

3.3 Grundlegende Mechanismen des pes

Über den pes ist bis heute nur sehr wenig bekannt. Alcantara und Kollegen konnten zeigen, daß die Zellen der unteren rhombischen Lippe, also auch die Zellen des pes, nicht entlang von Gliazellen wandern und auf eine Netrin-1 Quelle zuwandern (Alcantara et al., 2000). Es ist aber durchaus auch möglich, daß neben Netrin-1 auch weitere Proteine, z.B. Sonic Hedgehog, von der Bodenplatte exprimiert werden, die ebenfalls entscheidend für die Wanderung sind. Mit Transplantationsversuchen ist es möglich, die Funktion eines Bereiches sowie dessen molekulare Struktur für die Wanderung zu bestimmen. Welche Proteine dabei eine Rolle spielen, kann mit dieser Methode jedoch nicht geklärt werden.

Für den pes stellten sich die Fragen, ob die Zellen tatsächlich nicht entlang von radialen Fortsätzen wandern, welche Bedeutung der Bodenplattenbereich für die Wanderung hat und ob die Zellen entlang eines vom Substrat vorgegebenen Pfades wandern. Insgesamt wurden zur Beantwortung dieser Fragen vier verschiedene Transplantationen durchgeführt. Jede Transplantation wurde mehrfach wiederholt, wobei von jedem Wurf eines Weibchens einige Embryonen für die Kontrollversuche verwendet wurden. Es wurden ausschließlich YT-P_{hPax6}-tTA transgene Embryonen verwendet, deren rechte rhombische Lippe vor jedem Transplantationsexperiment mit dem TREbi-EGFPm Kontrollvektor elektroporiert wurde.

1. *Transplantationsexperiment:*

Mit diesem Versuchsansatz wurde die Struktur der Bodenplatten in Bezug auf ihre Funktion für die Wanderung untersucht. Es stellte sich die Frage, ob der Bodenplattenbereich homolog strukturiert ist und die Zellen somit keinen bestimmten Bereich bevorzugen, in dem sie die Bodenplatte kreuzen, oder ob die Zellen nur in einem bestimmten Bereich über die Bodenplatte wandern. Dies würde bedeuten, daß dieser Bereich der Bodenplatte besondere strukturelle oder molekulare Eigenschaften aufweist.

Für diesen Versuchsansatz wurde jedes Stammhirn nach der Elektroporation links und rechts parallel zur Bodenplatte durchgeschnitten. Anschließend wurde die Bodenplatte um ca. 2mm in Richtung cerebellarer Anlage verschoben (Fig. 10B). Im Kontrollversuch wurde das Stammhirn lediglich an den gleichen Stellen geschnitten, aber nicht verschoben (Fig. 10A). Das Ergebnis dieses Transplantationsexperiments zeigt eine normale Wanderung der Zellen über die Schnittstellen trotz verschobener

Bodenplatte (n=12; Fig. 10D) und gibt die Verhältnisse des Kontrollversuchs wieder (n = 7; Fig. 10C). Die Verschiebung des Bodenplattenbereichs veranlaßte die Zellen nicht zu einer Richtungsänderung in ihrem Wanderungsverhalten. Die dargestellten Wanderungen in Fig. 10C, D zeigen Kulturen nach 48h Stunden in Kultur. Die Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt noch nicht die Bodenplatte erreicht.

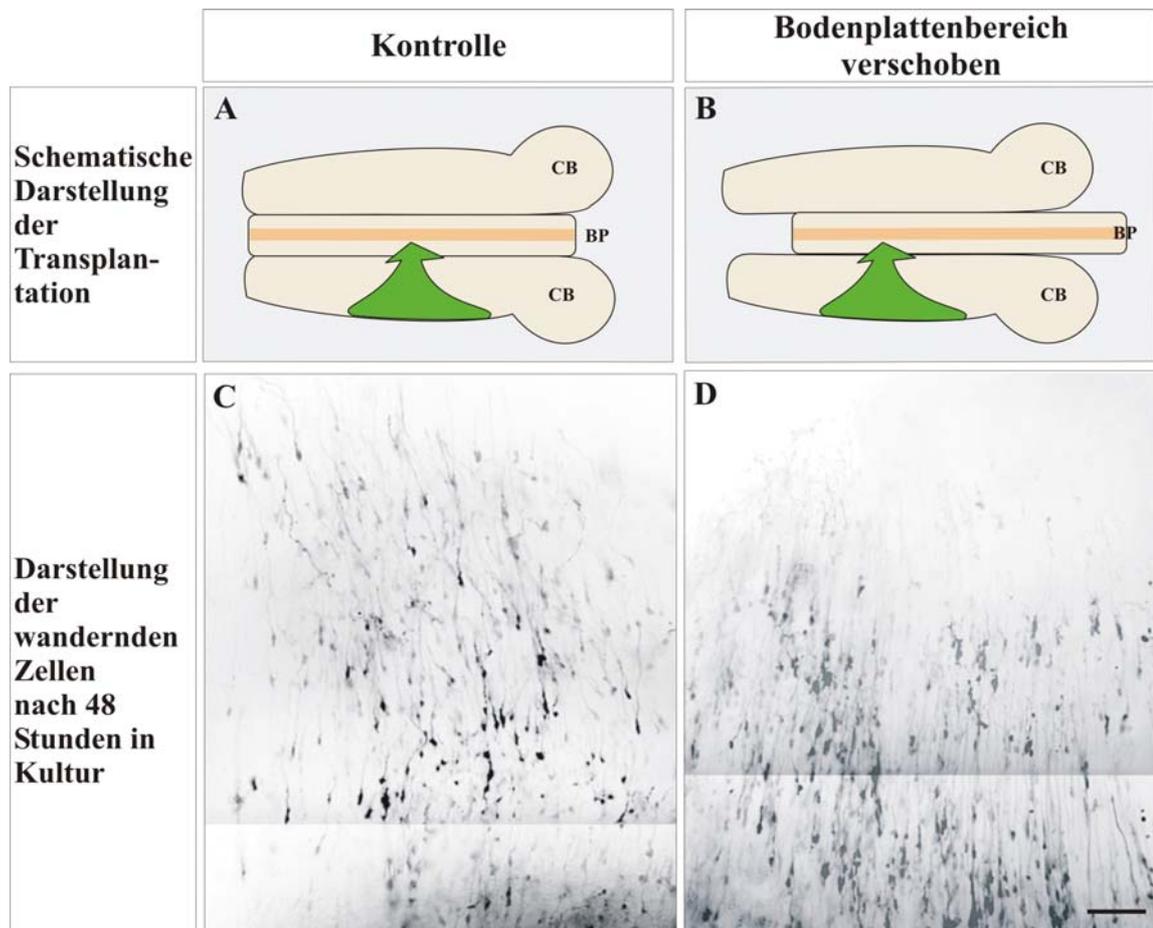


Fig. 10: Darstellung des pes nach Verschiebung der Bodenplatte in Richtung cerebellarer Anlage

A und B: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

C und D: Wanderung der Zellen im Kontrollexperiment und nach Verschiebung der Bodenplatte.

Balken: 100µm

CB: Cerebellum; BP: Bodenplatte

Da die Zellen ihre Wanderung über die Schnittstelle normal fortsetzen können, ist eine Wanderung entlang von radialen Fortsätzen nahezu ausgeschlossen. Weiterhin deuten diese Ergebnisse auf eine homogene Verteilung eines anziehenden Proteins entlang der Bodenplatte. Es weist nichts auf eine abschnittartige Verteilung eines anziehenden Signals im Bereich der Bodenplatte, z.B. in Form von Rhombomeren, hin. Wäre ein anziehendes Signal nur in bestimmten Abschnitten, z.B. Rhombomeren, in der

Bodenplatte exprimiert, hätte es durch die Transplantation zu einer Verschiebung der Wanderung kommen müssen.

2. *Transplantationsexperiment:*

Mit diesem Versuchsansatz wurde die Bedeutung des Bodenplattenbereichs für die wandernden Zellen untersucht. Ist dieser Bereich essentiell für die Wanderung oder wandern die Zellen auch, wenn dieser Bereich des Stammhirns entfernt wurde?

Für diesen Versuchsansatz wurde jedes Stammhirn nach der Elektroporation wiederum links und rechts parallel zur Bodenplatte durchgeschnitten. Anschließend wurde die Bodenplatte entfernt und die lateralen Bereiche des Stammhirns zusammengelegt (Fig. 11B). Im Kontrollversuch wurde das Stammhirn lediglich an den gleichen Stellen geschnitten, aber kein Gewebe entfernt (Fig 11.A).

Zur Verdeutlichung der Auswirkungen der Transplantation wurden *in situ* Hybridisierungen gegen Netrin-1 an den Gewebekulturen durchgeführt. Dadurch war deutlich das Fehlen einer starken Netrin-1 RNA Färbung im Bereich der Bodenplatte im Transplantationsversuch (Fig. 11D), im Gegensatz zur Kontrolle (Fig. 11C), zu erkennen. Die Netrin-1 RNA war aber nicht vollständig entfernt, da eine schwache Färbung in den lateralen Bereichen zu erkennen war. Die visuelle Darstellung der wandernden Zellen des Transplantationsversuchs nach 48 Stunden in Kultur, zeigt den Beginn der Wanderung von der rhombischen Lippe (n = 6; Fig. 11F). Diese Wanderung war jedoch sehr ungeordnet und die Zellen zeigen keine gerichtete Wanderung wie im Kontrollversuch (n = 5; Fig. 11E). Trotz der entfernten Bodenplatte erreichen einige Zellen die Schnittstelle, und somit die künstliche Mittellinie, und kreuzen diese (Fig. 11F). Durch die Entfernung des Bodenplattenbereichs ist es den Zellen immer noch möglich ihre Wanderung zu beginnen. Für eine gerichtete Wanderung scheint aber ein anziehendes, richtungsweisendes Signal von der Bodenplatte zu fehlen. Die *in situ* Hybridisierungen gegen Netrin-1 im Transplantationsversuch zeigen neben der fehlenden Bodenplatte auch eine schwache Expression von Netrin-1 im Bereich der Grund- und Flügelplatte (Fig. 11C, D). Da Netrin-1 nachweislich anziehend auf die Zellen des pes wirkt (Alcantara et al., 2000), könnte diese schwache Netrin-1 Expression in den lateralen Bereichen des Stammhirns bereits ausreichen, um den Beginn der Wanderung zu ermöglichen.

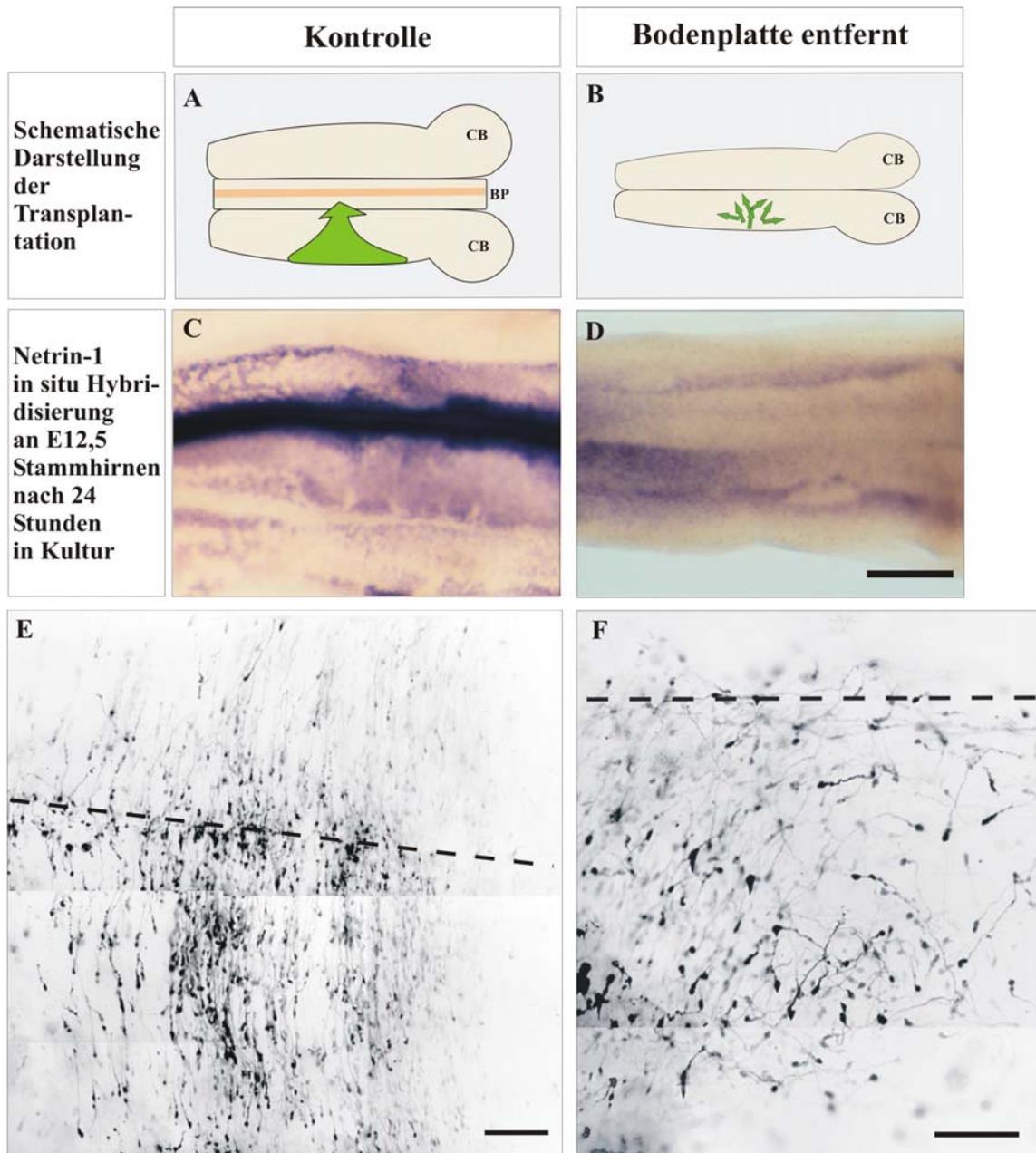


Fig. 11: Darstellung des pes nach Entfernung der Bodenplatte

A und B: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

C und D: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 RNA des Kontrollexperiments und nach Entfernung der Bodenplatte. Gestrichelte Linie: Mittellinie

E und F: Wanderung der Zellen im Kontrollexperiment und nach Entfernung der Bodenplatte.

Balken: 500µm in C und D; 100µm in E und F

CB: Cerebellum; BP: Bodenplatte

Zusätzlich ist durch die *in situ* Hybridisierungen gegen Netrin-1 RNA keine Aussage über die Lokalisation des aus der RNA translatierten Proteins möglich. Untersuchungen zur Ausbildung eines Gradienten von Proteinen belegen ein ausgedehnteres Muster vom Protein im Gegensatz zu seiner RNA (Godhill, 1997; Godhill & Herwig, 1998). Somit ist es möglich, daß durch das Entfernen des Bodenplattenbereichs in diesem

Transplantationsversuch zwar die vollständige RNA entfernt wurde, nicht aber das daraus translatierte Protein.

Durch diesen Versuch wurde deutlich, daß die Zellen trotz fehlender Netrin-1 Quelle im Bodenplattenbereich ihre Wanderung begonnen haben. Daher stellte sich die Frage, ob das Gewebe in der Lage ist, sich in dem Maße zu regenerieren, daß Netrin-1 einige Tage nach Entfernung der Bodenplatte wieder entlang der Schnittstelle exprimiert wird und die Zellen dadurch ihre Wanderung beginnen können. Dazu wurden zusätzlich zu den *in situ* Hybridisierungen gegen Netrin-1 nach 24 Stunden in Kultur auch *in situ* Hybridisierungen nach sieben Tagen in Kultur durchgeführt. Wie auch in dem ersten Versuch wurden Transplantationsexplantate und Kontrollexplantate verwendet. Die Ergebnisse dieser *in situ* Hybridisierungen zeigen keine Regeneration der Netrin-1 Expression nach der Entfernung der Bodenplatte (Fig. 12D). Außerdem ist im Gegensatz zur *in situ* Hybridisierung nach einem Tag in Kultur (Fig. 12B) keine Netrin-1 Expression in der Grund- und Flügelplatte des Stammhirns zu erkennen (Fig. 12C, D). Somit ist das embryonale Stammhirn der Maus nicht zur Regeneration der Netrin-1 Quelle und vermutlich des gesamten Bodenplattenbereichs in der Lage.

