnte dieses Segregationsverhalten bestätigt werden (Tyas et al., 2003). Zusätzlich ist *tenascin-C*, ein Molekül der extrazellulären Matrix, im Kortex von *Small eye* nicht mehr vorhanden und die Expression des zelladhäsiven Moleküls *R-Cadherin* herunterreguliert (Stoykova et al., 1997). Die veröffentlichten und die in dieser Arbeit dargestellten Daten unterstützen somit die Hypothese, daß *Pax6*

einen zellautonomen Effekt auf die Adhäsionseigenschaften der Vorläuferzellen und deren Tochterzellen in der Kortikogenese hat. Somit spielt *Pax6* eine bedeutende Rolle in der Regulation der Zellinteraktion.

Auch in Wildtyp-*Small eye* Chimären wurden Zellaggregate beobachtet, die sich an der Grenze zwischen der subventrikularen und der intermediären Zone sammeln (Talamillo et al., 2003). An dieser Zonengrenze wird die Wanderung der Neurone kurz angehalten, so daß die Neurone möglicherweise eine transitorische Phase durchlaufen (Bayer und Altman, 1991). Interessanterweise wurde nach *Pax6*-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie ebenfalls die Akkumulation der Zellaggregate in der gleichen Region gefunden (Abb.24). Allerdings scheinen sich die Zellaggregate, die durch *Pax6*-Inaktivierung gebildet werden, in Neurone zu differenzieren (Talamillo et al., 2003), während diejenigen, die sich nach *Pax6*-Überexpression bilden, durch Apoptose absterben. Dennoch deuten beide Daten auf eine Funktion für *Pax6* in der Zellwanderung von der subventrikularen Zone in die intermediäre Zone hin.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß radiale Gliazellen sowohl Gliazellen als auch Neurone bilden (Übersicht in Campbell und Götz, 2002). *In vivo* sind die Neurone, die von *Pax6* inaktivierten radialen Gliazellen abstammen um 50% reduziert (Heins et al., 2002). Wird *Pax6 in vitro* in radialen Gliazellen überexprimiert, so wird die Proliferation inhibiert und es werden verstärkt neuronale, im Gegensatz zu nicht neuronalen, Klone gebildet. Nach *Pax6*-Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie *in vivo* wurden viele Zellen am apikalen Rand der ventrikularen Zone entdeckt, die den frühen neuronalen Marker *Tuj1* exprimieren (Abb 21). Dies könnte auf eine frühe Initialisierung der neuronalen Differenzierung nach *Pax6*-Überexpression zurückzuführen sein.

3.4 *Pax6* in der funktionellen Determination der kortikalen Schichten

Der sich entwickelnde Kortex ist ein nützliches System, um die Determination der Neurone im zentralen Nervensystem der Säugetiere zu studieren. Der Kortex besitzt sechs verschiedene Schichten. Die Neurone einer einzelnen Schicht ähneln sich in Morphologie, physischen Eigenschaften und Muster der Axonenverbindungen. Auch sind die Neurone einer Schicht im gleichen Zeitfenster der

Entwicklung entstanden (Bayer und Altman, 1991). Es wird angenommen, daß die Schichtenzugehörigkeit eines neuen Neurons früh in der Entwicklung während der S-Phase des letzten mitotischen Zyklusses der Vorläuferzelle festgelegt wird (Caviness et al., 1982; McConnell, 1985; Rakic, 1988). Der Mechanismus, der diese Determination der Neurone vornimmt, ist aber noch nicht nachgewiesen worden.

Mit Hilfe einer konditionalen Strategie konnte *in vivo* gezeigt werden, daß eine Überexpression von *Pax6* in kortikalen Vorläuferzellen zu schweren Mißbildungen des Kortex führt. Dabei wurde mit den beiden *Cre*-Mauslinien *hGFAP-Cre* und *Emx1-Cre* ein ähnlicher Phänotyp erhalten: Es wurde sowohl ein kleinerer als auch ein dünnerer Kortex gefunden, wobei die Supra-Granulatschichten stärker als die Infra-Granulatschichten betroffen war. In den frühen (E10-E14) Vorläuferzellen, die die Infra-Granulatschichten bilden (Schichten IV und V), ist *Pax6* stark exprimiert. In der Entwicklung wird nach E14 die *Pax6*-Expression stark reduziert (Walther und Gruss, 1991; Stoykova und Gruss, 1994). Deswegen ist die *Pax6*-Expression deutlich geringer in den späten (E14 - E17) Vorläuferzellen, die die Supra-Granulatschichten bilden. Die kortikalen Vorläuferzellen sind demnach heterogen. Basierend auf der Expression spezifischer Marker (RC2, Nestin, GLAST, BLBP) und *Pax6* können die Vorläuferzellen in zwei verschiedene Populationen untergeteilt werden (Hartfuss et al., 2001; Heins et al., 2002; Malatesta et al., 2003): Die erste Population wird von den nicht radialen Gliazellen gebildet (30%), die nicht *Pax6* exprimieren. Die andere Population ist die der radialen Gliazellen (70%), die abhängig von der *Pax6*-Expression in zwei weitere Subpopulationen eingeteilt werden können: 80% sind *Pax6* positiv und 20% sind *Pax6* negativ.

Die *Emx1-Cre* Mauslinie dirigiert die CRE-Rekombination in 88% der Vorläuferzellen (Gorski et al., 2002). Somit wird die *Pax6*-Überexpression in allen drei Populationen der Vorläuferzellen angeschaltet. In den *Pax6* negativen nicht radialen Gliazellen und in den *Pax6* negativen radialen Gliazellen wird eine ektopische *Pax6*-Expression aktiviert, während in den *Pax6* positiven radialen Gliazellen eine *Pax6*-Überexpression angeschaltet wird. Wird *Pax6* mit der *E1-*ngn2*-Cre* Mauslinie überexprimiert, so konnte keine Apoptose detektiert werden. Demnach wurden die frühen *Pax6* und *ngn2* positiven Vorläuferzellen, die eine

starke endogene *Pax6*-Expression haben, von der *Pax6*-Überexpression nicht beeinflusst. Tatsächlich konnte mit der *E1-ngn2-Cre* Mauslinie bei E18.5 eine stärkere Expression des *lacZ*-Reporters in den postmitotischen Zellen der kortikalen Platte, als in den anderen beiden Cre-Mauslinien dokumentiert werden. Die Daten deuten darauf hin, daß die frühen Vorläuferzellen, die endogenes *Pax6* stark exprimieren, von der *Pax6*-Überexpression nicht betroffen sind. Deswegen sind die Infra-Granulatschichten wenig von der *Pax6*-Überexpression beeinflusst. Nach *Pax6*-Überexpression mit der *Emx1-Cre* Mauslinie wurde eine regionalisierte, massive Apoptose in den frühen kortikalen Vorläuferzellen in dem medialen, dorsalen und lateralen Kortex gefunden. Diese Regionen exprimieren wesentlich weniger *Pax6* als die *ngn2* positiven Vorläuferzellen des ventralen und lateralen Kortex (Muzio et al., 2002). Somit wurde die Apoptose, die bei E11.5 detektiert wurde, auf drei unterschiedliche Populationen an Vorläuferzellen lokalisiert: Die *Pax6* negativen nicht radialen Gliazellen, die *Pax6* negativen radialen Gliazellen und auf die schwach *Pax6* positiven radialen Gliazellen. Die Verkleinerung der Supra-Granulatschichten nach *Pax6*-Überexpression könnte daher auf zwei mögliche Gründe zurückgeführt werden: a.) Entweder stirbt ein Teil der Zellen von allen drei oben genannten Zellpopulationen und kann dann nicht mehr die Supra-Granulatschichten bilden, oder b.) wenn die endogene *Pax6* Expression bei E14.5 deutlich abnimmt, kann die induzierte *Pax6*-Überexpression von den *Pax6* positiven radialen Gliazellen nicht mehr toleriert werden und die Zellen sterben, ohne die Supra-Granulatschichten zu bilden. Die Daten, die mit Hilfe der *hGFAP-Cre* Mauslinie gewonnen wurden, unterstützen die zweite Möglichkeit.

Die quantitative Analyse der kortikalen Vorläuferzellen der *Pax6* Nullmutanten *Small eye* konnte ebenfalls zeigen, daß die nicht radialen Gliazellen und die *Pax6* negativen radialen Gliazellen nicht von der Abwesenheit von *Pax6* betroffen waren. Ähnlich dazu wurde nach viraler *Pax6*-Überexpression *in vitro* eine spezifische Verstärkung der neurogenen Kapazität in den *Pax6* positiven radialen Gliazellen erhalten (Heins et al., 2002). Dazu passend konnte auch in den beschriebenen Experimenten festgestellt werden, daß die *Pax6*-Überexpression in erster Linie in den *Pax6* positiven radialen Gliazellen die Bildung der Supra-Granulatschichten beeinflusst.

Um den Effekt der *Pax6*-Überexpression spezifisch in den späten, *Pax6* positiven radialen Gliazellen zu untersuchen, wurde die *hGFAP-Cre* Mauslinie benutzt (Zhuo et al., 2001). Mit dieser *Cre*-Mauslinie wird die CRE-Rekombination ausschließlich in den späten radialen Gliazellen (zwei Drittel der Vorläuferzellen) gesteuert, so daß die nicht radialen Gliazellen (ein Drittel der Vorläuferzellen) nicht von der Rekombination betroffen sind (Malatesta et al., 2003). Diese späten radialen Gliazellen wiederum sind zu 80% *Pax6* positiv und zu 20% *Pax6* negativ. Mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie wurde nach *Pax6*-Überexpression eine massive Apoptose und eine Mißbildung besonders der Supra-Granulatschichten im Vergleich zu Infra-Granulatschichten detektiert. Die Population der *Pax6* negativen radialen Gliazellen beträgt nur 20% der radialen Gliazellen. Nach der *Pax6*-Überexpression mit der *hGFAP-Cre* Mauslinie wurde aber eine massive Apoptose nachgewiesen. Deswegen läßt sich darauf schließen, daß die Apoptose hauptsächlich in den *Pax6* positiven radialen Gliazellen, die die Supra-Granulatschichten aufbauen, stattfindet. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß die späten *Pax6* positiven radialen Gliazellen eine geringe Konzentration an PAX6 benötigen, um die Supra-Granulatschichten bilden zu können. Wird die PAX6 Konzentration in diesen Zellen erhöht, so reagieren sie mit Apoptose.

Bisher konnte *Pax6* nicht in postmitotischen Zellen des Kortex lokalisiert werden. Nach einer erfolgten CRE-Rekombination in den Vorläuferzellen, ist die *Pax6*-Überexpression in den entsprechenden postmitotischen Tochterzellen vorhanden. Interessanterweise wurde nach der *Pax6*-Überexpression mit den drei *Cre*-Mauslinien immunhistochemisch keine Apoptose in den postmitotischen Zellen des Kortex detektiert. Dies zeigt, daß im Gegensatz zu den kortikalen Vorläuferzellen, die postmitotischen kortikalen Neurone nicht auf die *Pax6*-Überexpression reagieren. Mit Hilfe der *CaMKII-Cre* Mauslinie (Dragatsis et al., 2000) könnte getestet werden, welchen Effekt eine direkte *Pax6*-Überexpression auf die postmitotischen Zellen nach der Geburt hat.