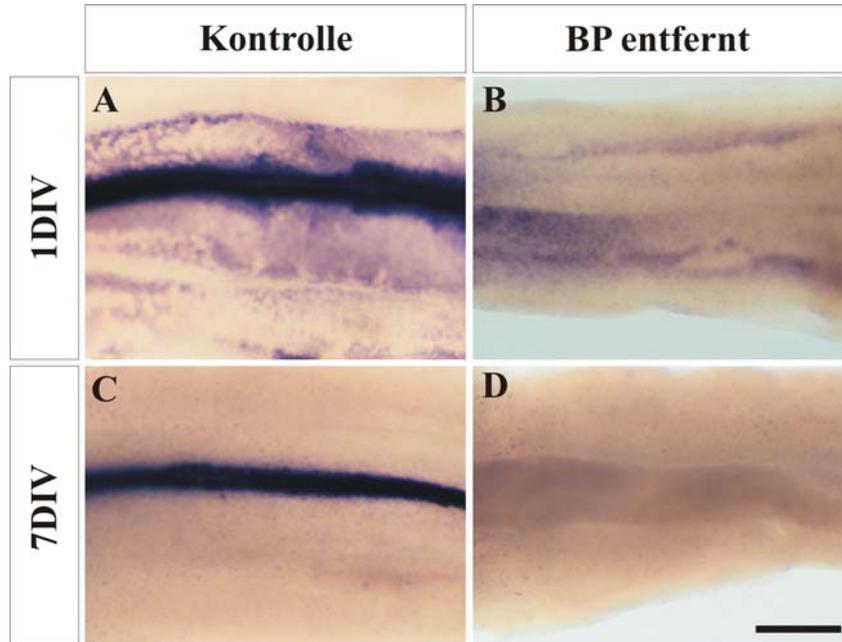


Fig. 12: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 RNA nach Entfernung der Bodenplatte

Unterschiede in der Netrin-1 Expression nach Entfernung der Bodenplatte nach einem und sieben Tagen in Kultur.

BP: Bodenplatte

DIV: days in vitro (Tage in Kultur)

Balken: 500µm

3. *Transplantationsexperiment:*

Mit diesem Versuchsansatz wurde untersucht, auf welche Weise der Bodenplattenbereich die wandernden Zellen beeinflusst. Dafür wurde das Stammhirn nach der Elektroporation 1-2 Tage in Kultur gehalten. Nachdem die Progenitorzellen bereits teilweise die Bodenplatte gekreuzt hatten, wurde ein Schnitt, senkrecht zur Bodenplatte, direkt durch diesen Wanderungsstrom gesetzt. Die Kontrollkulturen wurden entlang der Bodenplatte durchgeschnitten. Anschließend wurde je eine Hälfte der Kontrollkulturen senkrecht an die Zellwanderung gelegt. Somit lag die Bodenplatte des Stammhirns ohne sichtbarer Wanderung senkrecht zur Bodenplatte des Stammhirns mit sichtbarer Wanderung und damit parallel zur Zellwanderung (Fig. 13B). Im Kontrollversuch wurde das Stammhirn nicht mechanisch verändert (Fig. 13A).

Durch eine Netrin-1 *in situ* Hybridisierung des Transplantationsversuchs stellt sich senkrecht zur normalen Bodenplatte (Netrin-1 Quelle) des eigentlichen Explantats eine weitere Bodenplatte (Netrin-1 Quelle) in den Bereichen dar, in denen die Zellen ihre Wanderung beginnen (Fig. 13D). Durch die visuelle Darstellung der wandernden Zellen des Transplantationsversuchs zeigte sich, daß die Zellen, die gerade ihre Wanderung begonnen haben, den ektopischen Bodenplattenbereich bevorzugen und ihre Wanderungsrichtung ändern. Sie wanderten zum näher gelegenen Bodenplattenbereich (n = 12; Fig. 13F). Außerdem wanderten nur Zellen zum ektopischen Bodenplattenbereich, die sich vor der natürlichen Bodenplatte befanden. Hatten die Zellen die natürliche Bodenplatte gekreuzt, ließ sich ihre Wanderungsrichtung durch die ektopische Bodenplatte nicht mehr ändern (Fig. 13F). Für diese Zellen scheint der Bodenplattenbereich seine anziehende Wirkung verloren zu haben.

Insgesamt wandern die Zellen des pes vor der Kreuzung der Bodenplatte auf die am nächsten gelegene Bodenplatte zu. Damit wird die Hypothese eines Konzentrationsgradienten des anziehenden Proteins der Bodenplatte gestärkt. Haben die wandernden Zellen jedoch die Bodenplatte gekreuzt, hat dieser Bereich keine anziehende Wirkung mehr auf sie. Dieses Ergebnis deutet auf eine veränderte Reaktivität der wandernden Zellen durch die Kreuzung der Bodenplatte. Die Rezeptoren, die zuvor auf das anziehende Signal der Bodenplatte reagiert haben, haben nun ihre Wirkung verloren und ein anderes Rezeptor-Liganden-System muß eingeschaltet worden sein, damit die Zellen ihre Wanderung zum Zielort fortsetzen konnten.

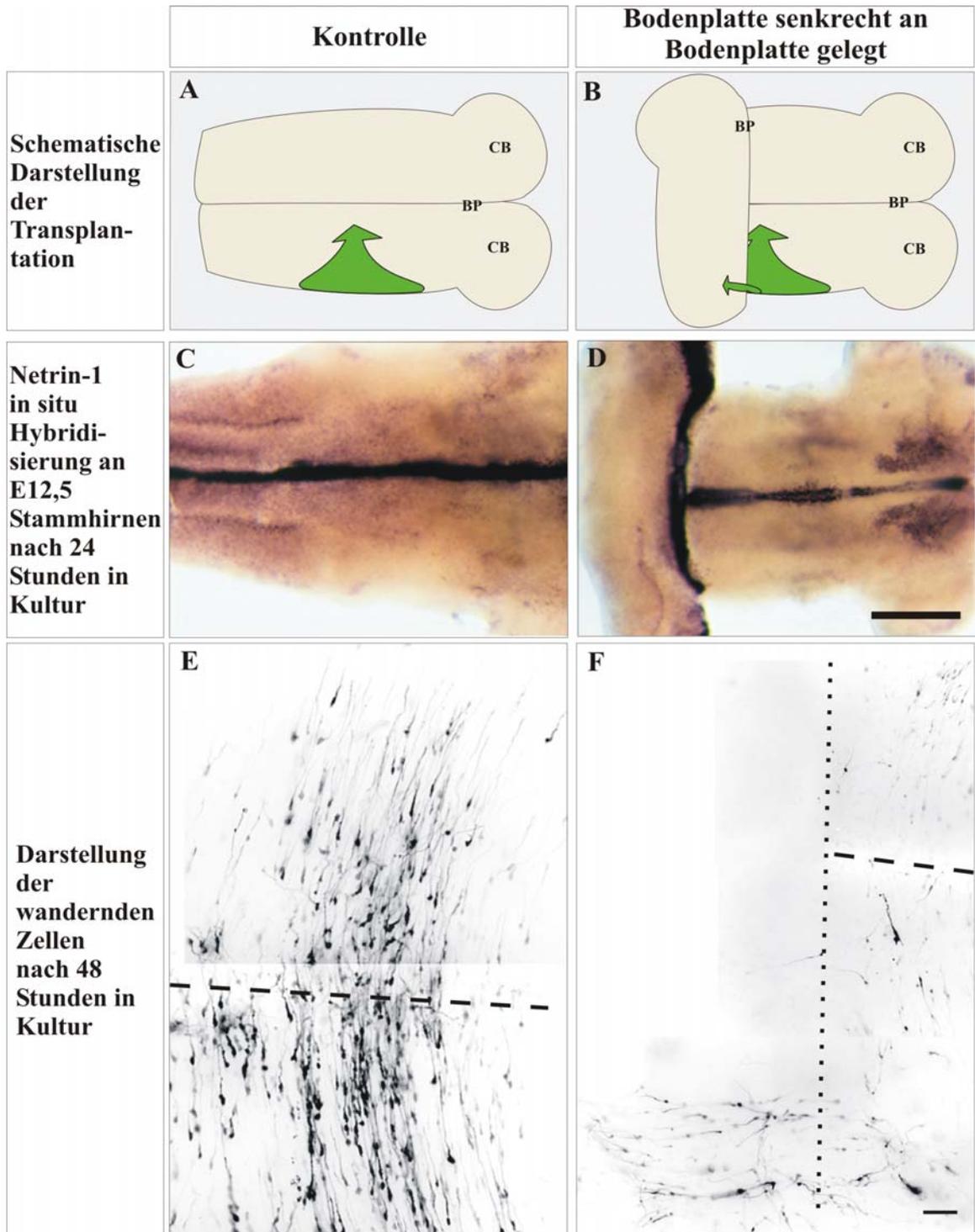


Fig. 13: Darstellung des pes nachdem eine Bodenplatte senkrecht an die Wanderung gelegt wurde

A und B: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

C und D: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 RNA des Kontrollversuchs und nachdem eine Bodenplatte senkrecht an die Wanderung gelegt wurde.

E und F: Wanderung der Zellen im Kontrollversuch und nachdem eine Bodenplatte senkrecht an die Wanderung gelegt wurde.

Balken: 500µm in C und D; 100µm in E und F

Gestrichelte Linie: Mittellinie

Punktierte Linie in F: Verbindung zwischen der Wanderung und der ektopischen Bodenplatte

CB:Cerebellum; BP: Bodenplatte

4. *Transplantationsexperiment:*

Mit diesem Versuchsansatz wurde untersucht, ob die Zellen entlang eines, in struktureller oder molekularer Form, vorgegeben Pfades, wandern. Dafür wurde jedes Stammhirn nach der Elektroporation entlang der Bodenplatte durchgeschnitten. Anschließend wurde die Seite mit der nicht elektroporierten rhombischen Lippe um ca. 2mm in Richtung der cerebellaren Anlage verschoben (Fig. 14B). Im Kontrollversuch wurde das Stammhirn lediglich entlang der Bodenplatte durchgeschnitten, das Gewebe aber nicht verschoben (Fig. 14A).

Zur Verdeutlichung der Auswirkungen der Transplantation wurden *in situ* Hybridisierungen gegen er81 RNA nach 72 Stunden in Kultur durchgeführt. er81 ist ein ETS [avian erythroblastosis virus E26 (twenty six)] Domänen beinhaltender Transkriptionsfaktor und ein spezieller Marker für die inferioren Olivenkerne (Zhu & Guthrie, 2002), die lateral entlang der Bodenplatte liegen. Die Färbung zeigt die verschobene Lage der Olivenkerne im Transplantationsversuch (Fig. 14D) im Gegensatz zum Kontrollversuch (Fig. 14C). Die visuelle Darstellung der wandernden Zellen nach 72 Stunden in Kultur zeigt eine normale Wanderung der Zellen des Transplantationsversuchs (n = 26; Fig. 14F) gegenüber der Kontrollkultur (n = 18; Fig. 14E). Die wandernden Zellen in der Transplantation erreichen die Bodenplatte ebenso auf direktem Weg wie die Zellen der Kontrollkultur. Außerdem ändern die Zellen auch nach dem Kreuzen der Bodenplatte ihre Wanderungsrichtung nicht und lassen sich daher verschoben zu ihren eigentlichen Zielkernen nieder (ohne Abb.). Es scheint daher kein anziehendes Signal in den Zielkernen dieser Neuronen vorhanden zu sein, oder aber dieses Signal ist nicht nur direkt in den Zielkernen sondern entlang des gesamten Stammhirns exprimiert. Die wandernden Zellen scheinen daher auf Grund ihrer eigenen zeitlich organisierten Rezeptorausstattung und der ubiquitären Lokalisation der entsprechenden Liganden im Gewebe ihre Wanderungsrichtung und das Ziel der Wanderung bestimmen zu können.

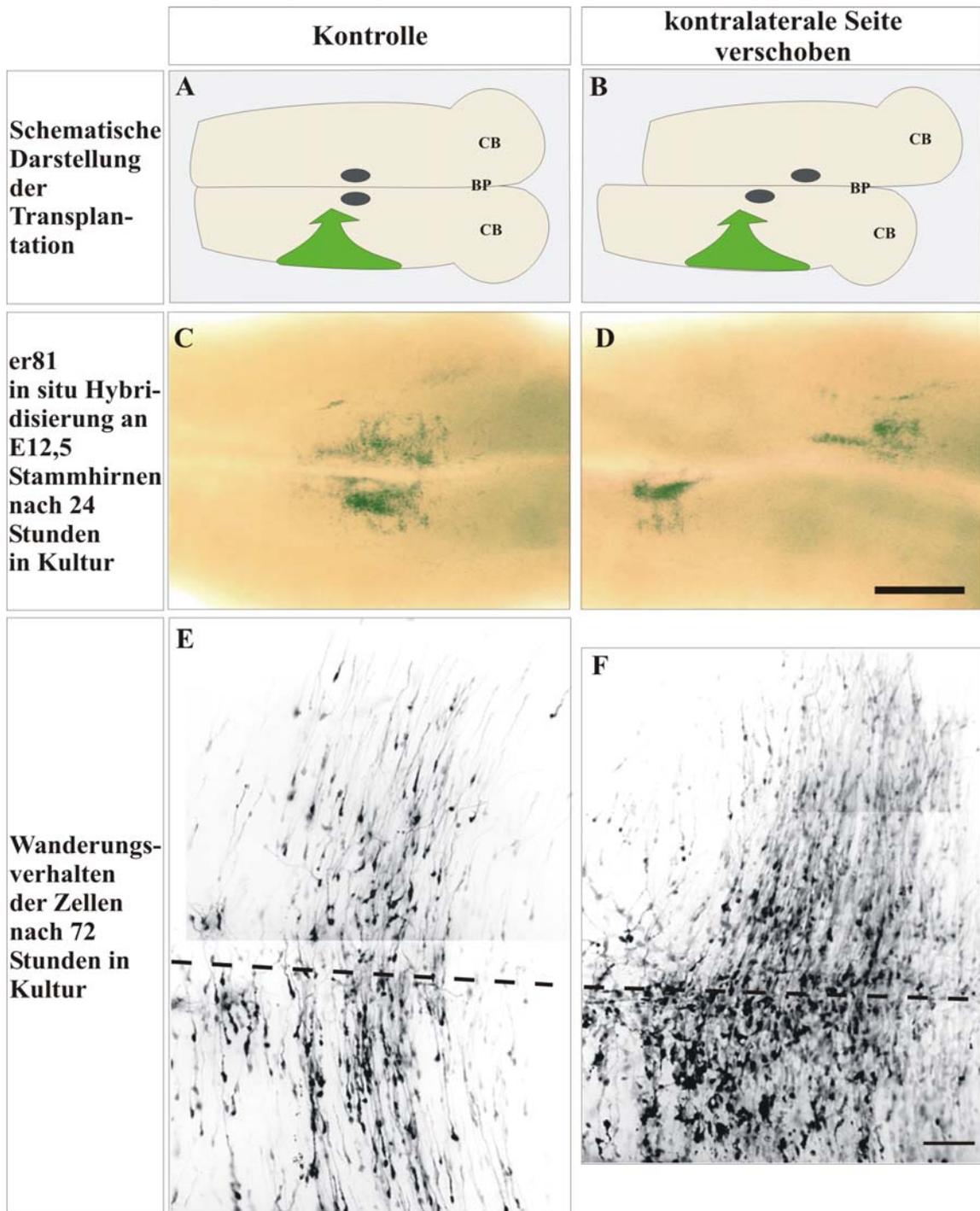


Fig. 14: Darstellung des pes nach Verschiebung des kontralateralen Bereichs in Richtung cerebellarer Anlage

A und B: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

C und D: *In situ* Hybridisierung gegen er81 RNA des Kontrollexperiments und nach Verschiebung des kontralateralen Bereichs

E und F: Wanderung der Zellen im Kontrollexperiment und nach Verschiebung des kontralateralen Bereichs. Gestrichelte Linie: Mittellinie

Balken: 500 μ m in C und D; 100 μ m in E und F

CB: Cerebellum; BP: Bodenplatte

Da es bei den vorgestellten Transplantationsversuchen teilweise zu einer mit der Kontrolle vergleichbaren und teilweise zu einer veränderten Wanderung der Zellen kommt, wurden die Versuche nach ihren Ergebnissen tabellarisch aufgeschlüsselt (Anhang, 7.2). In mindestens 63% der durchgeführten Transplantationsexperimente zeigte sich dabei die beschriebene Wanderung über die Schnittstelle. Weiterhin wurden die Ergebnisse je nach Versuchsansatz in verschiedene Gruppen unterteilt.

3.4 Kollagenkokultur Experimente

Mit Hilfe der Kollagenkokultur war es möglich, Gewebe einer dreidimensionalen Kultur unter bestimmten, kontrollierten Bedingungen zu halten und das Wanderungsverhalten der Zellen unter diesen Bedingungen zu beobachten. Werden z.B. Netrin-1 transfektierte COS-Zellen in einer Kollagenkultur kultiviert, bildet das Netrin-1 über das Kollagen einen Konzentrationsgradienten, der vergleichbar mit dem natürlichen Netrin-1 Gradienten *in vivo* ist. Daher wurde mit dieser Methode die anziehende Wirkung der Bodenplatte auf die Zellen des pes und zusätzlich die Wirkung von Netrin-1 auf diese Wanderung untersucht. Es wurden ausschließlich E12,5 Wildtyp-Embryonen für diesen Versuchsansatz verwendet.

In einer ersten Kollagenkokultur wurde die rhombische Lippe zusammen mit dem Bodenplattenbereich dieses Stammhirns kultiviert. Die Ergebnisse zeigen eindeutig eine Zellwanderung von der rhombischen Lippe zur Bodenplatte (Fig. 15B), im Gegensatz zur Kontrollkultur, bei der die rhombische Lippe mit corticalem Gewebe kokultiviert wurde. Hier waren ausschließlich Zellfortsätze zu erkennen (Fig. 15A). In einer weiteren Kollagenkokultur wurde die rhombische Lippe mit Netrin-1 (Püschel, 1999) transfektierten COS-Zellaggregaten kokultiviert. Die Ergebnisse zeigen eindeutig eine Zellwanderung von der rhombischen Lippe zu den Netrin-1 exprimierenden COS-Zellaggregaten (Fig. 15D) im Gegensatz zur Kontrollkultur, bei der die rhombische Lippe mit untransfektierten COS-Zellen kokultiviert wurden (Fig. 15C).

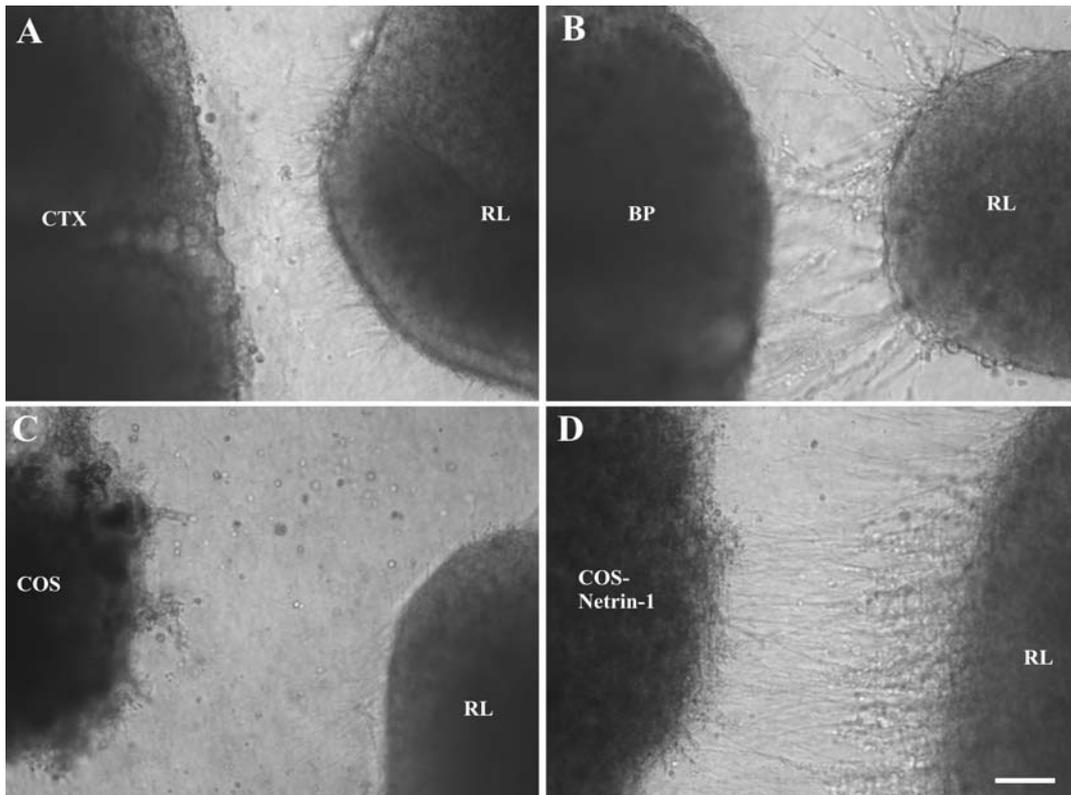


Fig. 15: Kollagenkokultur der rhombischen Lippe von Wildtyp-Mäusen mit der Bodenplatte bzw. mit Netrin-1 transfektierten COS-Zellaggregaten

CTX: Cortex; RL: rhombische Lippe; BP: Bodenplatte; COS: COS-Zellaggregat;
 COS-Netrin-1: COS-Zellaggregat, transfektiert mit einem Netrin-1 Konstrukt
 Balken: 100 μ m

Die Ergebnisse dieser Kollagenkokulturen bestätigen die Bedeutung der Bodenplatte für die wandernden Zellen der rhombischen Lippe. Durch diesen Versuchsaufbau konnte nicht geklärt werden, welche Zellen der rhombischen Lippe zur Bodenplatte und auch zur Netrin-1 Quelle wandern. Außerdem wäre eine Antikörperfärbung gegen das Netrin-1 in den COS-Zellaggregaten von großem Nutzen, damit die Expression dieses Proteins betätigt werden kann. Erste Versuche einer solchen immunhistochemischen Färbung der Kollagenkultur gegen Netrin-1, haben bis heute noch keine aussagekräftigen Ergebnisse geliefert.

Im Folgenden wurde der Bereich der rhombischen Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen vor der Kokultivierung mit dem TREbi-EGFPm Vektor elektroporiert. Dadurch konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop ausschließlich die Pax6 positiven Zellen bei ihrer Wanderung beobachtet werden. Wurde die rhombische Lippe zusammen mit der Bodenplatte kokultiviert, wandern die Zellen auf die Bodenplatte zu (Fig. 16B). Im Kontrollversuch wurde die rhombische Lippe separiert von anderem Gewebe in Kollagen gehalten und auch hier zeigen die Zellen ein Wanderungsverhalten (Fig. 16A). Warum die Zellen der rhombischen Lippe auch ohne einem ersichtlichen

anziehendem Signal ihre Wanderung beginnen können, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise ist auch im Bereich der rhombischen Lippe selbst eine schwache Netrin-1 Expression zu finden, die den Zellen den Beginn ihrer Wanderung ermöglicht. Oder aber der Beginn der Wanderung kann unabhängig von anziehenden Signalen erfolgen, zumindest aber unabhängig von Netrin-1. Eine Kokultivierung des Bereichs der rhombischen Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen mit Netrin-1 transfektierten COS Zellaggregaten steht noch aus.

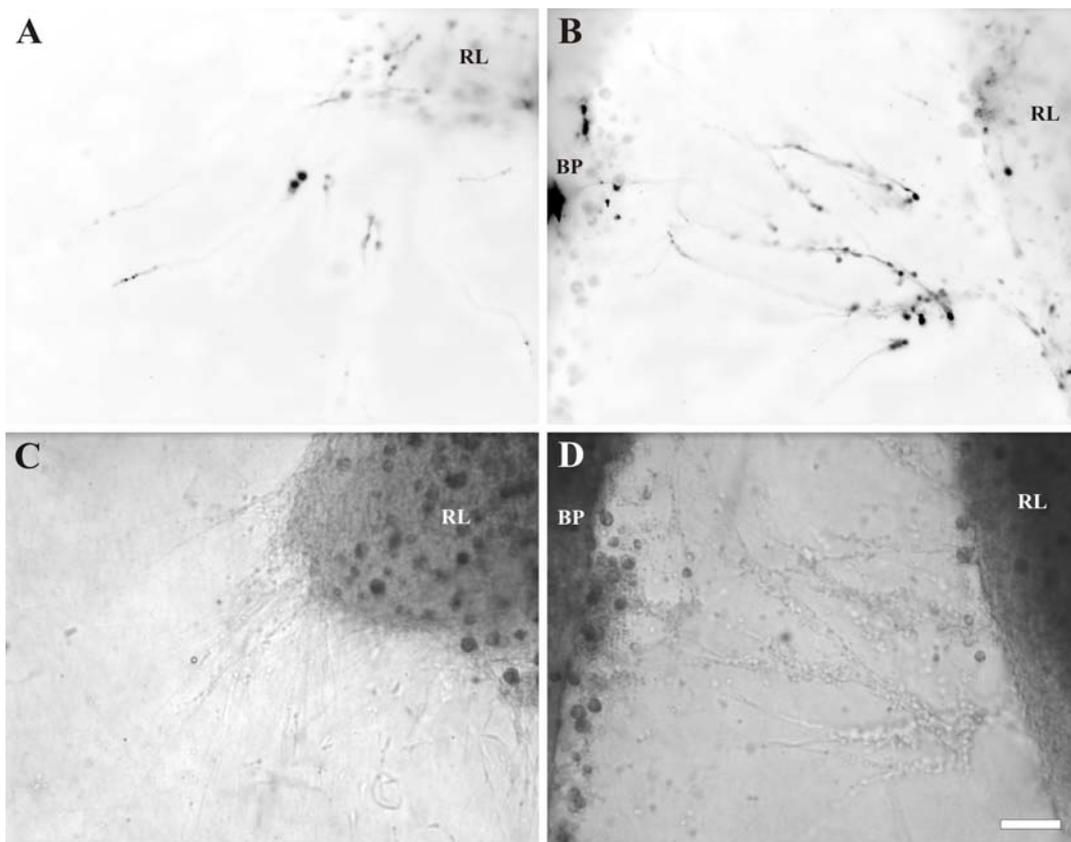


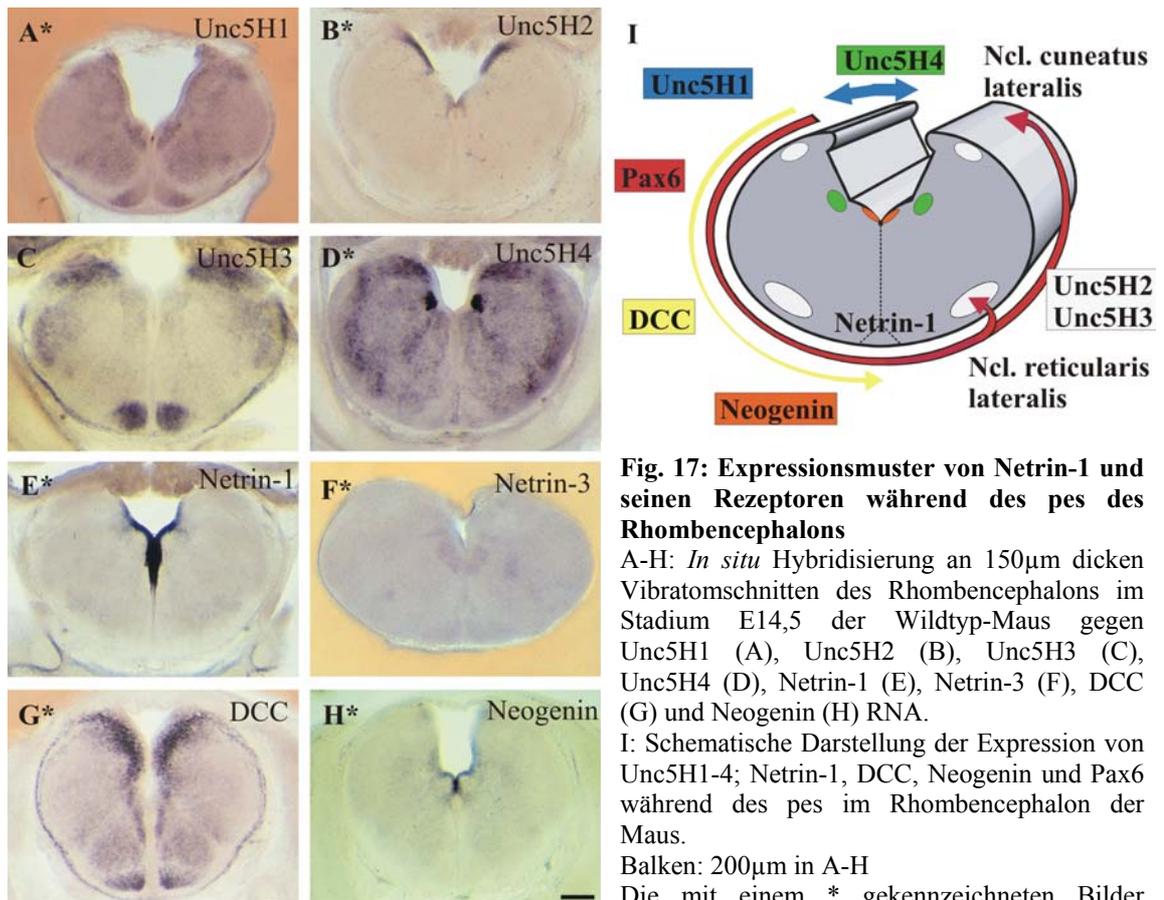
Fig. 16: Kollagenkokultur der rhombischen Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen mit der Bodenplatte nach Elektroporation mit dem TREbi-EGFPm Vektor
 A und B: Fluoreszenzaufnahmen; C und D: Durchlichtaufnahmen
 RL: rhombische Lippe; BP: Bodenplatte;
 Balken: 100µm

Insgesamt zeigen die Kollagenkulturen noch keine eindeutigen Ergebnisse. In der ersten Versuchsreihe fehlt der Beweis der Netrin-1 Expression durch die COS-Zellaggregate. In der zweiten Versuchsreihe dagegen war die fotografische Darstellung der wandernden Zellen besonders schwierig, da die Zellen durch eine dreidimensionale Matrix wandern und mehrere Schärfenebenen gemittelt werden mußten. Zusätzlich konnten bei dieser Versuchsreihe immer nur sehr wenig fluoreszierende Zellen

beobachtet werden. Aus welchem Grund die quantitative Zahl der fluoreszierenden Zellen hier so gering war, konnte nicht geklärt werden.