Zusammenfassend wurde nach dem Gebrauch von drei verschiedenen *Cre*-Mauslinien gezeigt, daß die frühen und die späten *Pax6* positiven radialen Gliazellen (die entweder *Pax6* stark oder schwach exprimieren) verschiedene Toleranz zu der *Pax6*-Expression zeigen. Auch in der *Pax6* Nullmutanten *Small*

eye (Caric et al., 1997; Tarabykin et al., 2001), sowie nach konditionaler Inaktivierung von *Pax6* wurde gezeigt (Stoykova, persönliche Mitteilung), daß die Generierung der Supra-Granulatschichten stärker als die Infra-Granulatschichten betroffen sind. Daraus kann geschlossen werden, daß es für die kortikalen Vorläuferzellen wichtig ist, die Expressionsstärke an *Pax6* zu regulieren, hauptsächlich um die Supra-Granulatschichten bilden zu können.

Zwei mögliche Modelle können diskutiert werden, um die genannten Effekte von *Pax6* auf die Schichten des Kortex zu erklären. Das erste Modell ist das "Kompetenz-Modell". Nach diesem Modell durchlaufen die neuronalen Vorläuferzellen intrinsisch definierte "Kompetenz-Stadien", wodurch die Vorläufer in einem bestimmten "Kompetenz-Stadium" nur eine bestimmte Subpopulation von Zellarten generieren können. So konnte in *Drosophila* gezeigt werden, daß die unterschiedlichen "Kompetenz-Stadien" durch die sequenzielle Expression der voneinander unabhängigen Transkriptionsfaktoren *Hunchback* - *Krüppel* - *Pdm* - *Castor* definiert werden. Diese Faktoren sind dabei notwendig und hinreichend, um die jeweilige Zellart festzulegen (Isshiki et al., 2001). Extrinsische Einflüsse können zwar die Anzahl der Zellen, aber nicht die Art der Zellen beeinflussen. Dies wurde ebenfalls bei der konditionalen Inaktivierung von *Pax6* in der Neuroretina gefunden (Marquardt et al., 2001). In der Abwesenheit von *Pax6* werden in der Neuroretina anstatt der sechs verschiedenen Zellarten nur die Amakrinzellen gebildet. Auch die kortikalen Vorläuferzellen besitzen eine solche intrinsische Determination. Werden kortikale Vorläuferzellen kultiviert, so bilden sie immer zuerst Neuroblasten und erst anschließend Glioblasten (Qian et al., 1998). Die molekularen Mechanismen, die diese Determination steuern sind größtenteils nicht näher erforscht. Eine Möglichkeit besteht darin, daß unterschiedliche Konzentrationen an *Pax6* in den frühen und den späten kortikalen Vorläuferzellen festlegen, in welchem Kompetenz-Stadium sich die Zelle befindet: Eine hohe Konzentration an PAX6 in den frühen Vorläuferzellen läßt die Infra-Granulatschichten entstehen, während durch eine niedrige Konzentration an PAX6 in den späten Vorläuferzellen die Supra-Granulatschichten gebildet werden. Diese Hypothese wird aber nicht durch die nach *Pax6*-Überexpression gewonnenen Daten unterstützt. Würde eine hohe Konzentration an PAX6 in den

Vorläuferzellen zur Bildung der Infra-Granulatschichten führen, so sollte nach der konditionalen *Pax6*-Überexpression während der gesamten Entwicklung ausschließlich die Infra-Granulatschichten gebildet werden. Stattdessen sind aber alle Schichten des Kortex nach *Pax6*-Überexpression dünner als im Wildtyp-Kortex, wobei die Supra-Granulatschichten stärker betroffen sind.

Das andere Modell besagt, daß die Determination der kortikalen Vorläuferzellen durch den Zellzyklus bestimmt wird (Übersicht in Cremisi et al., 2003). In der Maus werden die Schichten des Kortex zwischen E11 und E17 gebildet. Dabei durchläuft eine Vorläuferzelle 11 Zellzyklen (Takahashi et al., 1995). Die Neurone der Schichten VI und Vb werden von den ersten drei Zellzyklen gebildet, die Schichten Va, IV und III von den Zellzyklen 4 - 8 und die Schichten IIIa und II von den letzten drei Zellzyklen. Damit entstehen die einzelnen Schichten zu bestimmten Entwicklungsstadien, wobei sich allerdings die Bildungen dieser Schichten zeitlich überlappen. So werden schon Zellen für die nächste Schicht gebildet, wenn die vorhergehende Schicht noch nicht abgeschlossen ist.

Fehlt den kortikalen Vorläuferzellen *Pax6*, so haben sie Defekte in der Morphologie, im Zellzyklus und im Expressionsmuster (Stoykova et al., 1997; Götz et al., 1998; Warren et al., 1999). Bei E12.5 wurde ein verkürzter Zellzyklus und eine verfrühte Neurogenese festgestellt, während bei E15.5 der Zellzyklus, aufgrund einer ausgedehnten S-Phase, verlängert ist (Estivill-Torres et al., 2002). Aufgrund dieser Daten wird vermutet, daß *Pax6* durch seine starke Expression in frühen und seine schwache Expression in späten Vorläuferzellen den Zellzyklus beeinflusst und so die Kortikogenese steuert. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse unterstützen diese These. Obwohl die *Pax6*-Überexpression die ganze Kortikogenese beibehalten wurde (ab E10.5 mit *Emx1-Cre*), sind in erster Linie die Supra-Granulatschichten betroffen, die von schwach *Pax6* exprimierenden, späten Vorläuferzellen gebildet werden.

Mit der Überexpression von *p27^{kip1}* konnte zum ersten Mal direkt gezeigt werden, daß die Länge des Zellzyklusses in den Vorläuferzellen festlegt, welche Kortexschicht die Tochterzellen bilden (Mitsubishi et al., 2001). *p27^{kip1}* reguliert in den kortikalen Vorläuferzellen den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklusses und wird zwischen E12.5 und E14.5 in der Mitte der Kortiko-

genese exprimiert, wenn die Schichten VI, Va und IV generiert werden. Nach Überexpression von *p27^{kip1}* sind aber besonders die Supra-Granulatschichten (Schichten IV, III und II) dünner als im Wildtyp-Kortex (Caviness et al., 2003). Die Infra-Granulatschichten sind dagegen kaum betroffen. Somit konnte gezeigt werden, daß durch eine Veränderung des Zellzyklusses der Vorläuferzellen sowohl die Anzahl der generierten Zellen in einem bestimmten Zeitabschnitt, als auch die Zugehörigkeit der Tochterzellen zu einer bestimmten Kortexschicht beeinflußt wird. Damit korreliert der Zellzyklus der Vorläuferzellen mit der Schichtzugehörigkeit der Tochterzellen. Daß nach *Pax6*-Überexpression die Schichtenbildung des Kortex gestört ist, läßt somit auf eine Steuerung des Zellzyklusses der kortikalen Vorläuferzellen durch *Pax6* schließen. Die in dieser Arbeit entwickelte Strategie zur Überexpression von *Pax6* kann als Werkzeug benutzt werden, um den kausalen Zusammenhang zwischen *Pax6* und dem Zellzyklus der kortikalen Vorläuferzellen und deren interaktive Partner zu identifizieren.

4. Material und Methoden

4.1 Abkürzungen und Symbole

Soweit die Abkürzungen nicht im Text erläutert sind, wurden sie hier aufgelistet:

%	Prozent
bp	Basenpaare
c	centi
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Zählerimpulse pro Minute
dATP	Desoxyadenosin triphosphat
dCTP	Desoxycytidin triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin triphosphat
dTTP	Desoxythymidin triphosphat
d	destilliert
dd	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid triphosphat
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
F	Faraday
FCS	Fetales Kälberserum
g	(Gramm 2) Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktopyranosid
IRES	interne ribosomale Bindestelle
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
l	Liter
m	milli
M	molar
m	mikro
MCS	Klonierungsstelle mit multiplen Restriktions-

Material und Methoden

min	schnittstellen
n	Minuten
OD	nano
p	optische Dichte
p.c.	pico
PCR	post coitum
	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium dodecylsulfat
s	Sekunden
SSC	NaCl/NaCitratlösung
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino methan
u	Enzymaktivität
UV	ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indonyl-b-D-galaktosid

4.2 Material

4.2.1 Oligonukleotide

CRFP 5'-gagctgcagcatgccaagaagaagagg-3'

CRRS 5'-gctgccggctaatcgccattccagca-3'

P6.7forN 5'-gggggctgctagcatccaggacactccg-3'

P6.8revP 5'-taatgtgtctgcagggcggctcgcct-3'

P6.13revP 5'-gggaagtagcagatctgcagaccgggttcta-3'

P6.14forN 5'-gctggcctaagagctagcacagtgggatccg-3'

P6.25F 5'-agcactcagtcactggctgcaa-3'

P6.28R 5'-tggcagccatctgcaacaaaag-3'

P6.32SfiI 5'-gagaaggcctctggggccagggggcaagata-3'

P6.30NheI 5'-aaaagctagcggagcaggaaaatggcatt-3'

GR1 5'-ggaattccccagctgtttcttcgacctca-3'

GF2 5'-ggaattcataacttcgtataatgtatgcatacgaagtatatggtagcaaggcgagagctg-3'

Linkera 5'-ctcaggggttccttagccgcggccgcgtcgac-3'

Linkerb 5'-agctgtcgacggccgcggctaaaggaacctcgagtga-3'

flox1 5'-tcgataacttcgtataatgtatgcatacgaagtatatcagggggc-3'

flox2 5'-ggccgccccctcgagataacttcgtatagcattatcgaaggtta-3'

cP6RXh 5'-ccgctc gaggctgtaatc gag gcc agtactg-3'

cP6FXh 5'-accgctc gagatgcagaacagtcacagcggagtg-3'

JoP6F 5'-cctggcaacgtgctggtattgtgctg-3'

JoP6R 5'-cacaaccgttgatacctgcagaattcgg-3'

4.2.2 Plasmide

pSl1180 (Pharmacia):

3422 bp Superlinker-Plasmidvektor mit 64 Restriktionsstellen in der MCS, Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase), colE1-ori, M13-ori, lacI-Bindestelle, lacZ-Sequenz unterbrochen durch MCS.

pBSIIKS⁺(Stratagene):

2961 bp Phagemidvektor, Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase), colE1-ori, f1(+)-ori, lacZ-Sequenz unterbrochen durch MCS, MCS flankiert von T3 und T7-Promotor.

pT-Adv (Clontech):

3.9 kb Plasmidvektor mit überhängenden Thymidinnukleotiden zur Klonierung von PCR Amplifikaten in der MCS, Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase), colE1-ori und M13-ori.

pIRES-eGFP (Clontech):

Dieser 5,2 kb Expressionsvektor enthält eine IRES zwischen der MCS und dem eGFP Leseraster.