3.5 Bedeutung des Unc5H3 Rezeptors für den pes

Bereits 1990 konnten Hedgecock und Kollgen eine entscheidende Bedeutung des Unc-5 Rezeptors für die Zellwanderung in *C. elegans* nachweisen. Ihre Ergebnisse an Unc-5 / Unc-6 Doppelmutanten belegen einen Einfluß des Rezeptors für die dorsale Wanderung der Pionieraxone und mesodermalen Zellen (Hedgecock et al., 1990). Durch die Missexpressionsstudien des Unc-5 Rezeptors konnte ein Einfluß des Rezeptors auf die Wanderungen der „distalen Tip“ Zellen in *C. elegans* nachgewiesen werden. Danach führt eine verfrühte Expression des Rezeptors zu einer Änderung im Wanderungsverhalten der missexprimierenden Zellen (Su et al., 2000). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für *Drosophila* gefunden (Keleman & Dickson, 2001, Kaprielian, 2001). Da der Unc-5 Rezeptor sowohl in Nematoden als auch in der Fruchtfliege entscheidend am richtigen Verlauf der unterschiedlichen Zellwanderungen beteiligt ist, wird im Folgenden seine Funktion für den pes des Rhombencephalons der Maus untersucht. Im Gehirn von Vertebraten wurden mittlerweile vier verschiedene Unc-5 Rezeptoren identifiziert (Engelkamp, 2002; Lane et al., 1992; Leonardo et al., 1997). Gegen diese vier Rezeptoren wurden in unserer Arbeitsgruppe *in situ* Hybridisierungen an Vibratonschnitten des Rhombencephalons durchgeführt. Dadurch konnte geklärt werden, ob die Unc5 Rezeptoren während der Wanderung in entscheidenden Bereichen exprimiert werden. Die Ergebnisse zeigen eine Expression aller vier Rezeptoren in diesem Gebiet. Unc5H1 ist zu Beginn der Wanderung in Zellen der rhombischen Lippe und in Zellen der dorsalen Flügelplatte (Fig. 17A), Unc5H2 und 3 in den differenzierenden Zellen des Nucleus reticularis lateralis und Nucleus cuneatus lateralis (Fig. 17B, C) und Unc5H4 im Nucleus hypoglossus und in der Flügelplatte (Fig. 17H) exprimiert (schematische Darstellung in Fig. 17I; Benzing et al., unveröffentlichte Daten.). Da Unc5H3 während der Wanderung in den differenzierenden Zellen des Nucleus reticularis lateralis und cuneatus lateralis exprimiert wird, wurde anschließend seine Funktion für diese Wanderung näher untersucht.



Dazu wurden der vollständige (Abb. 12A) und zwei trunkierte Rezeptorvarianten in den Zellen des pes frühzeitig über- bzw. missexprimiert. Es wurden 2 Versionen des Rezeptors kloniert. Bei der ersten Rezeptorversion wurde die „death Domäne“ (Δ DD; Abb. 12B), die entscheidend für die Signaltransduktion des Rezeptors ist und dadurch zur Apoptose der Zelle führen kann (Hofmann & Tschopp, 1995), bei der Klonierung ausgeschnitten. Bei der zweiten Version wurde der gesamte intrazelluläre Bereich (Δ IC; Abb. 12C) des Rezeptors bei der Klonierung ausgeschnitten. Durch eine Elektroporation dieser Vektorversion in die rhombische Lippe von YT- P_{hPax6} -tTA transgenen Embryonen konnte die Wirkung einer verfrühten und einer ektopischen Expression der einzelnen Rezeptorversionen auf die wandernden Zellen untersucht werden.

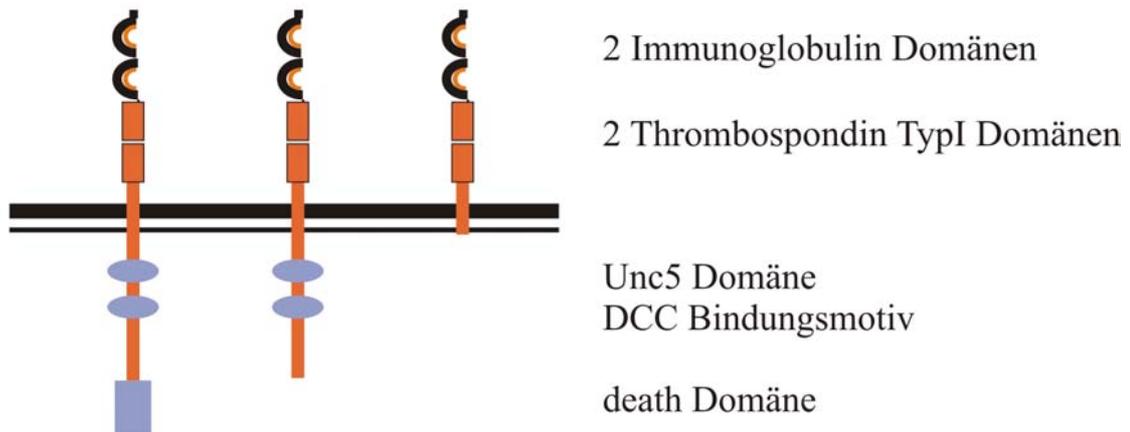


Abb. 12: Molekulare Struktur der drei verwendeten Unc5H3 Rezeptorvarianten

A: Darstellung der vollständigen Unc5H3 Rezeptors mit 2 extrazellulären Immunoglobulin und Thrombospondin Typ I Domänen, einer extrazellulären Unc5 Domäne, DCC Bindungsmotiv und einer „death Domäne“. B: Darstellung der trunkierten Vektorversion mit fehlender „death Domäne“ (ΔDD). C: Darstellung der trunkierten Vektorversion mit fehlendem intrazellulären Bereich (ΔIC).

1. Expression des Unc5H3 Rezeptors im TREbi-EGFPm und TREbi-EGFPmn Vektor in den Zellen des pes

Durch die Verwendung der TREbi-EGFPm/mn Vektoren ist es möglich, das EGFP parallel mit einem weiteren Konstrukt in wandernen Zellen der YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen zu exprimieren. Dies funktioniert auf einem bidirektionalem Weg, das heißt, der Vektor enthält zwei CMV Promotoren mit nachgeschalteten TRE, die in entgegengesetzter Richtung die Transkription steuern und somit werden beide nachgeschalteten Abschnitte gleichzeitig exprimiert. Die vollständige cDNA des Unc5H3 Rezeptors wurde in zwei Versionen dieses Vektors kloniert. Die erste Version enthält ein Grün fluoreszierendes Protein mit einem Kernlokalisierungssignal (EGFPmn). Das EGFP ist daher nur im Nukleus exprimiert. Die zweite Version des Vektors dagegen enthält eine zytoplasmatisch lokalisierte Version des grün fluoreszierenden Proteins (EGFPm), somit wird das EGFP in allen Bereichen der Zelle exprimiert. Dies schließt neben dem Zellsoma auch die Dendriten und Axone ein. Anschließend wurden diese beiden Versionen mit dem Unc5H3 Rezeptor in HEK Zellen transfektiert. Mit dieser Zelllinie ist es möglich, die Expression von Vektorsystemen schnell und kontrolliert zu testen. Da unbehandelte HEK-Zellen kein tTA exprimieren, kann es nach einer Transfektion mit dem TREbi-EGFPmn/m Vektor allein nicht zu einer Fluoreszenz kommen. Werden die Zellen dagegen mit tTA und dem TREbi-EGFPmn/m (Fig. 19A, C) kotransfektiert, kann die DNA des Vektors abgelesen

werden und die Zellen fluoreszieren. Die Ergebnisse dieser Kotransfektion von tTA und Unc5H3 im TREbi-EGFPmn (Fig. 18B) und TREbi-EGFPm (Fig. 18D) weisen eine gute Fluoreszenz der HEK-Zellen nach einem Tag in Kultur im Gegensatz zu den Kontrolltransfektionen auf (Fig. 18A, C).

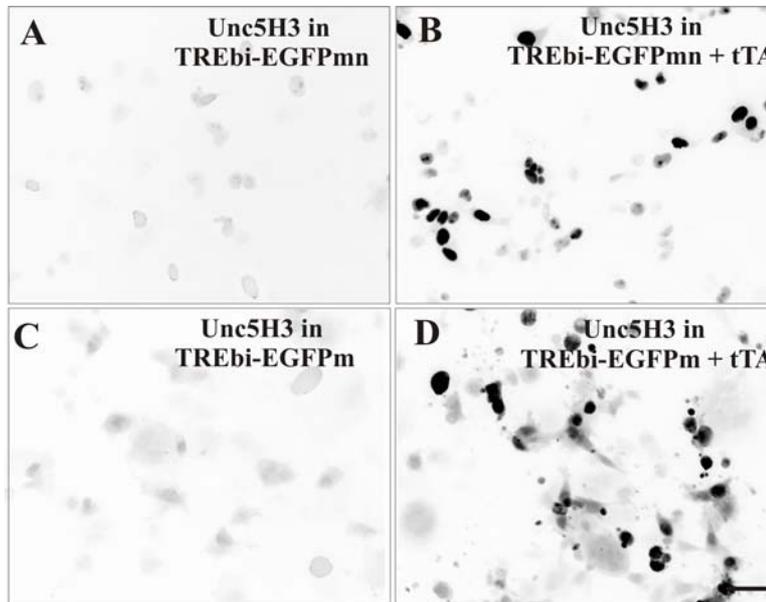


Fig. 18: Kotransfektion von HEK-Zellen mit Unc5H3 im TREbi-EGFPmn/m und tTA
Beschreibung der Ergebnisse im Text
Balken: 100µm

Die Ergebnisse der Kotransfektion weisen eine gute Expression des EGFPs durch das tTA auf. Daher wurde anschließend die rhombische Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen des Stadiums E12,5 mit dem Unc5H3 beinhaltenden TREbi-EGFPmn Vektor (Fig. 19C) elektroporiert. Die Ergebnisse zeigen auch nach 96 Stunden in Kultur keinen Unterschied im Wanderungsverhalten der Zellen im Gegensatz zur Kontrolle (Fig. 19B, D). Für die Kontrolle wurde die rhombische Lippe mit dem gleichen TREbi-EGFPmn Vektor elektroporiert, dieser enthält jedoch nicht die cDNA für den Unc5H3 Rezeptor (Fig. 19A). In beiden Abbildungen ist jedoch erkennbar, daß das EGFP nukleär exprimiert wird. Es sind also nur die Zellkerne erkennbar. Außerdem zeigt sich in beiden Wanderungen, daß die Zellen nach 96 Stunden in Kultur bereits die Bodenplatte gekreuzt haben.

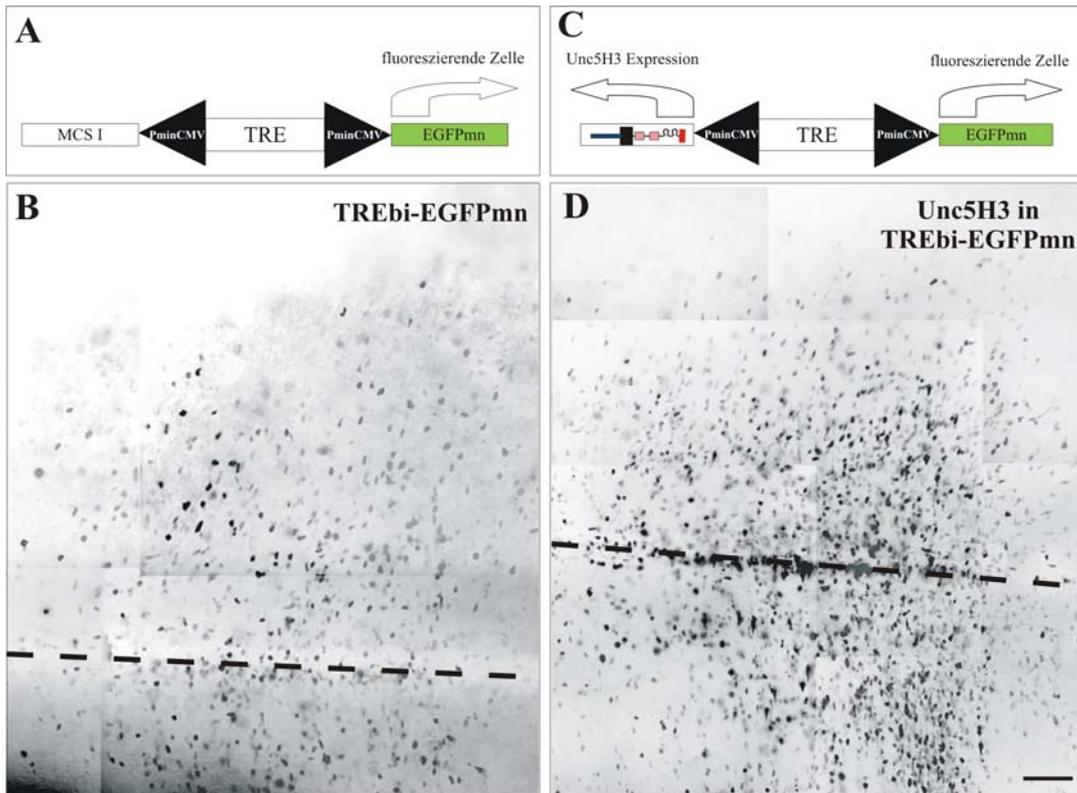


Fig. 19: Elektroporation der rhombischen Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen mit dem Unc5H3 im TREbi-EGFPmn Vektor

A: Schematische Darstellung des TREbi-EGFPmn Kontrollvektors. B: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 96 Stunden in Kultur, elektroporiert mit dem TREbi-EGFPmn. C: Schematische Darstellung des Unc5H3 im TREbi-EGFPmn Vektor. Die gestrichelte Linie gibt den Bereich der Bodenplatte an. D: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 96 in Kultur, elektroporiert mit Unc5H3 im TREbi-EGFPmn.

Balken: 100μm

Wurde die rhombische Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen mit dem Unc5H3 beinhaltenden TREbi-EGFPm Vektor (Fig.20C) elektroporiert, zeigt sich auch hier nach 96 Stunden kein Unterschied im Wanderungsverhalten der Zellen gegenüber der Kontrolle (Fig.20B, D). Für die Kontrolle wurde die rhombische Lippe mit dem gleichen TREbi-EGFPm Vektor elektroporiert, dieser enthielt jedoch nicht die cDNA für den Unc5H3 Rezeptor (Fig. 20A). In beiden Abbildungen ist jedoch erkennbar, daß das EGFPm zytoplasmatisch exprimiert wird. Es sind also alle Zellbereiche erkennbar. Außerdem zeigt sich in beiden Wanderungen, daß die Zellen nach 96 Stunden in Kultur bereits die Bodenplatte gekreuzt haben.

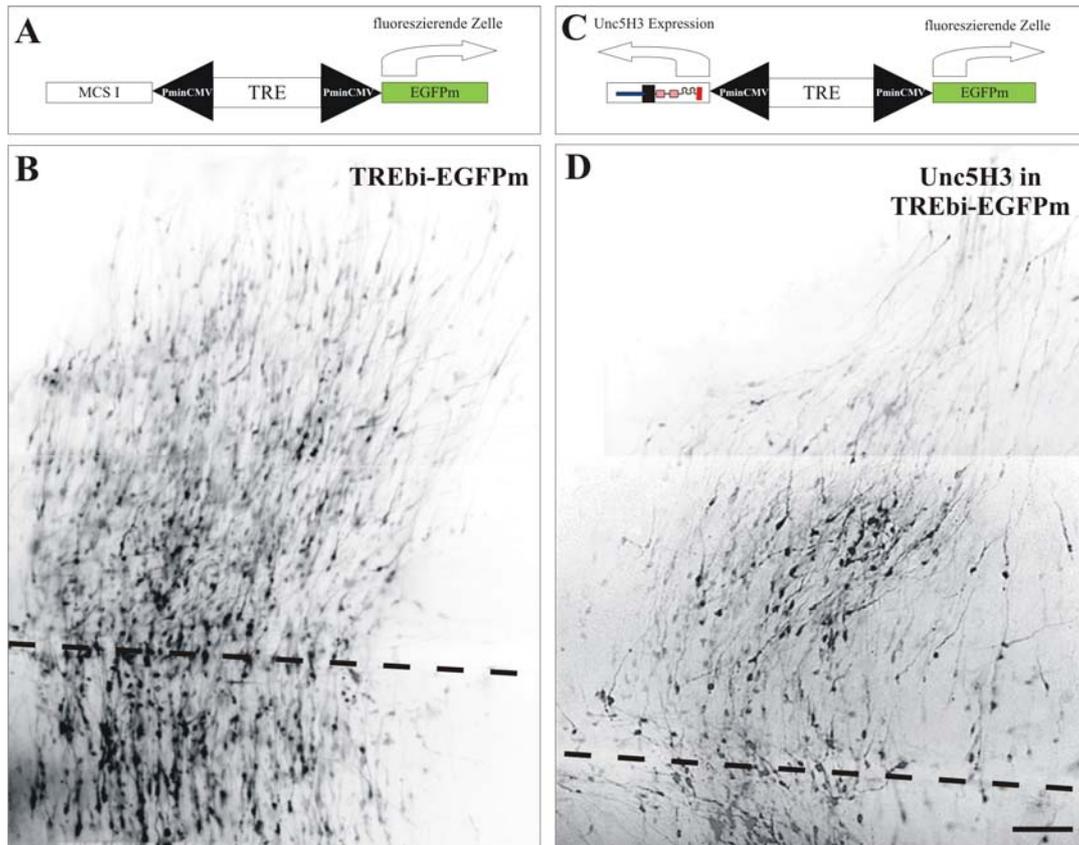


Fig. 20: Elektroporation der rhombischen Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen mit dem Unc5H3 im TREbi-EGFPm Vektor

A: Schematische Darstellung des TREbi-EGFPm Kontrollvektors. B: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 96 Stunden in Kultur, elektroporiert mit dem TREbi-EGFPm. C: Schematische Darstellung des Unc5H3 im TREbi-EGFPm Vektor. D: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 96 in Kultur, elektroporiert mit dem Unc5H3 im TREbi-EGFPm. Die gestrichelte Linie gibt den Bereich der Bodenplatte an.