4.2.3 Plasmidkonstrukte

pPGK-Cre(NLS)-bpA (Fellenberg und Rajewsky, 1996):

Im Vektor pPGK lag das Leseraster der CRE-Rekombinase des Bakteriophagen P1 vor, welches über PCR mit dem NLS (Nukleärem Lokalisations Signal) des großen T-Antigens des SV40-Virus versehen wurde. Cre-NLS wurde zwischen einem pA-Signal und dem pgk-Promotor inseriert.

pSl1180-IRES-gfp-intron-pA (Ashery-Padan et al., 2000):

Besteht aus 2,2 kb IRES-gfp-intron-pA-Kassette, kloniert SacII-XhoI in pSl1180. Die 0,8 kb IRES (internal ribosomal entry site) stammt aus dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)-Virus. Der 716 bp gfp-Leseraster ist durch gezielte Mutagenese sequenz-humanisiert worden (Zernicka-Goetz et al. 1997). Das Intron

stammt aus dem Intron2 des β -globulin-Lokus aus Kaninchen. Die 0,3 kb *polyA* (pA)-Signal stammt aus dem SV40-Virus.

psl1180-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Die Oligonukleotide CRFP und CRRS amplifizieren das Leseraster der NLS-CRE-Rekombinase mit Hilfe des Vektors pPGK-Cre(NLS)-bpA (Fellenberg und Rajewsky, 1996). Das Amplifikat wurde mit PstI und SacII in PstI-SacII von psl1180-IRES-gfp-intron-pA kloniert.

psl1180-P1-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Der P1-Minimalpromotor von *Pax6* wurde durch PCR mit den Primern P6.7forN und P6.8revP auf dem Plasmid p6sg18 amplifiziert und in die NheI und PstI Spaltstellen von psl1180-Cre-IRES-gfp-intron-pA ligiert.

pTelCre (diese Arbeit):

Das erste Intron von *Pax6*, das das *telencephalon*-Element enthält, wurde mit BamHI aus dem Plasmid p6sg18 herausgespalten, der Restriktionsüberhang mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt und in die ebenfalls aufgefüllte NheI Spaltstelle von psl1180-P1-Cre-IRES-gfp-intron-pA inseriert. Das resultierende Konstrukt wird im folgenden als pTelCre bezeichnet.

psl1180-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Mit den Oligonukleotiden P6.7forN und P6.8revP wurde der P1-Minimalpromotor von *Pax6* auf dem Plasmid p6sg18 (Walther und Gruss, 1991) amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit NheI und PstI in NheI-PstI von psl1180-Cre-IRES-gfp-intron-pA kloniert.

psl1180-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Mit den Oligonukleotiden P6.13revP und P6.14forN wurde der P0-Minimalpromotor von *Pax6* auf dem Plasmid p6sg21 (Walther und Gruss, 1991) amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit NheI und PstI in NheI-PstI von psl1180-Cre-IRES-gfp-intron-pA kloniert.

p6sg18 (Walther und Gruss, 1991):

Ein 8,4 kb genomisches Fragment vom *Pax6* Locus wurde mit EcoRI in pBSIIKS+ kloniert.

p6sg21 (Walther und Gruss, 1991):

Ein 1,5 kb genomisches Fragment vom *Pax6* Locus wurde mit SalI und EcoRI in pBSIIKS+ kloniert. Es enthält das Exon 0 sowie den 5' Bereich von *Pax6*.

p6sg22 (Walther und Gruss, 1991):

Ein 5,5 kb genomisches Fragment vom *Pax6* Locus wurde mit EcoRI in pBSIIKS+ kloniert. Es liegt 5' vom Insert in p6sg18.

pJ (diese Arbeit):

Aus dem Vektor p6sg18 (Walther und Gruss, 1991) wurde das *telencephalon*-Element (Kammandel et al., 1999) von *Pax6* mit BamHI herausgespalten und in NheI (aufgefüllt) von psl1180-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA kloniert.

psl1180-I7a-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Mit den Oligonukleotiden P6.32SfiI und P6.30NheI auf dem Vektor p6sg22 wurde das 3'-Ende des achten Introns von *Pax6* mit PCR amplifiziert und in den Vektor pT-Adv kloniert. Mit NotI (aufgefüllt) und NheI wurde die genomische Sequenz wieder herausgespalten und in SmaI-NheI von psl1180-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA inseriert.

psl1180-I7-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Die Oligonukleotide P6.25F und P6.28R amplifizieren mit PCR ein 3 kb Fragment vom achten *Pax6* Intron, das in pT-Adv kloniert wurde. Das Fragment wurde mit XbaI wieder herausgespalten und in NheI von psl1180-I7a-P0-Cre-IRES-gfp-intron-pA kloniert.

pE1- β -globinpro::LacZpA (Scardigli et al., 2001):

Dieser Vektor enthält ein 1758 bp umfassendes genomisches Fragment, *E1-ngn2*, aus der 5'-Region des *ngn2* Promotors, das mit dem β -globulin Minimalpromotor aus Kaninchen dem *lacZ*-Reportergen vorliegt.

psl1180-min-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Der β -globulin Minimalpromotor wurde mit PstI aus pE1- β -globinpro::LacZpA herausgespalten und mit PstI in psl1180-Cre-IRES-gfp-intron-pA inseriert.

psl1180-E1ngn2-Cre-IRES-gfp-intron-pA (diese Arbeit):

Das *E1-ngn2* Element wurde mit NotI aus dem Plasmid pE1- β -globinpro::LacZpA herausgespalten und in psl1180-min-Cre-IRES-gfp-intron-pA inseriert (Scardigli et al., 2001).

pCAGGS (Niwa et al., 1991):

Der Vektor enthält einen Fusionspromotor aus dem *CMV* und dem β -actin Promotor aus dem Huhn. Darauf folgt eine Intronsequenz, eine MCS und das β -globin *polyA* aus Kaninchen.

pKC253 (Chowdhury, dieses Labor):

Dieser Plasmidvektor enthält eine *IRES*, die vor *LacZ* und *pA* kloniert ist.

pJojo1 (diese Arbeit):

Das PCR Amplifikat der Oligonukleotide GR1 und GF2 auf dem Vektor pIRES-eGFP wurde mit EcoRI gespalten und in EcoRI von pCAGGS (Niwa et al. 1991) kloniert.

pJojo2 (diese Arbeit):

Die Oligonukleotide Linkera und Linkerb wurden phosphoryliert und hybridisiert. Das erhaltene Fragment wurde in die PstI und HindIII Spaltstelle von pJojo1 inseriert.

pJojo3 (diese Arbeit):

Die Oligonukleotide flox1 und flox2 wurden phosphoryliert und hybridisiert. Das erhaltene Fragment wurde in die SalI Spaltstelle von pJojo2 inseriert.

pJojo (diese Arbeit):

Aus dem Plasmidvektor pKC253 wurde die IRES und das LacZ Leseraster mit XhoI und NotI herausgespalten und in XhoI und NotI von pJojo3 kloniert.

pCMV-Pax6 (pCMV-Pax6-intron-pA; L. St.Onge, dieses Labor):

Das Leseraster der *Pax6*-cDNA (Walther et al., 1991) lag als EcoRI-Fragment zwischen einem *CMV*-Promotor und dem zweiten Intron2 des Kaninchen-b-globin-Lokus plus *polyA* in pKSII vor.

pJoP6 (diese Arbeit):

Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden cP6RXh und cP6FXh wurde das Leseraster von *Pax6* mit dem Plasmid pCMV-Pax6 amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit XhoI gespalten und in XhoI von pJojo inseriert.

4.2.4 DNA-Längenstandards

l-DNA, BstEII-Restriktionsverdau: 0,7-14,1kb: 702, 1264, 1371, 1929, 2323, 3675, 4324, 4822, 5686, 6369, 7242, 8454, 14140 bp

100 bp Leiter (Roche): 100 -1500 bp, 2642 bp

1 kb Leiter (Roche): 0,07-12,2 kb: 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216 bp

4.2.5 Bakterienstämme

E. coli DH5a (Stratagene): Genotyp: supE44 lacU169 hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

E. coli Xl-1 Blue (Stratagene): Genotyp: supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F'[proAB⁺ lacI^q lacZ DM15 Tn10(tet^r)]

E. coli STBL2 (Gibco): Genotyp: F'mcrA D(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 gyrA96 thi supE44 relA111 D(lac-proAB)

E. coli 294-Cre (Buchholz et al., 1996): F⁻, λ⁻, supE44, endA1, thi-1, hsdR17, lacZ::cI857-Cre

4.2.6 Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml in dH₂O, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert. Ampicillin in Nährmedien wurde in der Regel in einer Konzentration von 50 mg/ml eingesetzt.

4.2.7 Nährmedien

LB (Luria-Bertani-) Medium:

10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, 950 ml dH₂O.

TB-Medium:

12 g Bacto-Trypton, 24g Bacto-Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, 900 ml dH₂O;

Nach Abkühlen auf 60°C erfolgt Zugabe von sterilen: 10 ml 250 mM KCl (pH7,0), 5ml 2M MgCl₂.

SOC-Medium:

2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl

100 ml dH₂O; 20 min autoklavieren, anschließend erfolgt die Zugabe folgender sterilfiltrierter Lösungen: 1 ml 1M MgCl₂, 1 ml 1M MgSO₄, 1 ml 2M Glukose.

LB-Platten:

10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, 950 ml H₂O; 20 min autoklavieren, Zugabe von Ampicillin erfolgt nach Abkühlen des Mediums auf unter 70°C.

4.2.8 Puffer und Lösungen

Blot1 (Denaturierungspuffer): 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

Material und Methoden

Blot2 (Renaturierungspuffer): 1,0 M Tris, pH 8,0, 1,5 M NaCl

Chloroform/Isomylalkohol: Im Verhältnis 24:1 gemischt

10X Denhardt's: 2% Bovines Serumalbumin, 2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrolidin,
Lagerung bei -20°C

dNTP-Stammlösung: jeweils 660 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in dH₂O,
Lagerung bei -20°C

0,5M EDTA pH 8,0: Stammlösung in dH₂O, pH mit NaOH eingestellt, autoklaviert

Ethidiumbromidlösung (10mg/ml): 1g/100ml dH₂O, für mehrere Stunden unter Rühren gelöst, Lagerung im Dunkeln bei 4°C

FCS (Fetales Kälberserum): FCS (Gibco) wurde bei 4°C aufgetaut, für 30 min bei 56°C inkubiert und bei -20°C gelagert.

Lösung A (Resuspendierungspuffer): 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA

Lösung B (Lysispuffer): 200 mM NaOH, 1% SDS

Lösung C (Neutralisierungspuffer): 3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5, Lagerung bei 4°C

2M MgCl₂: Stammlösung in dH₂O, autoklaviert

Mowiol: 9,6 g Mowiol, 24,0 g Glycerol in 24 ml dH₂O, 1 h rühren; 48 ml 0,2 M Tris, pH8,5, 20 min rühren; 50°C; Abzentrifugieren, 1000 g; Überstand bei -20°C lagern.

5M NaCl: Stammlösung in dH₂O, autoklaviert

P-30-Suspension: Biogel P-30 (Biorad) in 50 mM HEPES (pH 6,0) suspendiert und autoklaviert.

10x PBS: 1,3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄*2H₂O, pH 7,0

1x PBST: 0,2% NP-40, 0,01% DOC, 1xPBS in dH₂O

4% PFA/PBS: 10g PFA in 250 ml 1xPBS gelöst, bei 4°C gelagert.

Phenol/Chloroform/Isomylalkohol: Im Verhältnis 25:24:1, Die Lösung wurde vor Gebrauch mit TE-Puffer gesättigt und auf pH 7,5 gebracht

10% SDS: 10g SDS bei 68°C mit dH₂O auf 100ml Endvolumen, mit HCl auf pH 7,2, autoklaviert

Saline: 0,86% NaCl in dH₂O

20X SSPE: 175,3 g NaCl, 27,6 g NaH₂PO₄*H₂O, 7,4 g EDTA, mit ca. 6,5ml/1000ml 10N NaOH auf pH 7,4 in 1000 ml dH₂O, autoklavieren.

20x SSC: 3M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, mit 10N NaOH auf pH 7,0. autoklaviert

STE-Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH8,0, 1mM EDTA

30% Sukrose/PBS: 30g Sucrose in 100 ml 1xPBS gelöst, bei 4°C gelagert

Sukrosefarbmarker: 60% Sucrose, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol, 10mM Tris-HCl, 0,1M EDTA, pH 8,0

10x TBE: 0,89M Tris-Borat, 0,89M Borsäure, 25mM EDTA, pH 8,0, autoklaviert

Tris-HCl: Tris-(Hydroxymethyl) Aminomethan, mit HCl auf pH 7,0 oder pH 8,0

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8,0

X-Gal-Lösung: 20 mg/ml in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C

4.2.8.1 Restriktionspuffer (NEB)

NEB1: 10 mM Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,0

NEB2: 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1mM DTT, pH 7,9

NEB3: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1mM DTT, pH 7,9

NEB4: 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 50 mM Kaliumacetat, 1mM DTT, pH 7,9

4.2.8.2 Restriktionspuffer anderer Enzyme

AP-Puffer (für alkalische Phosphatase): 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM MgCl₂, pH 7,6

Ligasepuffer (NEB): 50 mM Tris-HCl(pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25 mg/ml BSA

T4-DNA-Polymerasepuffer (NEB): 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1mM DTT, pH 7,9

4.2.9 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen J.T. Baker (Deventer, Holland), Biomol (Ilvesheim), BRL (Bethesda Research Laboratories, Karlsruhe), Difco Laboratories (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.a. (zur Analyse).

4.2.10 Enzyme

4.2.10.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von Amersham-Buchler (Braunschweig), Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Karlsruhe), NEB (New England Biolabs, Bad Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), SERVA/Promega (Heidelberg), Stratagene (La Jolla) bezogen.

4.2.10.2 andere Enzyme

RNAseA: RNAseA in 10 mM Tris-HCl pH7,5, 15 mM NaCl auf 10mg/ml gelöst, DNAsen wurden durch 15 min Erhitzen bei 95°C denaturiert, RNAseA wurde durch Abkühlen auf RT renaturiert, Lagerung bei -20°C

ProteinaseK: ProteinaseK (Boehringer) auf 10 mg/ml Endkonzentration in dH₂O gelöst, Lagerung bei -20°C.

Weitere Enzyme: Bovine intestinale Alkaline Phosphatase (Boehringer), T4-Polynukleotidkinase (10u/μl), T4-DNA-Ligase (konzentriert, Boehringer), DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (Boehringer), AdvanTAge Taq (Clontech).

4.2.11 Sonstige Materialien

4.2.11.1 Plastikmaterialien

Plastikmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc und Sarstedt bezogen.

4.2.11.2 „Kit's“

Von der Firma Qiagen (Hilden) wurden für die DNA-Präparation der QIAfilter-Maxi-Kit und QIAfilter-Midi-Kit verwendet.

4.2.11.3 Filme

Autoradiogramme wurden mit BIOMAX (Kodak)- oder XAR-3 -Filmen (Kodak) durchgeführt. Farbphotographien wurden mit Ektachrome 320T und 64T (Kodak) angefertigt.

4.2.11.4 Geräte, Computer und Software

Es wurden Apple Macintosh Computer mit folgenden Programmen verwendet: Adobe Photoshop (Adobe Systems), Freehand (Macromedia), Microsoft Word (Microsoft Corp.) und VISTA (Mayor et al. 2000, <http://sichuan.lbl.gov/vista/index.html>).

Verwendete Mikroskope und Kameras:

Es wurde das SZX12 Stereomikroskop (Olympus), das SX60 Mikroskop (Olympus) und die ColorViewII digitale Kamera verwendet.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Methoden nach Sambrook et al., 1989 durchgeführt.

4.3.1 Transformation von *E. coli*

4.3.1.1 Präparation und Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen wurden aus einer Glycerol-Stammsuspension auf LB-Platten ausgestrichen und 10-16 h bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium inokuliert und diese bei 37°C bei 260 rpm, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Die Suspension wurde 15 min auf Eis gestellt und anschließend 20 min mit 3500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde mit 500 ml eiskaltem autoklavierten ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Sediment in 40 ml eiskaltem autoklavierten 10% Glycerol wie oben gewaschen. Schließlich wurde das Volumen des Bakteriensediments abgeschätzt und mit einem gleichen Volumen 10% Glycerol suspendiert und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl Ligationsansatz gemischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Transformiert wurde mit einem Biorad Gene Pulser, mit den folgenden Einstellungen: 25 µF, 2,5 kV und 200W. Nach der Transformation wurden die Zellen sofort mit auf RT erwärmten 1 ml SOC-

Medium gemischt und für 45 min bei 37°C auf dem Roller inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in verschiedenen Volumina auf LB-Platten mit 20 mg/ml Ampicillin ausgestrichen.

4.3.1.2 Blau/Weiß-Selektion zur Identifikation von Plasmidklonen

50 ml 1M IPTG-Lösung und 50µl 2% X-Gal-Lösung (in Dimethylformamid) wurden zu 100-400ml Bakteriensuspension gegeben, gemischt, auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Rekombinante Bakterienklone wurden als weiße Kolonien identifiziert.

4.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

4.3.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Eine Bakterienkolonie wird mit einer gelben Pippettenspitze in 2-5 ml LB-Medium überführt und 8-12 h bei 37°C auf dem Rotor inkubiert. 1,5 ml (bei low copy-Plasmiden: 3 ml) dieser Kultur wird in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben, durch Zentrifugieren für 20 s bei 13000 rpm geerntet und der Überstand vom Bakteriensediment abgenommen. Die alkalische Lyse wird wie folgt durchgeführt: 100 µl Lösung A (Resuspendierungspuffer) durch Vortexen resuspendieren. 200 µl Lösung B (Lysispuffer), vorsichtig durchmischen, 3 min bei RT; 150 µl Lösung C (Äquilibriumspuffer), vorsichtig durchmischen. 3 min auf Eis 5-10 min Zentrifugation bei 13000 rpm, Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen mit 500 µl Isopropanol überführen, 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren.

Das Präzipitat wird einmal mit 70 % Ethanol waschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in 100 µl (bei low copy Plasmiden 50 µl) TER (TE mit 50 mg/ml RNaseA), bei 37°C für ca. 5 min auf dem Schüttler resuspendiert.

4.3.2.2 Maxi- und Midipräparation von Plasmid-DNA mit dem Qiafilter-Kit (Qiagen)

Zur Isolierung größerer DNA-Mengen für präparative Zwecke wurde der Plasmid Midi bzw. Maxi Prep Kit der Firma Qiagen verwendet, wobei entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen wurde.

4.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösungen

Die betreffende DNA-Lösung wird 1: 20 bis 1:100 in 1 μ l dH₂O verdünnt und die Absorption der Lösung spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD₂₆₀) von 1,0 entspricht einer Konzentration Doppelsträngiger DNA von 50 mg/ml.

4.3.3 Enzymatische Manipulation von DNA

4.3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen von DNA werden in 10-100 μ l Ansätzen wie folgt durchgeführt:

DNA in 0,05-1mg/ml, 1/10 Volumen 10X Restriktionspuffer, in der Regel NEB-Puffer 1-4 (NEB), 1-10 u/mg DNA Enzym.

Inkubation, je nach Enzym und DNA-Konzentration 20 min-3 h, in der Regel bei 37°C. Das Enzym wurde in weniger als 1/10 Volumen zugegeben, um die Glycerinkonzentration unter 5% zu halten.

4.3.3.2 Auffüllen von 5'-Restriktionsüberhängen mit Klenow-Polymerase

Für das Auffüllen der beim Schneiden mit den meisten Restriktionsendonukleasen entstehenden 5'-Einzelstrang-Überhängen wurde das große Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Die Reaktion wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt im Anschluß an einen Restriktionsverdau wie folgt durchgeführt:

0,05 mg/ml DNA, 1xNEB-Puffer (meistens NEB3), je 33 mM dNTP, 0-1,5 u/mg DNA Klenow-Polymerase (Boehringer Mannheim); 5 min 37°C, 12 min RT.

Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM beendet und die Polymerase durch Phenolextraktion entfernt.

4.3.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA-Enden zur Verhinderung der Religation linearer Vektor-DNA-Fragmente wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

50-100 ng/ml in 1x AP-Puffer eingesetzt, 1 u/pmol DNA-Enden Bovine intestinale alkaline Phosphatase (CIP); die Inkubation erfolgte in 20-50µl für 1 h bei 37°C oder 15 min bei 50°C. Anschließend wurde der Ansatz mit dH₂O auf 200 µl aufgefüllt und einer Phenolextraktion unterzogen.

4.3.3.4 Phosphorylierung von Oligonukleotiden für die Ligation

Das Hinzufügen von Phosphatgruppen an 5'-Hydroxylenden linearer DNA-Fragmente wurde wie folgt durchgeführt:

50 ng DNA in 1X Ligasepuffer (mit 0,1mM ATP), 1u/pmol DNA-Enden T4 Polynukleotidkinase; Die Inkubation erfolgte 30 min bei 37°C. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°C.

Bei der Hitzeinaktivierung wurden gleichzeitig unspezifische Hybridisierungen der einzelsträngigen Oligonukleotide aufgeschmolzen. Die Hybridisierung der Oligonukleotide zu Doppelsträngen erfolgte bei der anschließenden Inkubation von 15 min bei 37°C nach Zugabe von 1/10 Volumen Restriktionspuffer. Zur Überprüfung der Phosphorylierung wurde eine Kontroll-Ligation wie folgt angesetzt: 1/10 Volumen Phosphorylierungsansatz, 1/10 Volumen 10X Ligasepuffer, auffüllen mit dH₂O. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Bei einer erfolgreichen Phosphorylierung zeigt sich hierbei ein Leiternmuster zu Multimeren ligierter Oligonukleotide

4.3.3.5 Ligation von DNA-Enden

DNA-Enden wurden in einem Volumen von 10 µl wie folgt ligiert:

ca.1mM DNA-Enden im molaren Verhältnis 3:1 Insert/Vektor, 1/10 Volumen 10X Ligasepuffer, 10 u T4 DNA Ligase; Auffüllen mit ddH₂O

Die Ligation erfolgte über Nacht bei RT. Der Ansatz wurde direkt für die Transformation eingesetzt. Religationen wurden in einem größerem Volumen (20-30 µl) und ca. 0,1 mM DNA-Enden durchgeführt.

4.3.3.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Ketten-

reaktion (PCR)

Standard-Ansatz zur Amplifikation linearer DNA-Fragmente aus Matritzen-DNA:

10 ng Plasmid-, bzw. 100 ng genomische DNA als Matritze, je 20 pmol Oligonukleotid, je 200 mM dNTP's, 1X PCR-Puffer (Biotherm), 1uTaq Polymerase (Biotherm).

Zur Amplifikation wurde der Peltier Thermal Cycler PTC-2000 (MJ-Resaerch) mit Heizverschluss verwendet. Die benötigte Schmelztemperatur (T_m) wurde näherungsweise mit der folgenden einfachen empirischen Formel aus der Oligonukleotidsequenz berechnet: $\{2(n_A+n_T)+4(n_G+n_C)\}$.

Anhand dieser berechneten T_m wurden in drei getrennten Ansätzen die optimale Hybridisierungs(annealing)-Temperatur T_a ($=T_m/2$) mit den folgenden Standard-PCR-Zyklen ausgetestet:

94°C, 2 min; 93°C, 30 s; $T_a/^\circ\text{C}$, 30 ; 72°C, tel/s; 72°C, 2-10 min, 4°C, unendlich.
Zyklus 2-4: 25-30 mal.

Die Dauer des Elongationszyklus "tel" wurde über die Länge des zu amplifizierenden Fragments berechnet (ca. 1 min/kb).

Für PCR-Amplifikate, die anschließend in Vektoren kloniert wurden, wurde der AdvanTAGE PCR Kit (Clontech) nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.3.4 Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten

4.3.4.1 Agarosegelelektrophorese

Je nach Fragmentgröße wurden 0,6 - 2% ige Agarosegele zur Trennung von Restriktionsfragmenten hergestellt. Die Agarose wurde in der entsprechenden Menge in 0,5X TBE in der Mikrowelle aufgekocht, auf etwa 60°C abgekühlt und mit 2 ml/100ml Ethidiumbromidlösung versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5X TBE. Die Detektion der DNA-Fragmente wurde erfolgte durch UV-Licht (258 nm). Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte bei Wellenlängen von über 300 nm.