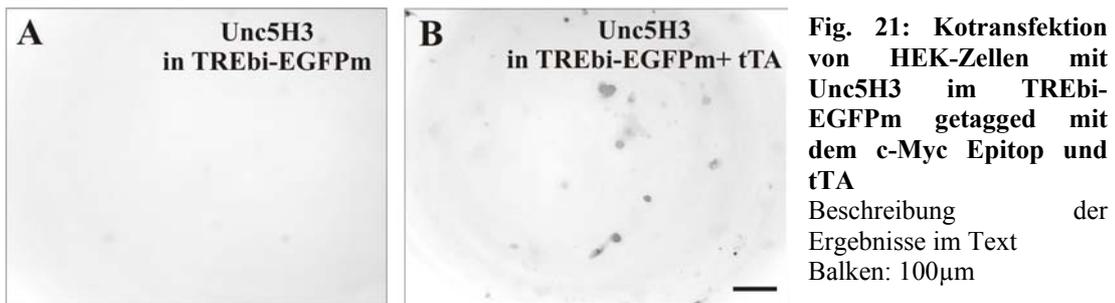
Balken: 100μm

Ist es möglich, daß eine Überexpression des Unc5H3 tatsächlich keinen Einfluß auf das Wanderungsverhalten nimmt oder, daß das bidirektionale Vektorsystem das EGFPm/mn und Unc5H3 nicht gleichzeitig exprimiert? Zur Klärung dieser Frage wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

2 Expression des Unc5H3, ΔDD oder ΔIC im TREbi-EGFPm Vektor, getagged mit dem HA oder c-Myc Epitop, in den Zellen des pes

Für diesen Versuchsansatz wurde der Unc5H3 Rezeptor sowie die trunkierten Versionen ΔDD bzw. ΔIC mit einem HA bzw. mit einem c-Myc Epitop fusioniert und anschließend in den TREbi-EGFPm Vektor kloniert. Durch das HA bzw. c-Myc Epitop ist es möglich, die Zellen, die diesen Abschnitt des Vektors exprimieren mit Hilfe von Antikörpern nachzuweisen. Dadurch kann überprüft werden, ob die Zellen, die das EGFPm exprimieren auch die jeweilige Unc5H3 cDNA exprimieren.

Zur ersten Kontrolle dieses Vektorsystems wurde beispielhaft der Vektor mit dem vollständigen Unc5H3 Rezeptor, getagged mit c-Myc, mit tTA in HEK-Zellen kotransfiziert. Die Ergebnisse der Kotransfektion weisen eine gute Expression des EGFPm (Fig. 21B) im Gegensatz zur Kontrolle auf (Fig. 21A). Die gleichen Ergebnisse wurden für die Vektoren mit trunkierten Versionen des Unc5H3 gewonnen (Ohne Abb.).



Die Ergebnisse der Kotransfektion zeigen eine gute Expression des EGFPm, daher wurden die HEK-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion in 0,4% PFA fixiert. Die Färbung wurde anschließend, wie in Material und Methoden 2.2.3 beschrieben, durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Vektorkonstrukt in HEK Zellen transfiziert, von dem bereits bekannt war, daß eine Färbung des HA Epitops möglich ist. Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Färbung zeigten eine starke Färbung des Kontrollkonstrukts (ohne Abb.). Die Zellen exprimierten also das HA-Epitop. Alle TREbi-EGFPm(Unc5H3-HA/c-Myc) Vektorversionen zeigten jedoch keinerlei Färbung (ohne Abb.). Somit konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht geklärt werden, warum eine Überexpression oder eine ektopische Expression des Unc5H3 keinen Einfluß auf das Wanderungsverhalten der Zellen der rhombischen Lippe nimmt. Eine fehlerhafte Färbeprozedur kann durch die gelungene Färbung des Kontrollkonstrukts ausgeschlossen werden. Möglicherweise wird das HA bzw. c-Myc Epitop von dem Vektor nicht exprimiert oder das verwendete HA bzw. c-Myc Epitop enthält nicht genügend Sequenzwiederholungen, so daß das gebildete Protein in zu geringer Konzentration für eine immunhistochemische Färbung in den HEK-Zellen vorliegt. Neben diesem Versuchsansatz wurde der bidirektionale Vektor in unserem Labor mit mehreren Reportergenen getestet. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen in keiner der Reportergenversionen eine bidirektionale Expression des Vektors (unveröffentlichte Daten, D. Engelkamp). Somit konnten unsere Versuche die bidirektionale Funktionsweise des verwendeten Vektors nicht bestätigen (Baron et al., 1995; Krestel et al., 2001).

Anschließend wurde der Unc5H3fullL-c-Myc beinhaltende TREbi-EGFPm Vektor (Fig. 22C) in die rhombische Lippe von YT-P_{hpax6}-tTA transgenen Embryonen elektroporiert und wie erwartet zeigt sich auch hier das gleiche Bild wie schon in Fig. 20. Nach 72 Stunden in Kultur zeigt die Wanderung, die mit dem Unc5H3-c-Myc beinhaltenden TREbi-EGFPm Vektor elektroporiert wurde (Fig. 22D) kein Unterschied zum Kontrollversuch (Fig. 22B). Die gleichen Ergebnisse wurden für die Vektoren mit trunktierten Versionen des Unc5H3 und den HA getaggt Versionen gewonnen (Ohne Abb.).

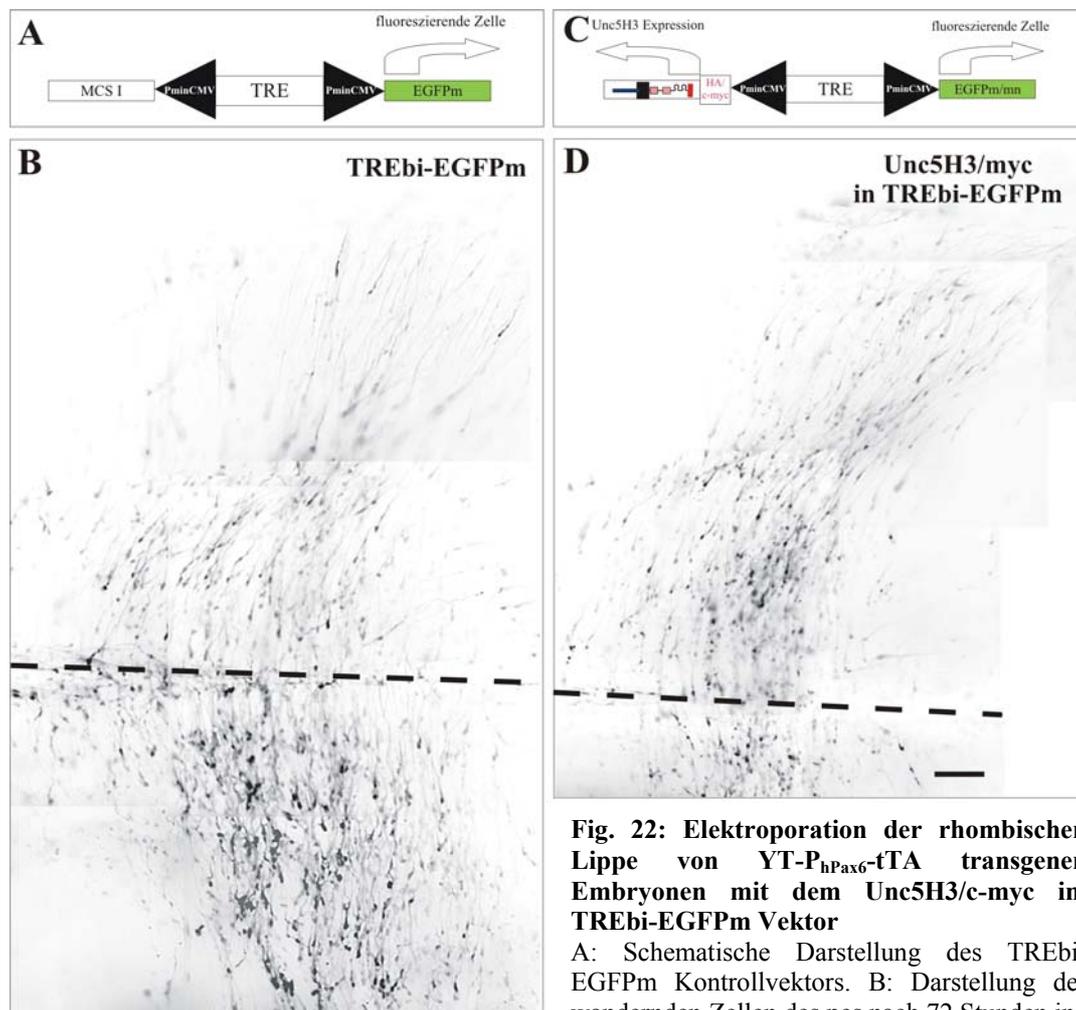


Fig. 22: Elektroporation der rhombischen Lippe von YT-P_{hpax6}-tTA transgenen Embryonen mit dem Unc5H3/c-myc im TREbi-EGFPm Vektor

A: Schematische Darstellung des TREbi-EGFPm Kontrollvektors. B: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 72 Stunden in Kultur, elektroporiert mit dem TREbi-EGFPm. C: Schematische Darstellung des Unc5H3fullL/c-Myc im TREbi-EGFPm Vektor. D: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 72 in Kultur, elektroporiert mit dem Unc5H3/c-Myc im TREbi-EGFPm. Die gestrichelte Linie gibt den Bereich der Bodenplatte an. Balken: 100µm

3 Gleichzeitige Expression des Unc5H3, Δ DD oder Δ IC im TREbi Klonierungsvektor mit dem TREbi-EGFPm Vektor in den Zellen des pes

Eine andere Möglichkeit einer gleichzeitigen Expression des Unc5H3 Rezeptors und des EGFPm in den wandernden Zellen ist eine Doppelelektroporation zweier Vektoren, die jeweils eines der Gene exprimieren. Für diesen Versuchsaufbau wurde die cDNA des vollständigen Unc5H3 Rezeptors sowie der trunkierten Versionen in den TREbi-Klonierungsvektor (Fig. 23C) kloniert. Anschließend wurde die rhombische Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen mit diesem TREbi-Unc5H3 Vektor sowie mit dem TREbi-EGFPm Vektor (Fig. 23A) koelektroporiert. Dabei wurde eine Mischung von 1:1 der beiden Vektoren verwendet. Die Doppelelektroporation führte jedoch ebenfalls zu keiner Veränderung im Wanderungsverhalten der Zellen (Fig. 23B) im Gegensatz zur Kontrolle (Fig. 23B). Nach 72 Stunden in Kultur hatten die Zellen bereits die Mittellinie gekreuzt und ließen sich kontralateral in ihren Zielkernen nieder. In Fig. 23D wurde beispielhaft die Wanderung gezeigt, die nach der Elektroporation der rhombischen Lippe mit dem Unc5H3 Δ DD Rezeptor zu beobachten war. Eine Elektroporation mit der vollständigen Unc5H3 Rezeptor cDNA oder mit der cDNA der trunkierten Unc5H3 Δ IC Version zeigten gleiche Ergebnisse (ohne Abb.).

Auch durch die Doppelelektroporation der beiden Vektorsysteme ergeben sich keine sichtbaren Unterschiede im Wanderungsverhalten der Zellen des pes. Bei diesem Versuchsaufbau ist es möglich, daß eine Zelle nur mit einem, oder aber mit beiden Vektoren elektroporiert wurde. Für ein aussagekräftiges Ergebnis müßten nahezu alle Zellen mit beiden Vektoren elektroporiert gewesen sein, dies scheint aber nicht der Fall zu sein, da kein Unterschied im Wanderungsverhalten der Zellen zu erkennen ist.

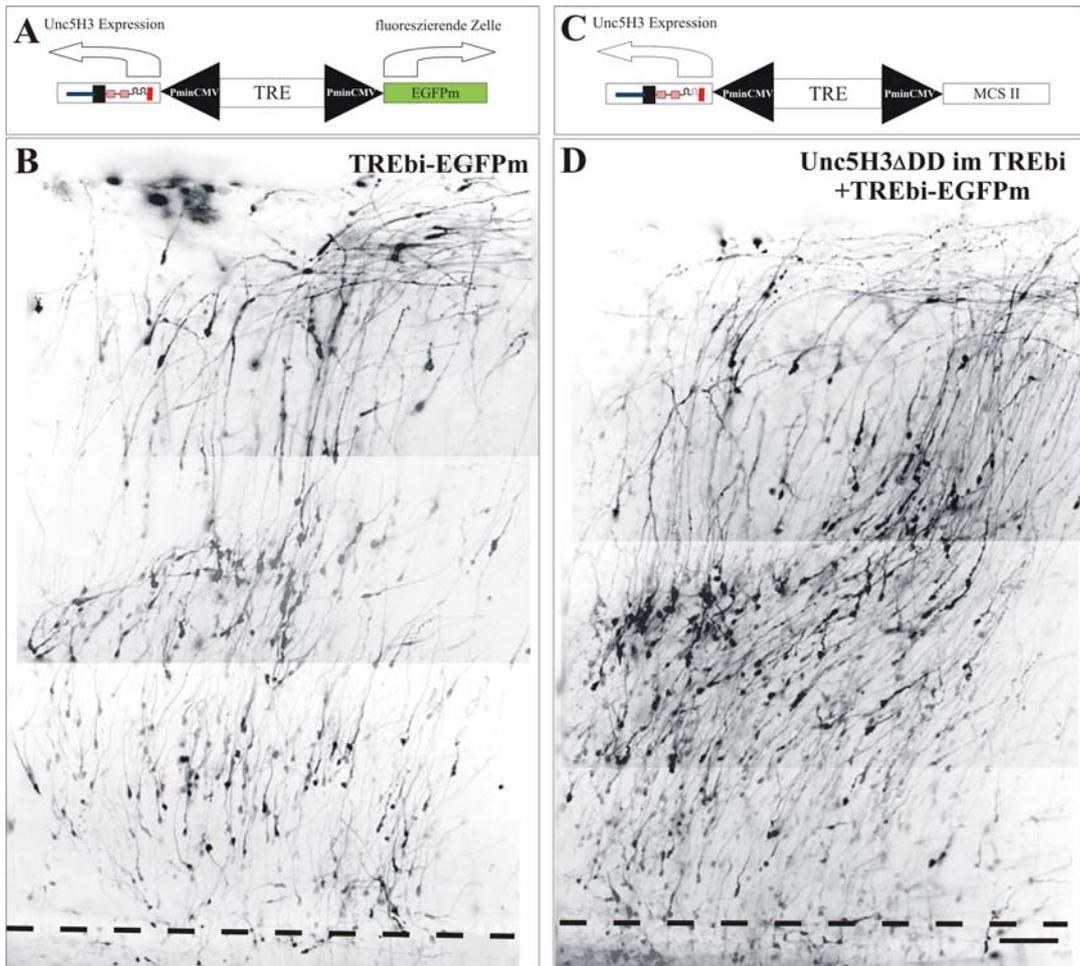


Fig. 23: Koelektroporation der rhombischen Lippe von YT- P_{hPax6} -tTA transgenen Embryonen mit dem Unc5H3 Δ DD im TREbi- und dem TREbi-EGFPm Vektor

A: Schematische Darstellung des TREbi-EGFPm Kontrollvektors. B: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 72 Stunden in Kultur, elektroporiert mit dem TREbi-EGFPm. C: Schematische Darstellung des Unc5H3 im TREbi Vektor. D: Darstellung der wandernden Zellen des pes nach 72 in Kultur, elektroporiert mit dem Unc5H3 Δ DD im TREbi und dem TREbi-EGFPm Vektor.