4.3.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agaraosegelen durch Elektro-

elution

Die entsprechenden Banden werden unter langwelligem UV-Licht durch ein gereinigtes Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die Agarosegelstücke in vorbereitete Dialyseschläuche gegeben. Es werden, je nach Größe des Gelstücks, 400-700 µl TE (pH 8,0) zugegeben. Der Schlauch wird in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die DNA bei 120- 150 mV, je nach Länge des zu isolierenden DNA-Fragments 30 min - 3 h eluiert. Anschließend wird die Pufferlösung mit der DNA in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Schlauch mit 100 - 200 µl TE-Puffer nachgespült. Diese Lösung wird zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform/Isomylalkohol extrahiert. Schließlich erfolgt eine Ethanolpräzipitation. Das Präzipitat wird in in ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

4.3.4.3 Aufbereitung von linearen DNA-Konstrukten für die Injektion in Mausocyten (Hogan et al., 1994)

Das Plasmid wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und das so linearisierte Konstrukt durch Agarosegelelektrophorese von der Plasmid-DNA getrennt. Für die spätere Ermittlung der DNA-Konzentration für die Injektion, wurden 5-6 µl des Restriktionsverdau vor der Isolierung bei -20°C gelagert. Die Isolierung erfolgte durch Elektroelution. Anschließend wurde die DNA-Lösung wie folgt extrahiert: zweimal Phenolextraktion, einmal Chloroformextraktion, zweifache Extraktion durch Äther (wassergesättigt) zur Entfernung der Chloroformreste, wobei der flüchtige Ätherüberstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Die DNA wurde im Anschluß wie folgt präzipitiert: zwei Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, 10 min bei Raumtemperatur, 20 min Zentrifugation 13000 rpm., zweimal waschen mit 70% Ethanol, Trocknen in der Vakuumzentrifuge und aufnehmen in 50 µl 1/10 TE-Puffer.

Die DNA-Lösung wurde anschließend in eine P-30 Säule gegeben und die Säule in einem Greinerröhrchen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die P-30-Säulen wurden wie folgt vorbereitet: in sterilen 1ml-Spritzen wurde der Boden mit Glas-

wolle ausgestopft und diese autoklaviert. Die gestopften Spritzen werden mit P-30/TE auf 1 ml aufgefüllt und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert; das wurde wiederholt, bis die Spritze bis zur 1 ml-Marke gefüllt war. Die so präparierten Säulen wurden vor dem Auftragen der DNA-Lösung noch zweimal mit je 100 ml 1/10TE gewaschen.

Die Konzentration des DNA-Fragments wurde durch Agarosegelelektrophorese ermittelt, wobei parallel ein definiertes Volumen aus der verdauten Vektor-DNA, deren Konzentration zuvor ermittelt wurde mitlief. Die Injektion erfolgte in einer DNA-Konzentration von 4-6 ng/ml.

4.3.5 Genotypisierung durch PCR

Standardisierter Ansatz für genomische PCR:

ca. 100 ng DNA, je 20 pmol Oligonukleotid, je 200 mM dNTP's, 1X PCR-Puffer (Biotherm), 1 u Taq Polymerase (Biotherm).

PCR-Zyklen für PCR von:

Cre: 96°C, 2 min; 95°C, 30 s; 57°C, 30 s, 65°C, 30s, 72°C, 2min, 4°C, unendlich. Zyklus 2-4: 30 mal.

Pax6^{flox}: 96°C, 2min; 95°C, 30 s; 60°C, 30 s; 68°C, 30 s; 72°C, 2 min; 4°C, unendlich. Zyklus 2-4: 30 mal.

Oligonukleotid-Sequenzen:

Cre:

#101: 5'-TATGCTTCTGTCCGTTTGCCG-3'

#102: 5'-CCTGTTTTGCACGTTACCG-3'

Pax6^{flox}:

#89: 5'-GCGTTGAGTAGCTCAATTCTAT-3'

#90: 5'-AGTGGCTTGGACTCCTCAAGA-3'

4.3.6 Biochemische Standardmethoden

SDS-PAGE und Immunblot wurden wie beschrieben durchgeführt (Laemmli, 1970; Towbin et al., 1979; Kyhse-Andersen, 1984). Der SDS-Probenpuffer enthielt 62,5 mM Tris, pH 6,8, 3 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Glycerol, 3,3 % (v/v) β -Mercaptoethanol (Endkonzentrationen). Die Proben wurden vor dem Gelauftrag für 3min auf 95°C erhitzt. HRP-markierte sekundäre Antikörper wur-

den mit dem ECL-Chemiluminiszenz-Reagenz (Amersham) nach den Vorschriften des Herstellers auf Kodak-XAR Röntgenfilm detektiert.

Proteinkonzentrationen wurden üblicherweise mit dem Bradford-Assay bestimmt (Bradford, 1976). Hierbei diente BSA als Proteinstandard. Zur genaueren Konzentrationsbestimmung wurde in einigen Fällen die Absorption bei 280 nm photometrisch gemessen und die Konzentration mit dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet.

4.4 Embryologische und zellbiologische Methoden

4.4.1 Erzeugung transgener Mäuse mittels Mikroinjektion

Superovulation wurde bei FVB-Weibchen wie folgt induziert: Durch Injektion (intraperitoneal) von 0,1 ml 40 u/ml PMS (Stutenserum-Gonadotropin, Sigma) in 0,9% NaCl, nach 48 h erfolgte erneut eine Injektion mit 0,1 ml 40 u/ml hCG (humanes chorionisches Gonadotropin) in 0,9% NaCl. Fertilisiert wurde durch Verpaarung mit FVB-Männchen.

Die Entnahme der befruchteten Mausooocyten erfolgte am nächsten Tag und die Cumuluszellen wurden durch Hyaluronidase (300 mg/ml in M2-Puffer) befreit.

Etwa 2 p1 2-3 ng DNA/0,1xTE wurde mit Hilfe einer ca. 100 mm Glaskapillare in den männliche Pronukleus injiziert.

Injizierte Oocyten wurden in die Ampullae scheinchwangerer NMRI-Rezipientenmäuse eingespült. Die Rezipientenmäuse wurden durch Injektion von 0,1 ml 30 u/ml PMS in 0,9% NaCl und nach 48 h erneut durch Injektion mit 0,1 ml 20 u/ml hCG und durch Verpaarung mit vasktomierten NMRI-Männchen für den Retransfer vorbereitet. Der Tag des Retransfers wurde als d 0,5 definiert.

Embryonen der F0-Generation des entsprechenden Stadiums werden in eiskaltem 1x PBS gesammelt und von den embryonalen Membranen befreit. Das Amnion wird dabei für die Genotypisierung in Eppendorfröhrchen transferiert und auf Eis gelagert.

4.4.2 Mäuse und Embryonen

Folgende Mausstämme wurden verwendet: C57/bl6 und FVB. Für den Retransfer und die Oozyten der Mikroinjektion wurden FVB-Tiere verwendet. Mausstämme wurden von Harlan-Sprague Dawley (Borchen) bezogen.

Embryonen bestimmter Stadien wurden wie folgt gewonnen: Verpaarungen wurden Nachmittags angesetzt und morgens jeweils die Bildung des Vaginalpfropfens überprüft. Der Tag des Vaginalpfropfens wird als Tag 0.5 der Embryogenese (E0.5) definiert.

4.4.3 Injektionen

Injektionen erfolgten in die Bauchhöhle (intraperitoneal) mit einer sterilen 1,0 ml Spritze (Terumo, Tokio) und einer 0,4 X 20 mm Injektionsnadel (Terumo). Bei jeder Injektion wurde zunächst aspiriert, um das Verletzen innerer Organe zu vermeiden.

4.4.4 Transfektion von COS Zellen

COS-Zellen wurden in einer Dichte von $1-3 \times 10^5$ Zellen ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator über Nacht zu einer Konfluenz von 80% in 10% FCS wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit 1.0 µg DNA transfiziert.

1µg DNA wurden mit 3µl Lipofectamine (Gibco) in 200 µl serumfreien Medium vereint und für ca. 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 800 µl serumfreies Medium hinzugefügt und alles zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden zuvor mit 2 ml serumfreien Medium gewaschen.

Die Transfektion erfolgte für 5h bei 37°C.

Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 20% FCS ü.N., bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die FCS-Konzentration auf 10% eingestellt und nochmals ü.N. inkubiert.

4.5 Histologie

4.5.1 Einbetten von Embryonen und Geweben in Paraffin

Die Embryonen oder Gewebeteile wurden über Nacht bei 4°C in 4% PFA/PBS fixiert, gründlich in kaltem PBS gewaschen und anschließend für jeweils 1 h bei

Raumtemperatur in den folgenden Lösungen inkubiert: PBS, Saline, 50%, 70%-, 80%-, 90%-, 100%-, 100% Ethanol, 100% Toluol. Anschließend wurden die Embryonen 2 mal für jeweils 10-24 h bei 60°C in Paraplast überführt. Die Embryonen wurden auf einer Kühlplatte in Formen in Position gebracht, und diese mit Paraplast aufgefüllt. Die Blöcke wurden abgekühlt und bis zum Anfertigen histologischer Schnitte mit dem Mikrotom bei 4°C gelagert. Histologische Schnitte X-Gal-gefärbter Embryonen wurden in 6-8 mm angefertigt.

4.5.2 Anfertigen von Gefrierschnitten

Embryonen wurden in eiskaltem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte bei 4°C für 1-2h in 4% PFA/1x PBS. Die Embryonen wurden bis zum Absinken in 30% Sukrose/PBS eingetaucht, in Kryomatrix (Shandon) überführt und auf Trockeneis in Blöcken mit festwerdenden Kryomatrix positioniert, die Blöcke mit Kryomatrix aufgefüllt und in Trockeneis abgekühlt. Die Blöcke wurden bis zum Anfertigen der Schnitte im Kryostat bei -20°C gelagert. Es wurden 10-15 µm Schnitte bei -20°C angefertigt, auf gelatinisierten Objektträgern oder Fisher cryofrost-Objektträgern (Menzel Gläser) gesammelt, 20 min - 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Antikörperinkubation, AP- oder X-Gal-Färbung bei -20°C gelagert.

4.5.3 Immunhistochemie

Gefrierschnitte: Für die immunhistochemische Detektion von Antigenen wurde die Gefrierschnitte in 4% PFA/PBS post-fixiert, dann dreimal 5 min in PBS gewaschen und für 1-2h bei RT in Blockinglösung (1% BSA, 0.2% Tween/PBS) inkubiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligen Waschen für je 10 min wurde mit den entsprechenden Sekundärantikörpern für 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in PBS wurde in Mowiol eingebettet und die Schnitte im Dunkeln bei 4°C gelagert. Zellkerne wurden mit Hoechst-Kernfarbstoff (Boehringer Mannheim) fluoreszenzmarkiert: zwischen den letzten beiden Waschsritten wurde aus einer 1mg/ml Methanol Stammlösung 1:1000 in PBS für 45 s inkubiert.

Paraffinschnitte: Die Schnitte wurden über zweimalige Inkubation für 10 min in Histo-clear deparaffiniert, über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert, zweimal

für 5 min in PBS gewaschen und wie folgt behandelt: Antigen Unmasking Lösung (Vector Laboratories) wurde in 4,8 ml/500 ml dH₂O in einer Plastik-Küvette im Mikrowellenofen bei 800W für 2 min aufgekocht. Die Schnitte wurden anschließend in die Küvette mit dieser Lösung für 3 min bei 800W aufgekocht, auf 50°C abgekühlt und die letzten beiden Schritte wiederholt. Anschließend wurde zweimal für je 5 min in PBS gewaschen und die weiteren Schritte wie oben beschrieben durchgeführt.

4.5.3.1 Primärantikörper

Die folgenden Antikörper wurden für die immunhistochemischen Analyse der vorliegende Arbeit verwendet (die entsprechenden verwendeten Verdünnungen und Bezugsquellen sind jeweils in Klammern angegeben):

Monoklonale Antikörper aus Maus: anti-Pax6 (1:100, DSHB), anti-BrdU (1:10, Bio-Sciences Products AG), anti-ki67 (1:50, DAKO), anti-Tuj1 (1:500, Babco).

Polyklonale Antikörper aus Kaninchen: anti-Pax6 (1:500, Babco), anti-Casp3 (1:200, CellSignaling).

4.5.3.2 Sekundärantikörper

Alle Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper wurden aus der Alexa-Serie (Molecular Probes/MoBiTec) rekrutiert. Die Antikörper dieser Serie wurden stets in der Verdünnung 1:500 eingesetzt.

Alexa-594 (rote Emission)-konjugiert:

Ziege-anti-Kaninchen IgG, Ziege-anti-Maus IgG.

4.5.4 Histologischer Nachweis der Zellproliferation

Schwangere Mäuse wurden am gewünschten Stadium intraperitoneal mit jeweils 0.14 mg/g Körpergewicht BrdU (2-Bromo-5-desoxyuridin) in PBS injiziert. Nukleäre BrdU-Inkorporation durch DNA-Synthese in mitotischen Zellen wurde für 1.5 h bis zur Entnahme der Embryonen zugelassen. Embryonen wurden in Paraffin eingebettet und 4 µm Mikrotomschnitte angefertigt. BrdU Inkorporation wurde immunhistochemisch wie folgt detektiert: Die deparaffinierten Schnitte wurden 30 min in 2M HCl inkubiert, zweimal in 0.1M Boratpuffer/pH8.5

gespült, dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und 7 min in 20mg/ml ProteinaseK inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in PBS schloss sich die Inkubation mit dem Vectastain Universal ABC-Kit an (Vector Laboratories, Grünberg).

4.5.5 Histologischer Nachweis von Apoptose

Apoptotische Zellen wurden auf Gefrierschnitten mit der TUNEL-Methode (Clifton et al., 1998) mit Hilfe des the ApoTag-kits (Intergen) wie folgt detektiert:

Postfixierung in 1% Paraformaldehyd/PBS, 10 min, 4°C,

waschen 2 mal PBS, je 5 min, RT,

Fixierung in Ethanol:Essigsäure (2:1), 5 min, -20 °C,

waschen 2 mal PBS, je 5 min, RT,

Äquilibriumspuffer, 75ml/ Schnitt, 10 s-5 min, RT,

55 ml/cm² TdT Enzym (Intergen), 37°C, 1 h,

Stop/Wasch-Puffer (Intergen), 10 min, RT,

waschen 3mal PBS, je 1 min, RT,

65 ml/cm² Flsuorescin konjugierter Anti-DIG Antikörper (Intergen), 30 min, RT,

waschen 4mal PBS, je 2 min, RT.

Eingebettet wurde in Mowiol.

4.5.6 Histochemischer Nachweis von β -Galactosidaseaktivität

Aus B. Meyer, S. Meyer, P. Gruss. EMBO Practical Course on Mouse and Chick development. Göttingen, 1995.

4.5.6.1 Im Ganzpräparat

Die Embryonen werden 2-3 mal in 1X PBS gewaschen. Embryonen werden wie folgt bei 4°C fixiert:

E11,5: 30 min FixA; E12,5: 40 min FixA; E12,5: 50 min FixB; ab E13,5: 30 min FixB, sagital halbieren erneut 30-40 min FixB.

Die Embryonen werden bis E12,5 3 mal jeweils 20 min bei Raumtemperatur in 1X PBS, Embryonen ab E12,5 in 1X PBS gewaschen. Embryonen bis E12,5 werden in X-Gal-Färbelösung mit PBS, ältere Embryonen in X-Gal Lösung mit PBS überführt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Nach der Färbung werden die

Embryonen erneut 3 mal jeweils 20 min bei Raumtemperatur in 1X PBS gewaschen.

Fixierungslösungen werden wie folgt frisch angesetzt:

für je 100 ml Lösung:

FixA: 2,7 ml 37% Formaldehyd, 0,8 ml 25% Glutaraldehyd, 0,2 ml 10% NP-40 in 1X PBS (dH₂O vorher auf 4°C gekühlt)

FixB: 2,7 ml 37% Formaldehyd, 0,8 ml 25% Glutaraldehyd, 0,2 ml 10% NP-40, 1 ml 1% DOC in 1X PBS (dH₂O vorher auf 4°C gekühlt)

X-Gal-Färbelösung (50 ml): 1,25 ml X-Gal-Lösung, 0,5 ml 500 mM K₃[Fe(CN)₆], 0,5 ml 500 mM K₄[Fe(CN)₆], 1,0 ml 100 mM MgCl₂ in 1X PBS oder 1X PBS in dH₂O, frisch angesetzt.

4.5.6.2 Auf Gefrierschnitten (Lobe et al., 1999)

Einbetten und Fixieren von Embryonen und Gewebeteilen:

Waschen in PBS auf Eis,

AP-Fixierungslösung, 1h, auf Eis,

waschen 3 mal PBS, auf Eis,

30% Sukrose/PBS, 5h - ü.N., 4°C, Einbetten in Cryomatrix.

Anfertigen von 8-12 µm Gefrierschnitten.

Färbeprozedur:

Postfixieren in 0,2% Glutaraldehyd/PBS, 10 min, 4°C,

3 mal waschen in lacZ-Waschpuffer, je 5 min, RT,

4-6 h Inkubation in lacZ-Färbungspuffer, 37°C,

waschen, 3 mal PBS, RT,

Dehydrieren: Je 2 min 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Ethanol, Toluol.

Die Schnitte wurden anschließend direkt mit Eukitt und einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht getrocknet.

Lösungen:

Fixierungslösung:

2% Paraformaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd, 0,02% NP-40, 0,01% DOC (Natrium-Dioxycholat) in dH₂O.

1x lacZ-Waschpuffer:

2mM MgCl₂ 0,01%; 0,02% NP-40 in 1x PBS.

lacZ-Färbungspuffer:

5 mM mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 0,5 mg/ml X-Gal in 1x lacZ-Waschpuffer.

4.5.7 Histochemischer Nachweis von alkalischer Phosphatase Aktivität (Lobe et al. 1999)

4.5.7.1 Im Ganzpräparat

Embryonen oder Gewebeteile wurden in PBS auf Eis gewaschen,

Fixierung in Fixierungslösung, zweimal 30 min, auf Eis,

waschen in PBS auf Eis,

Hitzeinaktivierung endogener Phosphatasen in PBS, 30 min, 70-75°C,

waschen in PBS, äquilibrieren auf RT,

AP-Puffer, 10 min, 4°C,

Farbreaktion (im Dunkeln): BM-Purple (Roche), 30 min - 36 h, 4°C,

waschen 3 mal 0,1% Tween20, 2 mM $MgCl_2$ /PBS.

Lösungen:

Fixierungslösung:

2% Paraformaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd; 0,02% NP-40; 0,01% DOC (Natrium-Desoxycholat) in dH_2O .

AP-Puffer:

100 mM Tris-HCl pH9,5; 100 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$ in dH_2O .

4.5.7.2 Auf Gefrierschnitten

Das Einbetten und Fixieren von Embryonen und Gewebeteilen erfolgte wie für die X-Gal Färbung auf Gefrierschnitten.

Postfixierung der Gefrierschnitte: 0,2 % Glutaraldehyd/PBS, 4°C,

waschen, 3 mal PBS, RT,

Hitzeinaktivierung endogener Phosphatasen in PBS, 30 min, 70-75°C,

waschen, einmal in PBS,

AP-Puffer, 10 min, RT,

Farbreaktion (im Dunkeln): NBT/BCIP-Färbungslösung, 10 min - 30 min, RT,

waschen, 3 mal in PBS,

Dehydrieren: Je 2 min 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Ethanol, Toluol.
Eingebettet wurde in Eukitt.

Lösungen:

NBT/BCIP-Färbungslösung:

20 ml NBT/BCIP (Roche)/ml NBT/BCIP-Puffer

NBT/BCIP-Puffer:

100 mM Tris HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 0,01% DOC; 0,02% NP-40 in dH₂O.

4.5.8 Kontrastfärbung histologischer Schnitte mit Neutralrot

Paraffinschnitte wurden wie folgt behandelt:

2 mal Xylolersatz Xem 200, je 2-3 min

je 2min 100%, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol

dH₂O, kurz eintauchen

30s-1 min 0,1% Neutralrotlösung

je 1 min 70%, 80%, 90% Ethanol

2 min 100% Ethanol

2 mal HistoClear, je 2 min,

Eingebettet wurde in Eukitt.

4.5.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologische Schnitte

Paraffinschnitte wurden wie folgt behandelt:

2 mal HistoClear, je 3 min

100%, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol, je 2min

dH₂O, 2 min,

Hämatoxylin nach Harris, 3-5 min

dH₂O, 1min,

0,25% HCl, 70%Ethanol/dH₂O, kurz eintauchen,

Spülen in Leitungswasser, 10 - 15 min,

dH₂O, 1min,

Eosin/0,5% dH₂O, 3-5 min,

dH₂O, 1, 1 min,

je 1 min 70%, 80%, 90% Ethanol,

2 min 100% Ethanol

2 mal Histoclear, je 2 min,

Eingebettet wurde in Eukitt.

Lösungen:

Hämatoxylin nach Harris: Accustain (Sigma Diagnostics)

Eosin:

Stammlösung: 1 % Eosin/dH₂O.

Gebrauchslösung: 1 % Eosin 1:1 mit dH₂O mischen, filtrieren, mit 2 bis 3 Tropfen Eisessigsäure versetzen.

4.5.10 Dokumentation und Auswertung histologischer Präparate

Hellfeldaufnahmen histologischer Schnitte:

Hellfeldaufnahmen wurden mit dem Zeiss Axiophot-Mikroskop mit DIC-optik ausgewertet und dokumentiert. Dia-Aufnahmen wurden mit dem Dia-Scanner (Nikon) eingelesen und mit dem Programm Photoshop (Adobe) bearbeitet. Alternativ wurden Aufnahmen wie unten beschrieben mit dem Olympus BX-60 Mikroskop dokumentiert.

Fluoreszenzaufnahmen histologischer Schnitte und Dunkelfeldaufnahmen radioaktiver ISH-Schnitte wurden mit einem Olympus BX-60 Fluoreszenzstereomikroskop/digitalen Kamerasystem (Colorview12) dokumentiert und mit dem Programm AnalySIS (AnalySIS) bearbeitet. Dunkelfeldaufnahmen wurden mit dem Dunkelfeldkondensor ermöglicht.

Hellfeldaufnahmen von Ganzpräparaten

Hellfeldaufnahmen von Ganzpräparaten wurden mit dem Olympus SZ-X12 Stereomikroskop mit nachgeschaltetem digitalem Kamerasystem (Colorview12) dokumentiert und mit AnalySIS Software bearbeitet.