Balken: 100 μ m

Eine weitere Möglichkeit das EGFPm und die Rezeptor cDNA gleichzeitig in den wandernden Zellen des pes zu exprimieren ist die Herstellung eines Fusionsproteins. Diese Methode soll daher im Folgenden Anwendung finden.

4 Expression des Unc5H3, Δ DD oder Δ IC im TREbi 4751 Vektor, fusioniert mit EGFP, in den Zellen des pes

Für diesen Versuchsaufbau wurden alle drei Rezeptorversionen als C-terminales Fusionsprotein mit EGFPm jeweils in die MCS I oder MCS II des TREbi-4751 Vektors kloniert. Zur ersten Kontrolle der Vektorsysteme wurden sie jeweils in HEK-Zellen mit dem tTA kotransfiziert. Die Ergebnisse belegen eine gute Fluoreszenz des EGFPm aller drei Rezeptorversionen (Fig. 24B, C, D) im Gegensatz zur Kontrolle (Fig. 24A).

Die Expressionsstärke war unabhängig von der MCS. Die Kontrollversuche mit dem Unc5H3delDD+EGFPm und Unc5H3delIC+EGFPm sind hier nicht dargestellt sie zeigten aber das gleiche Resultat wie die Kontrolle des Unc5H3fullL+EGFP (Fig. 24A).

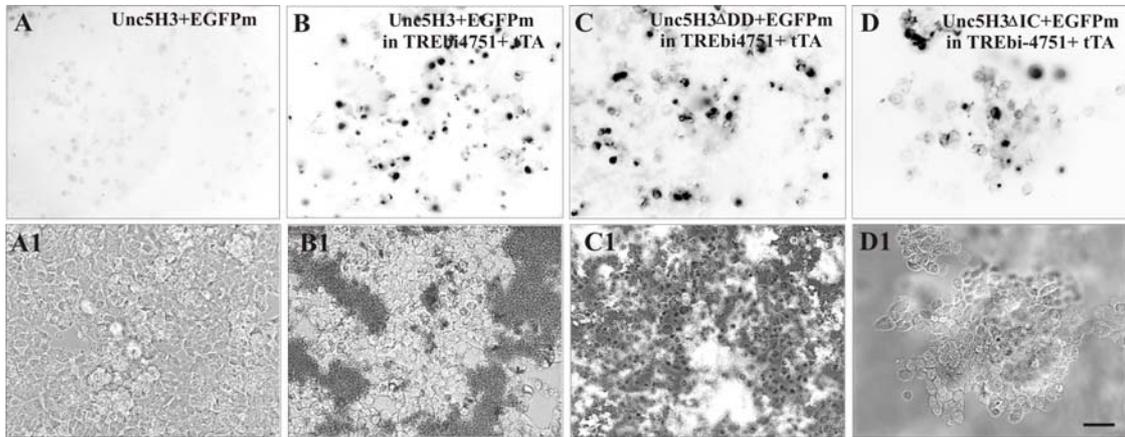


Fig. 24: Kotransfektion von HEK-Zellen mit Unc5H3/ Δ DD/ Δ IC+EGFPm im TREbi4751 Vektor und tTA

A: Alleinige Transfektion des Unc5H3+EGFPm in HEK-Zellen. B-D: Kotransfektion der drei Unc5H3 Rezeptorvarianten mit tTA. A1-D1: Durchlichtaufnahmen der Fluoreszenzbilder von A-D.

Balken: 100 μ m

Die Ergebnisse der Kotransfektion zeigen eine gute Expression des EGFPm in HEK-Zellen, daher müßte nicht nur die cDNA des EGFPm exprimiert werden, sondern auch die cDNA des Rezeptors. Anschließend wurden alle drei Vektorversionen, fusioniert mit EGFPm im TREbi4751 Vektor (Fig. 25II, III), in die rhombische Lippe von YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Embryonen des Stadiums E12,5 elektroporiert. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zellen des pes ihre Wanderung, auch nach 24 Stunden in Kultur, im Gegensatz zur Kontrolle (Fig. 25A) nicht beginnen (Fig. 25B-D). Außerdem zeigen die elektroporierten Zellen nur im Zellsoma eine Fluoreszenz, die Zellfortsätze fluoreszierten nicht. Daher scheint der Rezeptor nur im Zellsoma exprimiert zu werden. Nach ca. 72 Stunden in Kultur konnte keine Fluoreszenz der Zellen mehr beobachtet werden (ohne Abb.).

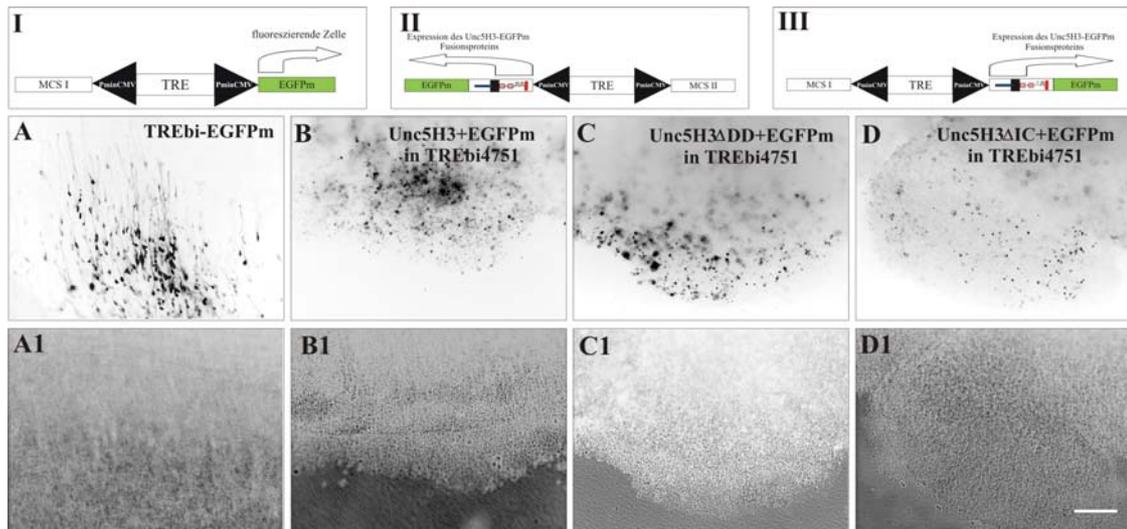


Fig. 25: Elektroporation der rhombischen Lippe von YT- P_{hPax6} -tTA transgenen Embryonen mit Unc5H3/ Δ DD/ Δ IC+EGFPm im TREbi4751 Vektor nach 24 Stunden in Kultur

A: Kontrolle; die Zellen haben nach 24h in Kultur die Wanderung begonnen und wandern auf die Bodenplatte zu. B-D Elektroporation der rhombischen Lippe mit einem der drei Fusionsproteine; nur vereinzelte fluoreszierende Zellen sind zu erkennen. Balken: 100 μ m

Da die Zellen des pes durch die Überexpression der drei Unc5H3-Versionen an der rhombischen Lippe verbleiben, ist es möglich, daß sie ihre Wanderung gar nicht erst beginnen, oder daß sie einen anderen Wanderungsweg einschlagen, der durch die Aufsichtaufnahmen des Stammhirns nicht erkennbar ist. Daher wurden die elektroporierten Stammhirne 24 Stunden nach der Aufnahme der in Fig. 25 gezeigten Bilder fixiert und transverse Vibratonschnitte der Stammhirne hergestellt. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Zellen ihre Wanderung durch das Parenchym des Gewebes beginnen.

In der schematischen Darstellung (Fig. 26A) ist der Wanderungsverlauf eines Kontrollversuchs bei transverser Schnittebene dargestellt. Die transversen Schnitte der mit den Fusionsproteinen elektroporierten rhombischen Lippen zeigen nach 48 Stunden in Kultur kaum noch eine Fluoreszenz der wandernden Zellen (Fig. 26B, C, D). Auch in den vergrößerten Darstellungen der rhombischen Lippe sind kaum fluoreszierende Zellen zu sehen (Fig. 26B2, C2, D2). Die Expressionsstärke war unabhängig von der MCS. Besonders an der rhombischen Lippe, die mit dem Unc5H3 Δ DD+EGFPm Fusionsprotein elektroporiert wurde (Fig. 26D2) ist zu erkennen, daß die Zellen sich teilweise im Parenchym des Rhombencephalons befinden. Eine gezielte und gerichtete Wanderung der Zellen konnte nicht beobachtet werden. Im Kontrollexperiment haben die Zellen nach 48 Stunden in Kultur ihre Wanderung begonnen und die ersten Zellen kreuzen bereits die Bodenplatte (Fig. 26A1).

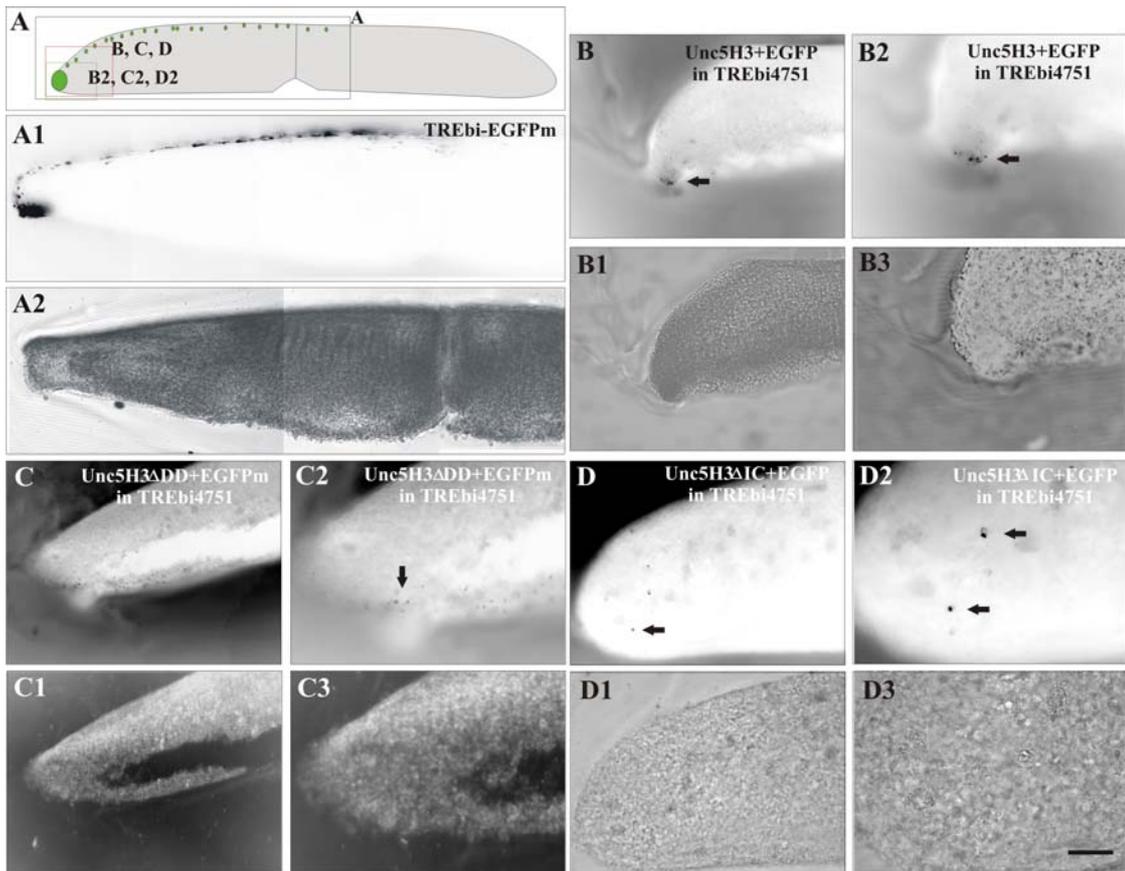


Fig. 26: Transverse Ansicht des pes nach Elektroporation der rhombischen Lippe von YT- P_{hPax6} -tTA transgenen Embryonen mit dem Unc5H3/ Δ DD/ Δ IC+EGFPm im TREbi4751 Vektor nach 48 Stunden in Kultur

A: Die Rechtecke in der schematischen Darstellung der Wanderung geben die Ausschnitte wieder, die in B-D dargestellt sind. A1: Kontrolle nach 48 Stunden in Kultur. B2, C2, D2: Vergrößerungen der Bilder von B, C, D. B1, B3, C1, C3, D1, D3: Durchlichtaufnahmen der Bilder B, B2 und C, C2 und D, D2. Balken: 100 μ m in A1/A2; B/B1; C/C1; D/D1; 50 μ m in B2/B3; C2/C3; D2/D3

Eine Möglichkeit für das Fehlverhalten der mit den Unc5H3/ Δ DD/ Δ IC+EGFPm Fusionsproteinen elektroporierten Zellen ist der apoptotische Zelltod, da der Unc5H3 Rezeptor zu den „dependence receptor“ gezählt wird. Daher wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Bedeutung der verschiedenen Komponenten (Puffer, Farbstoff) der Elektroporation und die Elektroporation selbst für die Apoptoserate untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte Anzahl von Apoptosen im Stammhirn von YT- P_{hPax6} -tTA transgenen Embryonen, die zuvor mit einem der drei Unc5H3-Fusionsproteine elektroporiert wurden (Fig. 27D) im Gegensatz zu den Kontrollen (Fig. 27A-C). Zwischen diesen drei Gruppen konnte kein Unterschied in der Anzahl der Apoptosen festgestellt werden.

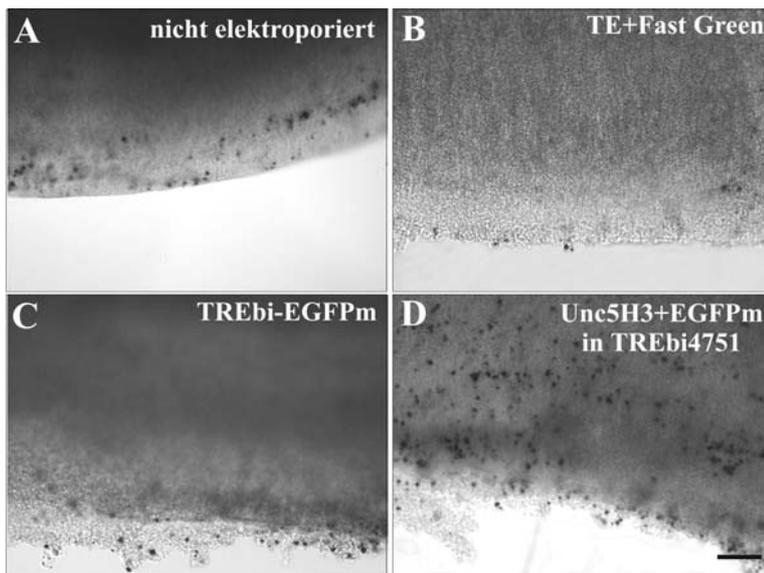


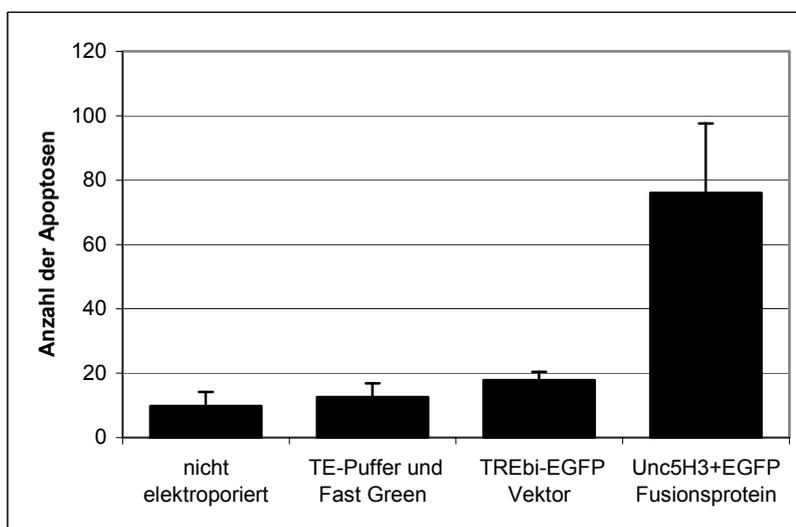
Fig. 27: Apoptosefärbung der rhombischen Lippe nach Elektroporation mit dem Unc5H3+EGFPm-Fusionsprotein im TREbi4751 Vektor

A: Apoptosefärbung einer nicht elektroporierten rhombischen Lippe. B Apoptosefärbung einer mit TE-Puffer und Fast Green elektroporierten rhombischen Lippe. C: Apoptosefärbung einer mit dem Kontrollvektor TREbi-EGFPm in TE-Puffer, versetzt mit Fast Green elektroporierten rhombischen Lippe. D: Apoptosefärbung einer rhombischen Lippe die zuvor mit

dem Unc5H3+EGFPm Fusionsprotein im TREbi4751 Vektor elektroporiert wurde. Dieser Vektor war, genau wie der Kontrollvektor in TE-Puffer gelöst und mit Fast Green versetzt. Balken: 100µm

Da während der Entwicklung des Gehirns der apoptotische Zelltod entscheidend für die richtige Ausbildung des Gehirns ist und somit apoptotische Zellgebiete den normalen Zustand des sich entwickelnden Gehirn widerspiegeln, wurden die Versuche mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 1 dargestellt.