Fluoreszenzaufnahmen von Ganzpräparaten:

Adulte Mäuse, ganze Embryonen oder Gewebeteile wurden mit dem Olympus SZ-X12 Fluoreszenzstereomikroskop als gfp-positiv identifiziert und mit dem nachgeschalteten ColorViewII Digitalkamerasystem dokumentiert.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine konditionale Überexpression von *Pax6* basierend auf dem Cre-loxP-System im sich entwickelnden Kortex der Maus durchgeführt. Für die erfolgreiche Etablierung dieses Systems wurden zwei transgene Mauslinien generiert: *JoP6* mit gefloxtem “schlafenden” *Pax6* und *E1-ngn2-Cre*, die CRE-Rekombination in den *Pax6* und *ngn2* positiven kortikalen Vorläuferzellen dirigiert. Basierend auf einer Promotorstudie wurden außerdem zwei weitere hilfreiche transgene Mauslinien generiert.

Die *Pax6* und *ngn2* positiven radialen Gliavorläuferzellen bei E10.5, die eine starke endogene *Pax6*-Expression haben und die Infra-Granulatschichten bilden, wurden von der *Pax6*-Überexpression nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte zusätzliche *Pax6*-Expression zu massiver Apoptose über den Apoptosomen-Signalweg sowohl in den frühen Vorläuferzellen bei E10.5, als auch in den späten *Pax6* positiven radialen Gliavorläuferzellen. In beiden Fällen war der adulte Kortex in Größe und Dicke reduziert, wobei die Supra-Granulatschichten besonders betroffen waren. Die apoptotischen Vorläuferzellen bildeten Zellaggregate. Dies verdeutlicht eine Veränderung der zelladhäsiven Eigenschaften nach *Pax6*-Überexpression. BrdU-Markierungen konnten eine Störung des Zellzyklus der *Pax6* überexprimierenden Vorläuferzellen aufdecken.

Die dargestellten Ergebnisse lassen auf eine bedeutende Rolle der PAX6-Konzentration für die korrekte Bildung besonders der Supra-Granulatschichten des Kortex schließen.

6. Abstract

In this work the analysis of a conditional *Pax6* overexpression in the mouse developing cortex based on the Cre-loxP-system is presented. For the successful introduction of this strategy, two novel transgenic mouse lines were generated: *JoP6* with floxed *Pax6* as a “silent” gene and *E1-ngn2-Cre* driving CRE recombination in the *Pax6* and *ngn2* positive cortical progenitors. Based on the performed *Pax6* promotor study, two other useful transgenic mouse lines were generated.

The results show that *Pax6* overexpression does not affect the *Pax6* and *ngn2* positive radial glia progenitors at E10.5 that are expressing endogenously a high level of *Pax6* and produce the infra granular layers. In contrast, additional *Pax6* expression in the early progenitors at E10.5 or in the *Pax6* positive late radial glia at E14.5 resulted in a massive apoptosis via the apoptosome pathway. Both conditions reduced the size and thickness of the mature cortex, with more affected supra than infra granular layers. The apoptotic progenitors form cell aggregates indicating change of their adhesive properties after *Pax6* overexpression. BrdU labelling showed a misregulation of the cell cycle.

Together these results indicate a crucial role for endogenous low level expression of *Pax6* in the correct generation of the supra granular cortical layers.

7. Literaturverzeichnis

Altmann, C. R., Chow, R. L., Lang, R. A., und Hemmati-Brivanlou, A. (1997). Lens induction by *Pax-6* in *Xenopus laevis*, *Dev Biol* *185*, 119-23.

Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., und Nottebohm, F. (1990). Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division, *Neuron* *5*, 101-9.

Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X., und Gruss, P. (2000). *Pax6* activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye, *Genes Dev* *14*, 2701-11.

Bayer, S. A., Altman, G. (1991). Neocortical development, Raven press, New York.

Berry, M., und Rogers, A. W. (1965). The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex, *J Anat* *99*, 691-709.

Bello, B. C., Hirth, F., und Gould, A. P. (2003). A Pulse of the *Drosophila* Hox Protein Abdominal-A Schedules the End of Neural Proliferation via Neuroblast Apoptosis, *Neuron* *37*, 209-19.

Bishop, K. M., Goudreau, G., und O'Leary, D. D. (2000). Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*, *Science* 288, 344-9.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-54.

Brand, A. H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes, *Development* 118, 401-15.

Buchholz, F., Angrand, P. O., und Stewart, A. F. (1996). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs, *Nucleic Acids Res* 24, 3118-9.

Callaerts, P., Halder, G., und Gehring, W. J. (1997). *PAX-6* in development and evolution, *Annu Rev Neurosci* 20, 483-532.

Callaerts, P., Munoz-Marmol, A. M., Glardon, S., Castillo, E., Sun, H., Li, W. H., Gehring, W. J., und Salo, E. (1999). Isolation and expression of a *Pax-6* gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia(G)tigrina*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 558-63.

Campbell, K., und Götz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development, *Trends Neurosci* 25, 235-8.

Caric, D., Gooday, D., Hill, R. E., McConnell, S. K., und Price, D. J. (1997). Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor *Pax-6*, *Development* 124, 5087-96.

Caviness, V. S., Jr., Goto, T., Tarui, T., Takahashi, T., Bhide, P. G., und Nowakowski, R. S. (2003). Cell output, cell cycle duration and neuronal specification:

a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process, *Cereb Cortex* 13, 592-8.

Chisholm, A. D., und Horvitz, H. R. (1995). Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the Pax-6 family member *vab-3*, *Nature* 377, 52-5.

Clifton, D. R., Goss, R. A., Sahni, S. K., van Antwerp, D., Baggs, R. B., Marder, V. J., Silverman, D. J., und Sporn, L. A. (1998). NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4646-51.

Consortium, I. H. G. S. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409, 860-921.

Cremisi, F., Philpott, A., und Ohnuma, S. (2003). Cell cycle and cell fate interactions in neural development, *Curr Opin Neurobiol* 13, 26-33.

Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J., und Busslinger, M. (1999). *twins of eyeless*, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of *eyeless* in the control of eye development, *Mol Cell* 3, 297-307.

Darwin, C. (1882). *The Origin of Species by means of Natural Selection*, 6th edition edn (London, John Murray).

Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan, M., und Lathe, R. (1997). Variegated gene expression in mice, *Trends Genet* 13, 127-30.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., und Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain, *Cell* 97, 703-16.

Dragatsis, I., Zeitlin, S., (2000). CaMKIIalpha-Cre transgene expression and recombination patterns in the mouse brain, *Genesis* 26, 133-5.

Edlund, T., und Jessell, T. M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system, *Cell* 96, 211-24.

Epstein, J. A., Glaser, T., Cai, J., Jepeal, L., Walton, D. S., und Maas, R. L. (1994). Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the *Pax6* paired domain are regulated by alternative splicing, *Genes Dev* 8, 2022-34.

Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M., und Briscoe, J. (1997). *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling, *Cell* 90, 169-80.

Estivill-Torres, G., Pearson, H., van Heyningen, V., Price, D. J., und Rashbass, P. (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.

Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I., und Whitelaw, E. (1998). Repeat-induced gene silencing in mammals, *Nat Genet* 18, 56-9.

Gehring, W. J. (2002). The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types, *Int J Dev Biol* 46, 65-73.

Gillies, K., und Price, D. J. (1993). The fates of cells in the developing cerebral cortex of normal and methylazoxymethanol acetate-lesioned mice, *Eur J Neurosci* 5, 73-84.

Goridis, C., und Brunet, J. F. (1999). Transcriptional control of neurotransmitter phenotype, *Curr Opin Neurobiol* 9, 47-53.

Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J. L., und Jones, K. R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the *Emx1*-expressing lineage, *J Neurosci* 22, 6309-14.

Gotz, M., Stoykova, A., und Gruss, P. (1998). *Pax6* controls radial glia differentiation in the cerebral cortex, *Neuron* 21, 1031-44.

Goulding, M. D., Lumsden, A., und Gruss, P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord, *Development* 117, 1001-16.

Griffin, C., Kleinjan, D. A., Doe, B., und van Heyningen, V. (2002). New 3' elements control *Pax6* expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region, *Mech Dev* 112, 89-100.

Gurdon, J. B., Dyson, S., und St Johnston, D. (1998). Cells' perception of position in a concentration gradient, *Cell* 95, 159-62.

Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., und Nagy, A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells, *Mech Dev* 76, 79-90.

Halder, G., Callaerts, P., und Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*, *Science* 267, 1788-92.

Hardison, R. C. (2000). Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements, *Trends Genet* 16, 369-72.

Hartfuss, E., Galli, R., Heis, N., und Götz, M (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia, *Dev Biol* 229, 15-30.

Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K. L., Hack, M. A., Chapouton, P., Barde, Y. A., und Götz, M. (2002). Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor *Pax6*, *Nat Neurosci* 5, 308-15.

Henikoff, S. (1998). Conspiracy of silence among repeated transgenes, *Bioessays* 20, 532-5.

Herrup, K., und Busser, J. C. (1995). The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death, *Development* 121, 2385-95.

Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D., und van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene, *Nature* 354, 522-5.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., und Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo second edition (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press).

Hogan, B. L., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C. M., Fisher, G., und Lyon, M. F. (1986). Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse, *J Embryol Exp Morphol* 97, 95-110.

Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., und Doe, C. Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny, *Cell* 106, 511-21.

Jacobson, A. G. (1991). Experimental analysis of the shaping of the neural plate and tube, *Am Zool* 31, 628-643.

Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes, *Nat Rev Genet* 1, 20-9.

Kleinjan, D. A., Seawright, A., Schedl, A., Quinlan, R. A., Danes, S., und van Heyningen, V. (2001). Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6, *Hum Mol Genet* 10, 2049-59.

Kuan, C. Y., Roth, K. A., Flavell, R. A., und Rakic, P. (2000). Mechanisms of programmed cell death in the developing brain, *Trends Neurosci* 23, 291-7.

Kwan, K. M. (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts, *Genesis* 32, 49-62.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-9.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-5.

Lamb, B. T., und Gearhart, J. D. (1995). YAC transgenics and the study of genetics and human disease, *Curr Opin Genet Dev* 5, 342-8.

Lobe, C. G., Koop, K. E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., und Nagy, A. (1999). Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination, *Dev Biol* 208, 281-92.

Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis, *Science* 274, 1109-15.

Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., und Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate, *Neuron* 37, 751-64.

Mao, X., Fujiwara, Y., und Orkin, S. H. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5037-42.

Marin, O., und Rubenstein, J. L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon, *Nat Rev Neurosci* 2, 780-90.

Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., und Gruss, P. (2001). *Pax6* is required for the multipotent state of retinal progenitor cells, *Cell* 105, 43-55.

Maulbecker, C. C., und Gruss, P. (1993). The oncogenic potential of Pax genes, *Embo J* 12, 2361-7.

Mayor, C., Brudno, M., Schwartz, J. R., Poliakov, A., Rubin, E. M., Frazer, K. A., Pachter, L. S., und Dubchak, I. (2000). VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length, *Bioinformatics* 16, 1046-7.

McConnell, S. K. (1985). Migration and differentiation of cerebral cortical neurons after transplantation into the brains of ferrets, *Science* 229, 1268-71.

McConnell, S. K. (1995). Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination, *Neuron* 15, 761-8.

Minichiello, L., Korte, M., Wolfner, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H. P., Bonhoeffer, T., und Klein, R. (1999). Essential role for *TrkB* receptors in hippocampus-mediated learning, *Neuron* 24, 401-14.

Mitsushashi, T., Aoki, Y., Eksioglu, Y. Z., Takahashi, T., Bhide, P. G., Reeves, S. A., und Caviness, V. S., 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, 6435-40.