Zur Auszählung der Apoptosen wurde ein definiertes Fenster in jede Abbildung gelegt und nur die Apoptosen in diesem Bereich ausgezählt. Die Ergebnisse der Auswertung bestätigen die erhöhte Apoptoserate nach der Elektroporation mit dem Unc5H3-Fusionsprotein gegenüber allen drei Kontrollexperimenten. Die Rohdaten dieser Versuchsreihe sind im Abschnitt 7.3 des Anhangs aufgelistet.



Tab.1: Anzahl der Apoptosen in den vier ausgewerteten Gruppen

Es wurden die gleichen vier Gruppen ausgewertet, die auch in Fig. 27 dargestellt sind. Die Gruppen der nicht elektroporierten, elektroporiert mit TE-Puffer und Fast Green (TE+FG) und mit dem Kontrollvektor TREbi-EGFPm elektroporierten rhombischen Lippen zeigen im Mittel eine geringe Anzahl von Apoptosen im definierten Bereich. Die

rhombischen Lippen, die mit dem Unc5H3-EGFP Fusionsprotein elektroporiert wurden, zeigen dagegen eine hohe Anzahl von Apoptosen.

Durch die Verwendung des Fusionsproteins ist es gelungen die drei Unc5H3 Varianten jeweils mit dem EGFPm in den wandernden Zellen des pes zu exprimieren. Zwischen den Ergebnissen der drei Unc5H3 Rezeptorvarianten, Unc5H3, Δ DD, Δ IC, zeigten sich in keinem der Darstellungen und Versuche Unterschiede. Bei allen drei Rezeptorversionen beginnen die Zellen ihre Wanderung nicht. Aus der Literatur ist die abstoßende Wirkung des Unc5H3 Rezeptors bereits bekannt (Przyborski et al., 1998). Daher ist es möglich, daß die Unc5H3 überexprimierenden Zellen ihre Wanderung auf Grund dieser abstoßenden Wirkung nicht beginnen. Andererseits gehen die Unc5H3 überexprimierenden Zellen nach kurzer Zeit in den apoptotischen Zelltod. Dies läßt sich durch die apoptotische Wirkung von Unc5H3 in Abwesenheit des Netrin-1 erklären (Llambi et al., 2001; Williams et al., 2003). Diese beiden Aussagen scheinen sich zu widersprechen. Einerseits verhindert Netrin-1 die Wanderung der Unc5H3 überexprimierenden Zellen, andererseits induziert der Rezeptor durch das fehlende Netrin-1 Apoptose. Eine Möglichkeit diesen Widerspruch zu erklären, liegt in der Überexpression des Rezeptors per se: In einer nicht elektroporierten Zelle wird der Unc5H3 Rezeptor erst viel später während der Wanderung und vermutlich in einer geringeren Konzentration exprimiert. Dies geschieht zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellen einer hohen Netrin-1 Quelle ausgesetzt sind. Es könnte möglich sein, daß die vorhandene Netrin-1 Konzentration an der rhombischen Lippe nicht ausreicht die Unc5H3 Rezeptor induzierte Signalkaskade in der Zelle zu aktivieren. Dies würde einem völligen Fehlen des Netrin-1 gleichkommen. Somit würde die Zelle die Richtungsinformation des DCC Rezeptors verwenden um zur Netrin-1 Quelle zu wandern. Bei einer gleichzeitigen Überexpression des Unc5H3 Rezeptors würde die Zelle Apoptose induzieren.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das veränderte Wanderungsverhalten der elektroporierten Zellen, liegt in der Verwendung des Fusionsproteins. Durch die Fusionierung der DNA des Unc5H3 Rezeptors und EGFP wird ein Protein translatiert, das sowohl den Unc5H3 Rezeptor als auch das EGFP beinhaltet. Durch diese Fusionierung der beiden Proteine kann es zu einer Veränderung in der Aktivität der Proteine kommen. Wäre das hier der Fall, könnten die erhaltenen Ergebnisse nicht auf der Aktivität des Unc5H3 Rezeptors beruhen.

3.6 Vergleichende Expressionsstudie von Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und Unc5H1-4

Die Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und Unc5H1-4 sind für die embryonale Hirnentwicklung der Maus nur partiell dokumentiert (Gad et al., 1997; Keeling et al., 1997; Leonardo et al., 1997; Livesey & Hunt, 1997; Przyborski et al., 1998). Das Expressionsmuster von Unc5H4 ist für das Gehirn bis heute ausschließlich für das Stadium P5 beschrieben (Zhong et al., 2004). Da Netrin-1 nachweislich in vielen Hirngebieten anziehend auf tangential wandernde Zellen wirkt, ist davon auszugehen, daß auch seine Rezeptoren entscheidend für diese Wanderungen sind. Daher wurden die Expressionsmuster von Netrin-1, DCC, Neogenin und Unc5H1-4 in einer vergleichenden Studie auf räumliche und zeitliche Unterschiede untersucht. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung können Schlüsse über mögliche Funktionen von Netrin-1 und seinen Rezeptoren gezogen werden, die hilfreich für weitere Untersuchungen dieser Wanderungen sind. Ist ein Rezeptor z.B. im Zielgebiet einer tangentialen Wanderung exprimiert, kann seine Funktion für diese Wanderung anschließend durch eine Überexpressionsstudie an YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Mäusen näher beleuchtet werden.

Zur vergleichenden Untersuchung der Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und Unc5H1-4 im Gehirn der Maus wurden *in situ* Hybridisierungen der embryonalen Stadien E10,5, E12,5, E14,5 und E16,5 sowie des postnatalen Stadiums P5 und dem adulten Stadium mit RNA Sonden gegen Netrin-1 und seinen Rezeptoren durchgeführt. Alle verwendeten Embryonen, postnatale und adulten Gehirne stammen von Wildtyp-Mäusen.

Expressionsmuster des embryonalen Stadiums E10,5

Der Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren im embryonalen Stadium E10,5 zeigt im Mesencephalon und Rhombencephalon große Unterschiede. Während in *Drosophila* Netrin-1 von Gliazellen und Neuronen der Mittellinie exprimiert wird (Keleman & Dickson, 2001), ist Netrin-1 in der Maus im tegmentalen, isthmalen und pontinen Neuroepithel exprimiert (Fig. 28A1, B1), in der sich ebenfalls neuronale sowie gliale Vorläuferzellen befinden. Im Gegensatz zu Netrin-1 sind seine Rezeptoren grundsätzlich und ausschließlich in der Mantelschicht einer Region exprimiert, die aus Neuroblasten aufgebaut ist. Beispielsweise ist DCC grundsätzlich in den gleichen Hirnregionen wie Netrin-1 exprimiert, dort aber nur in der

Mantelschicht. Die beiden mRNAs sind also komplementär zueinander exprimiert. Zusätzlich ist der DCC Rezeptor im Praetectum und Cerebellum exprimiert (Fig 28A2, B2). Die Expression von Neogenin und Unc5H2 ist in den gleichen Hirnregionen wie Netrin-1 vorhanden (Fig. 28A3, B3, A5), jedoch ausschließlich in der Mantelschicht und nicht im Neuroepithel. Somit überlappen diese Expressionsmuster teilweise mit dem von DCC. Unc5H3 zeigt nur eine schwache Expression in der Mantelschicht des Cerebellums (Fig. 28A6). Unc5H1 und Unc5H4 sind zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung weder im Mesencephalon noch im Rhombencephalon der Maus exprimiert (Fig. 28A4, A7).

Weiter rostral im Gehirn der Maus ist Netrin-1 im anterioren und ventralen hypothalamischen sowie im amygdaloiden Neuroepithel exprimiert. Außerdem findet sich eine Expression im optischen Vesikel (Fig. 28A1). Dagegen ist DCC nur in der Mantelschicht des anterioren und ventralen Hypothalamus exprimiert (Fig. 28B2). Eine Expression von Neogenin findet sich in der Mantelschicht des Neocortex, Cingulum und, ähnlich wie Netrin-1, im optischen Vesikel und im Auge (Fig. 28B3). Die Rezeptoren Unc5H1-3 zeigen in diesen Bereichen keine oder nur eine schwache Expression. So ist Unc5H1 nur schwach in der Mantelschicht der Medulla sowie des anterioren und ventralen Hypothalamus exprimiert. Außerdem ist eine schwache Expression im optischen Vesikel zu beobachten (Fig. 28B4). Unc5H2 dagegen ist ausschließlich in optischen Vesikel (Fig. 28B5), Unc5H3 nur in der Medulla und Unc5H4 ist auch in diesen Bereichen noch nicht exprimiert (Fig. 28B6, 7). Somit zeigen sich zwischen Netrin-1 und seinen Rezeptoren teilweise Expressionen in gleichen Hirnregionen. Netrin-1 ist dabei stets im Neuroepithel und seine Rezeptoren in der Mantelschicht des Gebietes exprimiert. Netrin-1 und DCC zeigen meist eine komplementäre Expression. Unc5H1 und Unc5H3 sind insgesamt nur sehr schwach und Unc5H4 ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiert.

Da Netrin-1 stets im Neuroepithel und seine Rezeptoren in der Mantelschicht exprimiert werden, wird dies in der Beschreibung der folgenden Expressionsmuster nicht mehr ausdrücklich erwähnt. Weicht das Expressionsmuster von dieser Schichtung ab, wird dies expliziert erwähnt werden.

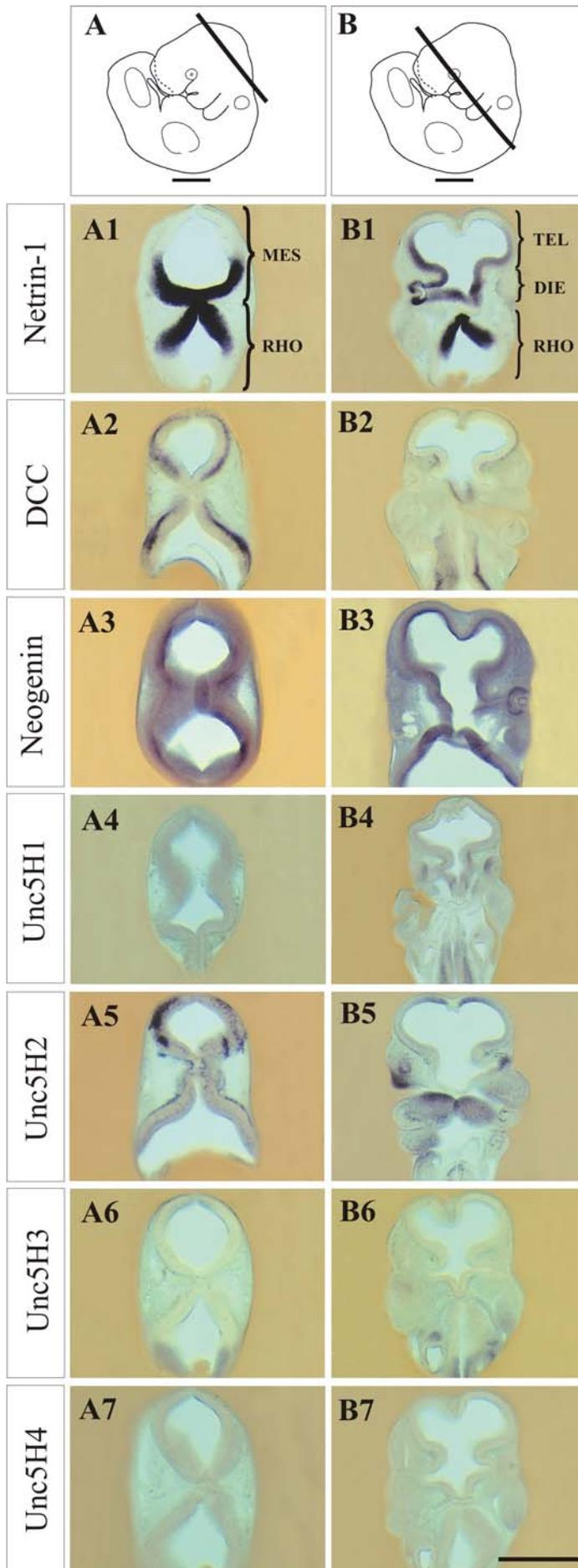


Fig. 28: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 und seine Rezeptoren an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus des Stadiums E10,5

Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E10,5 (A, B) geben die Schnittebenen der Vibratomschnitte an.

Schnittdicke: 150µm

Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von A1-7 bzw. B1-7 wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Balken 1mm in A, A1-7, B; 800µm in B1-7

DIE: Diencephalon

MES: Mesencephalon

RHO: Rhombencephalon

TEL: Telencephalon

Expressionsmuster des embryonalen Stadiums E12,5

Der Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren im embryonalen Stadium E12,5 zeigt in weiten Bereichen des Gehirns große Unterschiede. So ist Netrin-1 im Rhombencephalon ausschließlich in der Medulla exprimiert. Im Mesencephalon findet sich keine Expression (Fig. 29A1). DCC dagegen ist im Rhombencephalon in der Medulla (ohne Abb.) und im Cerebellum exprimiert. Außerdem ist eine starke Expression dieses Rezeptors in der *Formatio reticularis* und im anterioren Pons zu beobachten (Fig. 29A2). Der Neogenin Rezeptor ist in diesen Regionen ausschließlich in der Medulla (ohne Abb.), die Unc5H1-3 Rezeptoren dagegen sind insgesamt nur sehr schwach exprimiert. So zeigt sich eine Expression von Unc5H1 in der Medulla (ohne Abb.) und des Cerebellums (Fig. 29A4). Das Expressionsmuster von Unc5H2 entspricht in der Medulla dem des Unc5H1 (ohne Abb.). Zusätzlich ist Unc5H2 in der *Formatio reticularis* streifenartig exprimiert (Fig. 29A5). Eine Expression des Unc5H3 Rezeptors findet sich im Rhombencephalon im Pons (Fig. 29A6), des Unc5H4 Rezeptors dagegen im Nucleus gracilis sowie im Nucleus reticularis lateralis (Fig. 29A7).

In weiter rostral gelegenen Bereichen des Gehirns ist Netrin-1 im striatalen, pallidalen und präoptischen Neuroepithel sowie im anterioren Hypothalamus und im Nervus opticus exprimiert (Fig. 29B1). DCC dagegen ist in der intermediären Zone des Cortex, im Epithalamus, ventralen Thalamus und Hypothalamus exprimiert (Fig. 29B2). Der Neogenin- und auch der Unc5H4 Rezeptor sind ausschließlich in der subventrikulären Zone des Pallidums exprimiert (Fig. 29B3, 7). Eine Expression des Unc5H1 Rezeptors ist im Bereich der späteren hippocampalen Formation, dem Hypothalamus und dem ventralen Thalamus zu beobachten (Fig. 29B4). Der Unc5H2 Rezeptor ist ebenfalls im Bereich der späteren hippocampalen Formation exprimiert, daneben findet sich aber auch eine Expression im Epithalamus (Fig. 29B5). Der Unc5H3 Rezeptor scheint in diesem Bereich des Gehirns zu diesem Stadium nicht exprimiert zu werden (Fig. 29B6). Somit ist in den caudalen Hirnbereichen eine ähnliche Expression wie in E10,5 zu beobachten. Zusätzlich zeigt der Unc5H4 Rezeptor in E12,5 erstmals eine Expression.