Muzio, L., DiBenedetto, B., Stoykova, A., Boncinelli, E., Gruss, P., und Mallamaci, A. (2002a). *Emx2* and *Pax6* control regionalization of the pre-neurogenic cortical primordium, *Cereb Cortex* *12*, 129-39.

Muzio, L., DiBenedetto, B., Stoykova, A., Boncinelli, E., Gruss, P., und Mallamaci, A. (2002b). Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in *Emx2*(-/-) *Pax6*(Sey/Sey) double-mutant mice, *Nat Neurosci* *5*, 737-45.

Muzio, L., und Mallamaci, A. (2003). *Emx1*, *emx2* and *pax6* in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex, *Cereb Cortex* *13*, 641-7.

Niwa, H., Yamamura, K., und Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, *Gene* *108*, 193-9.

Nornes, H. O., und Carry, M. (1978). Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis, *Brain Res* *159*, 1-6.

O'Leary, D. D. (1989). Do cortical areas emerge from a protocortex?, *Trends Neurosci* *12*, 400-6.

O'Leary, D. D., und Nakagawa, Y. (2002). Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex, *Curr Opin Neurobiol* *12*, 14-25.

O'Leary, D. D., und Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development, *Curr Opin Neurobiol* *9*, 65-73.

Oppenheim, R. W., Prevette, D., Tytell, M., und Homma, S. (1990). Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes, *Dev Biol* *138*, 104-13.

Polleux, F., Dehay, C., Moraillon, B., und Kennedy, H. (1997). Regulation of neuroblast cell-cycle kinetics plays a crucial role in the generation of unique features of neocortical areas, *J Neurosci* *17*, 7763-83.

Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., und Rubenstein, J. L. (1999). Comparison of the mammalian and avian telencephalon from the perspective of gene expression data, *Eur J Morphol* *37*, 139-50.

Puelles, L., und Rubenstein, J. L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization, *Trends Neurosci* *16*, 472-9.

Qian, X., Goderie, S. K., Shen, Q., Stern, J. H., und Temple, S. (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells, *Development* *125*, 3143-52.

Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., und Gehring, W. J. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans, *Science* *265*, 785-9.

Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J., und Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting, *J Clin Invest* *98*, 600-3.

Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition, *Science* *183*, 425-7.

Rakic, P. (1988). Specification of cerebral cortical areas, *Science* *241*, 170-6.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.) (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sauer, B., und Henderson, N. (1989). Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome, *Nucleic Acids Res* *17*, 147-61.

Scardigli, R., Baumer, N., Gruss, P., Guillemot, F., und Le Roux, I. (2003). Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by *Pax6*, *Development* *130*, 3269-3281.

Scardigli, R., Schuurmans, C., Gradwohl, G., und Guillemot, F. (2001). Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord, *Neuron* *31*, 203-17.

Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., van Heyningen, V., und Hastie, N. D. (1996). Influence of PAX6 gene dosage on development: over-expression causes severe eye abnormalities, *Cell* *86*, 71-82.

Schmahl, W., Knoedlseder, M., Favor, J., und Davidson, D. (1993). Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6-locus, *Acta Neuropathol (Berl)* *86*, 126-35.

Schoenwolf, G. C. (1991). Cell movements driving neurulation in avian embryos, *Development Suppl*, 157-68.

Simpson, T. I., und Price, D. J. (2002). *Pax6*; a pleiotropic player in development, *Bioessays* *24*, 1041-51.

St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., und Gruss, P. (1997). *Pax6* is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas, *Nature* *387*, 406-9.

Stern, C. D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers?, *Nat Rev Neurosci* *2*, 92-8.

Stevens, C. F. (1998). Neuronal diversity: too many cell types for comfort?, *Curr Biol* 8, R708-10.

Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C., und Gruss, P. (1996). Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice, *Development* 122, 3453-65.

Stoykova, A., Gotz, M., Gruss, P., und Price, J. (1997). *Pax6*-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain, *Development* 124, 3765-77.

Stoykova, A., und Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns, *J Neurosci* 14, 1395-412.

Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M., und Gruss, P. (2000). *Pax6* modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon, *J Neurosci* 20, 8042-50.

Sun, H., Rodin, A., Zhou, Y., Dickinson, D. P., Harper, D. E., Hewett-Emmett, D., und Li, W. H. (1997). Evolution of paired domains: isolation and sequencing of jellyfish and hydra Pax genes related to Pax-5 and Pax-6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5156-61.

Takahashi, T., Goto, T., Miyama, S., Nowakowski, R. S., und Caviness, V. S., Jr. (1999). Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall, *J Neurosci* 19, 10357-71.

Takahashi, T., Nowakowski, R. S., und Caviness, V. S., Jr. (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall, *J Neurosci* 15, 6046-57.

Talamillo, A., Quinn, J. C., Collinson, J. M., Caric, D., Price, D. J., West, J. D., und Hill, R. E. (2003). *Pax6* regulates regional development and neuronal migration in the cerebral cortex, *Dev Biol* 255, 151-63.

Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., und Gruss, P. (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by *Svet1* gene expression, *Development* 128, 1983-93.

Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W., und Piatigorsky, J. (1997). Squid Pax-6 and eye development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2421-6.

Ton, C. C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M. M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastie, N. D., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M., und et al. (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region, *Cell* 67, 1059-74.

Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.

Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., Mayford, M., Kandel, E. R., und Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain, *Cell* 87, 1317-26.

Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M., und Pfaff, S. L. (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes, *Cell* 79, 957-70.

Tyas, D. A., Pearson, H., Rashbass, P., und Price, D. J. (2003). *Pax6* regulates cell adhesion during cortical development, *Cereb Cortex* 13, 612-9.

Venter, J. C., und al., e. (2001). The sequence of the human genome, *Science* 291, 1304-51.

Walther, C., und Gruss, P. (1991). *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS, *Development* 113, 1435-49.

Walther, C., Guenet, J. L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M. D., Plachov, D., Balling, R., und Gruss, P. (1991). Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes, *Genomics* 11, 424-34.

Warren, N., Caric, D., Pratt, T., Clausen, J. A., Asavaritikrai, P., Mason, J. O., Hill, R. E., und Price, D. J. (1999). The transcription factor, *Pax6*, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex, *Cereb Cortex* 9, 627-35.

Williams, R. W., und Herrup, K. (1988). The control of neuron number, *Annu Rev Neurosci* 11, 423-53.

Williams, S. C., Altmann, C. R., Chow, R. L., Hemmati-Brivanlou, A., und Lang, R. A. (1998). A highly conserved lens transcriptional control element from the *Pax-6* gene, *Mech Dev* 73, 225-9.

Xu, P. X., Zhang, X., Heaney, S., Yoon, A., Michelson, A. M., und Maas, R. L. (1999). Regulation of *Pax6* expression is conserved between mice and flies, *Development* 126, 383-95.

Xu, Z. P., und Saunders, G. F. (1997). Transcriptional regulation of the human *PAX6* gene promoter, *J Biol Chem* 272, 3430-6.

Xu, Z. P., und Saunders, G. F. (1998). *PAX6* intronic sequence targets expression to the spinal cord, *Dev Genet* 23, 259-63.

Yamaoka, T., Yano, M., Yamada, T., Matsushita, T., Moritani, M., Ii, S., Yoshimoto, K., Hata, J., und Itakura, M. (2000). Diabetes and pancreatic tumours in transgenic mice expressing Pax 6, *Diabetologia* 43, 332-9.

Zernicka-Goetz, M., Pines, J., McLean Hunter, S., Dixon, J. P., Siemering, K. R., Haseloff, J., und Evans, M. J. (1997). Following cell fate in the living mouse embryo, *Development* 124, 1133-7.

Zhang, Y., und Emmons, S. W. (1995). Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans* Pax-6 homologue, *Nature* 377, 55-9.

Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C. L., Fine, A., Chiu, S. Y., und Messing, A. (1997). Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice, *Dev Biol* 187, 36-42.

Zhuo, L., Theis, M., Alvarez-Maya, I., Brenner, M., Willecke, K., und Messing, A. (2001). *hGFAP-Cre* transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo, *Genesis* 31, 85-94.

8. Publikationen

8.1 Wissenschaftliche Artikel

Geisler, M., Kolukisaoglu, Ü.H., Bouchard, R., Billion, K., Berger, J., Saal, B., Frangne, N., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Dudler, R., Blakeslee, J.J., Murphy, A.S., Martinoia, E. und Schulz, B. (2003). TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with Arabidopsis multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. Mol. Biol. Cell, (im Druck)

8.2 Tagungsbeiträge

Müller, M., Berger, J., Cecconi, F., Herken, R., Quondamatteo, F. (2003). Localization of gene expression of the apoptotic protein activating factor 1 (apaf-1) in the early development of the mouse by means of *in-situ* RT-PCR. 98th Versammlung der anatomischen Gesellschaft, Dresden.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Gruss möchte ich herzlich danken, für die Möglichkeit unter seiner Anleitung und Themenstellung promovieren zu dürfen. Seine herausragende Unterstützung ging weit über die Doktorarbeit hinaus und gab mir die notwendige Kraft, die Arbeit zu beenden. Anastassia Stoykova möchte ich besonders bedanken. Sie stand mir für viele anregende Diskussionen und Deutungen histologischer Gehirnschnitte immer zur Seite.

Bei Frau Prof. Dr. Maria Leptin bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der universitären Betreuung.

Many thanks to Francesco Cecconi for nice collegiality, collaboration and many encouragements. In guter Erinnerung habe ich auch die vielen hilfreichen Tips&Tricks von Martin Wagner, Till Marquardt, Ruth Ashery-Padan, Kay Nieselt-Struwe, Kamal Chowdhury, Marianne Schuster und Sharif Mahsur. Ulrich Franke danke ich für die entscheidende Hilfe bei der Mikroinjektion und Rainer Libal et al., sowie Heike Fett für die Hilfe mit der Mausepflege. Matthias Beller danke ich für seine hilfreiche Unterstützung während seines Laborpraktikums.

Auf keinen Fall vergessen möchte ich den Spaß, den ich mit Stefan Pabst, Andre Pires da Silva, May-Britt Becker, Armin Zülch, Lars Wittler, Tobias Klöpfer, Anja Dietrich, Viktor Tarabykin und natürlich Nicole Bäumer hatte.

Meinen geliebten Eltern danke ich für ihre Unterstützung.

Zum Schluß gehen meine Gedanken an Silke...

10. Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Maria Leptin betreut worden.

11. Lebenslauf

Name: Berger

Vorname: Joachim

Geboren: 8. April. 1971

Geburtsort: Mainz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig.

- Sep. 1977 Einschulung in die Grundschule Bonn-Tannenbusch
- 1977 - 1981 Besuch der Kath. Grundschule Alfred Delp
- 1981 - 1992 Besuch des Städtischen Gymnasiums zum Altenforst in Troisdorf.
- Juni 1992 Abitur.
- Okt. 1992 Immatrikulation an der Universität zu Köln im Fach Chemie Diplom.
- Okt. 1994 Immatrikulation an der Universität zu Köln im Fach Biologie Diplom.
- Februar 1995 Diplom-Vorprüfung in Chemie.
- April 1996 Diplom-Vorprüfung in Biologie.
- Februar 1996 Diplom-Prüfung in Chemie.
- Feb. 1996 -
- Dez. 1997 Chemie-Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, in der Arbeitsgruppe von Dr. Schulz.
- Dez. 1997 Diplom-Prüfung in Biologie.
- Dez. 1997
- Mai 1998 Biologie-Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, in der Arbeitsgruppe von Dr. Schulz.
- Juni 1998 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, Abteilung Molekulare Zellbiologie von Prof. Dr. Peter Gruss