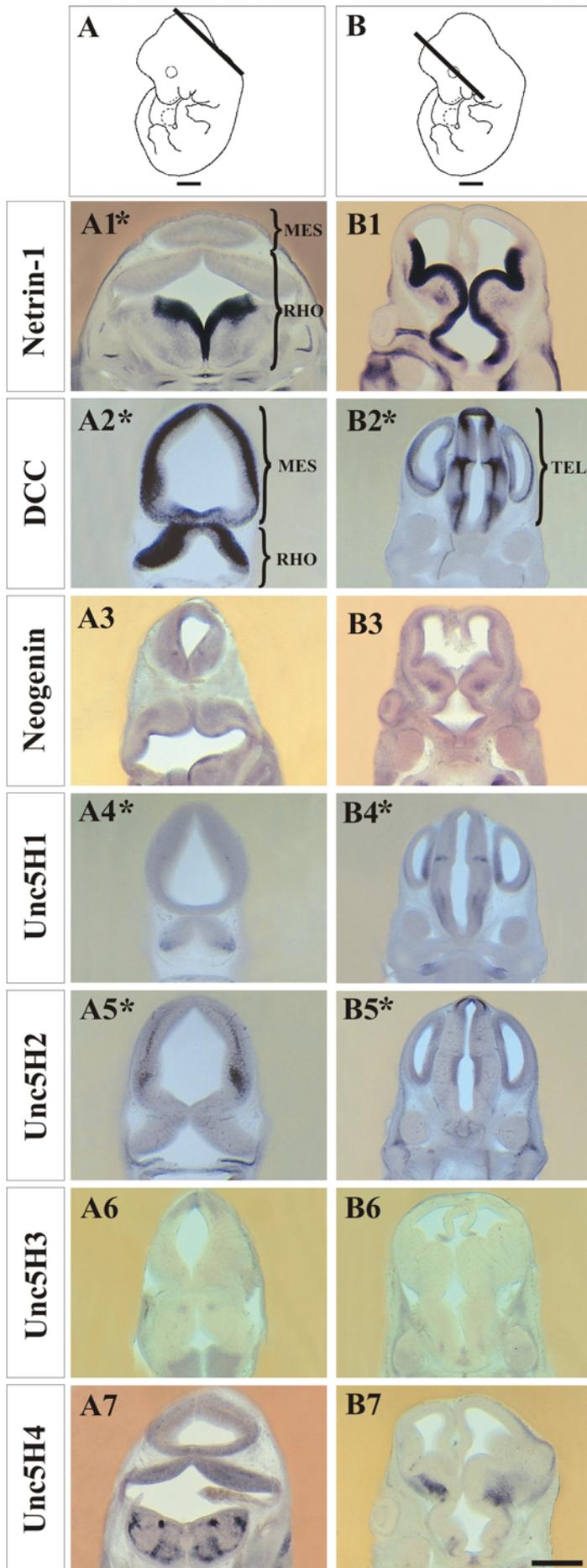


Fig. 29: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 und seine Rezeptoren an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus des Stadiums E12,5

Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E12,5 (A, B) geben die Schnittebenen der Vibratomschnitte an.

Schnittdicke: 150µm

Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von A1-7 bzw. B1-7 wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Die mit einem * gekennzeichneten Bilder stammen aus der Sammlung von D. Engelkamp.

Balken: 1mm in A, B; 500µm in A1-7, 400µm in B1-7

MES: Mesencephalon

RHO: Rhombencephalon

TEL: Telencephalon

Expressionsmuster des embryonalen Stadiums E14,5

Im embryonalen Stadium E14,5 zeigen sich in caudalen Bereichen des Gehirn ebenfalls große Unterschiede in den Expressionsmustern von Netrin-1 und seinen Rezeptoren. So ist Netrin-1 im Rhombencephalon weiterhin ausschließlich in der Medulla, im Mesencephalon dagegen nur an der Grenze zwischen Tectum und Tegmentum des Colliculus superior exprimiert (Fig. 30A1). DCC dagegen zeigt eine starke Expression in den tangential wandernden Zellen des Rhombencephalons (Pfeil) sowie im Cerebellum. Im Mesencephalon ist eine starke Expression im Colliculus superior zu beobachten. Dieses Expressionsmuster beschränkt sich aber nicht, wie bei Netrin-1, auf die Grenze zwischen Tectum und Tegmentum, sondern durchzieht die ganze Mantelschicht (Fig. 30A2). Neogenin ist im Gegensatz zu Netrin-1 auch im Cerebellum vorhanden und gleichzeitig ist eine Expression in der Medulla zu erkennen, in der auch Netrin-1 exprimiert wird. Zusätzlich ist Neogenin in einem Nucleus direkt neben dem Nucleus reticularis lateralis exprimiert, bei dem es sich um den Nucleus facialis handeln könnte (Fig. 30A3). Im Rhombencephalon ist Unc5H1 diffus im gesamten Hinterhirn, im Cerebellum sowie im Colliculus superior exprimiert. (Fig. 30A4). Der Unc5H2 Rezeptor ist im Colliculus superior nachweisbar, nicht aber im Cerebellum (Fig. 30A5). Das Expressionsmuster von Unc5H3 ähnelt am meisten dem Expressionmuster von Unc5H1. Im Rhombencephalon ist der Rezeptor in weiten Teilen des Hinterhirns und des Cerebellums vorhanden, im Mesencephalon dagegen findet sich keine Expression (Fig. 30A6). Der Unc5H4 Rezeptor ist im Rhombencephalon im Nucleus gracilis (Pfeil) sowie im Cerebellum nachweisbar (Fig. 30A7). Im Colliculus superior ist Unc5H4 sehr diffus exprimiert (Fig. 30A7). Netrin-1 und seine Rezeptoren sind damit alle während der tangentialen Wanderungen im Rhombencephalon vorhanden und können daher Einfluß auf den pes und aes nehmen. Netrin-1 ist jedoch im Gegensatz zu einigen seiner Rezeptoren nicht im Cerebellum zu finden, daher ist ein Einfluß von Netrin-1 auf die Wanderung der späteren Körnerzellen unwahrscheinlich. Für diesen Wanderungsstrom konnte auch bereits eine Netrin-1 unabhängige Wanderung nachgewiesen werden (Alcantara et al., 2000).

Weiter rostral im Gehirn ist Netrin-1 im Neuroepithel des Telencephalons nachweisbar, nicht aber in lateralen Bereichen des Telencephalons wie z.B. DCC, Neogenin, Unc5H1 und Unc5H4 (Fig. 30B1, 2, 3, 4, 7). Somit ist Netrin-1 komplementär zu diesen Rezeptoren exprimiert und sie könnten entscheidend für tangentiale Wanderungen im Cortex sein. Weiterhin findet sich eine Netrin-1 Expression nur in nicht neuronalem

Gewebe (Fig. 30B1). DCC, Neogenin, Unc5H1 und Unc5H3 dagegen sind auch im Auge vorhanden (Fig. 30B2, 3, 4, 6, Pfeile). Die Expressionsmuster von Neogenin und Unc5H2 sind in allen Bereichen nur sehr schwach ausgeprägt (Fig. 30B3). Unc5H1 und Unc5H4 sind zusätzlich noch im Thalamus nachweisbar (Fig. 30B4, 7).

Da die Netrin-1 Rezeptoren häufig weit entfernt von Netrin-1 in verschiedenen Gebieten, z.B. im Cerebellum, exprimiert sind, ist eine Netrin-1 unabhängige Funktion der Rezeptoren möglich. Es ist daher wahrscheinlich, daß es einen weiteren Liganden für diesen Rezeptor gibt. Netrin-3, als Netrin-1 Homolog kommt für diese Aufgabe auf Grund seiner geringen Expression im gesamten Gehirn nicht in Frage.

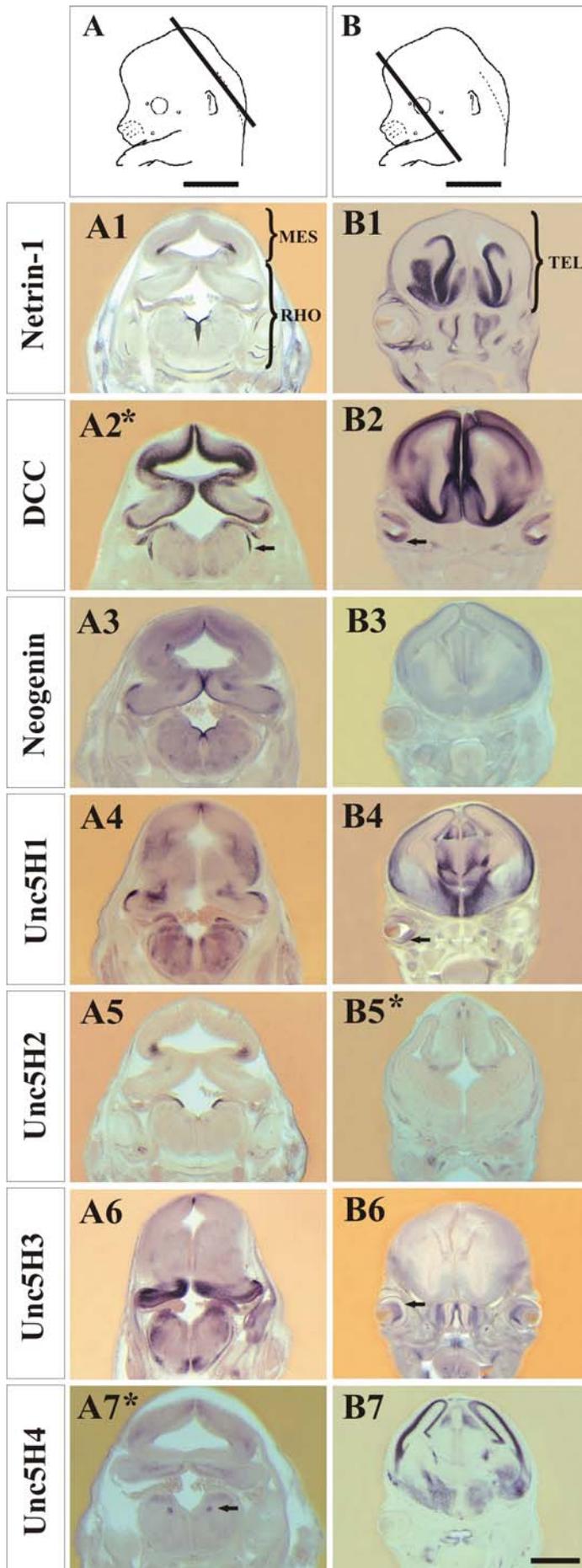


Fig. 30: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 und seine Rezeptoren an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus des Stadiums E14,5

Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E14,5 (A, B) geben die Schnittebenen der Vibratomschnitte an. Schnittdicke: 150µm

Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von A1-7 bzw. B1-7 wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Die mit einem * gekennzeichneten Bilder stammen aus der Sammlung von D. Engelkamp.

Balken: 2mm in A, B; 1mm in A1-7, 800µm in B1-7

MES: Mesencephalon

RHO: Rhombencephalon

TEL: Telencephalon

Expressionsmuster des embryonalen Stadiums E16,5

Im embryonalen Stadium E16,5 zeigen sich in caudalen Bereichen des Gehirn ebenfalls große Unterschiede in den Expressionsmustern von Netrin-1 und seinen Rezeptoren. So ist Netrin-1 im Rhombencephalon nur in der Medulla, im Mesencephalon dagegen nur im inferioren Tectum exprimiert (Fig. 31A1). DCC ist im Rhombencephalon nicht nur in der Medulla exprimiert, sondern auch in der Oliva inferior sowie im lateralen Cerebellum (Fig. 31A2). Neogenin ist in der Oliva inferior sehr schwach exprimiert. In allen anderen Nuclei des Rhombencephalons und Mesencephalons dieses Entwicklungsstadiums ist Neogenin nicht exprimiert (Fig. 31A3). Die Rezeptoren Unc5H1-4 sind im Rhombencephalon alle in der Oliva superior exprimiert (Pfeile, Fig. 31A4-7). Unc5H2 und Unc5H3 sind daneben auch im Nucleus reticularis lateralis exprimiert und zusätzlich ist Unc5H1 im späteren Nucleus hypoglossus sowie diffus im gesamten Hinterhirn exprimiert (Fig. 31A4). Außerdem ist Unc5H1 im lateralen Cerebellum sowie in den tiefen Schichten des Colliculus superior exprimiert (Fig. 31A4). Unc5H2 dagegen zeigt eine Expression in der Medulla und eine punktierte Expression im Cerebellum (Fig. 31A5). Das Expressionsmuster von Unc5H3 zeigt eine starke Färbung in der rhombischen Lippe sowie im Cerebellum. Im Mesencephalon ist Unc5H3 nicht exprimiert (Fig. 31A6). Unc5H4 zeigt zusätzlich eine Expression im Cerebellum sowie im superioren und inferioren Tectum (Fig. 31A7). Durch die Expression von Netrin-1, DCC und Unc5H1-4 im Rhombencephalon (Fig. 31A1-7) ist auch in diesem Stadium ein Einfluß für den pes und aes durchaus wahrscheinlich. Durch die Expression von DCC, Unc5H1, 3 und 4 im Cerebellum (Fig. 31A2, 4, 6, 7) ist ein Einfluß dieser Rezeptoren für die Wanderung der späteren Körnerzellen möglich. Netrin-1 ist in dieser Region jedoch nicht exprimiert, daher könnten die Rezeptoren in dieser Region über einen noch unbekanntem Liganden aktiviert werden.

Weiter rostral im Gehirn des embryonalen Stadiums 16,5 ist Netrin-1 im Hypothalamus und nur schwach im Thalamus exprimiert (Fig. 31B1). DCC dagegen ist neben dem Hypothalamus auch im späteren Hippocampus und im Epithalamus exprimiert (Fig. 31B2). Der Neogenin Rezeptor ist ebenfalls im Hippocampus und im Hypothalamus exprimiert, zusätzlich findet sich aber auch eine Färbung im Tractus olfactorius lateralis (Pfeil, Fig. 31B3), ähnlich dem Expressionsmuster von Unc5H4 (Fig. 31B7). Der Unc5H1 Rezeptor dagegen ist in der intermediären und molekularen Schicht des Cortex, im intermediären Thalamus sowie in der präoptischen Region exprimiert (Pfeil, Fig. 31B4). Im Cortex ist der Unc5H2 Rezeptor in gleichen Regionen exprimiert wie der

Unc5H1 Rezeptor, daneben aber auch im Epithalamus (Pfeil, Fig. 31B5). Der Unc5H3 Rezeptor ist im Cortex nur in der intermediären Zone exprimiert, zusätzlich aber auch im Epithalamus (Fig. 31B6). Im Gegensatz zu den restlichen Unc5 Rezeptoren ist Unc5H4 im Neuroepithel des Cortex exprimiert und darüber hinaus im Hypothalamus, Thalamus und im Tractus olfactorius lateralis (Pfeil, Fig. 31B7). Bei diesen Expressionsmustern fällt besonders die Expression von DCC, Unc5H1, 2 und 3 im Hippocampus auf (Fig. 31B2, 4, 5, 6). Da dieser Bereich während der embryonalen Entwicklung erst ab E16,5 in der Maus gebildet wird (Kaufman & Bard, 1999), können diese Rezeptoren entscheidend an der Entwicklung dieser Formation beteiligt sein. Weiterhin ist die Expression von DCC, Unc5H1 und 4 im Bereich des Tractus olfactorius lateralis auffällig (Fig. 31B2, 4, 7), die in anderen Stadien nicht zu beobachten ist. Da Netrin-1 weder im Bereich des Hippocampus noch im Tractus olfactorius lateralis exprimiert wird und somit die nächste Netrin-1 Quelle weit entfernt von den Rezeptoren zu finden ist, kann Netrin-1 in diesen Gebieten nicht für die Aktivierung dieser Rezeptoren verantwortlich sein. Die Rezeptoren dieser Regionen scheinen daher von einem noch unbekanntem Liganden aktiviert zu werden.

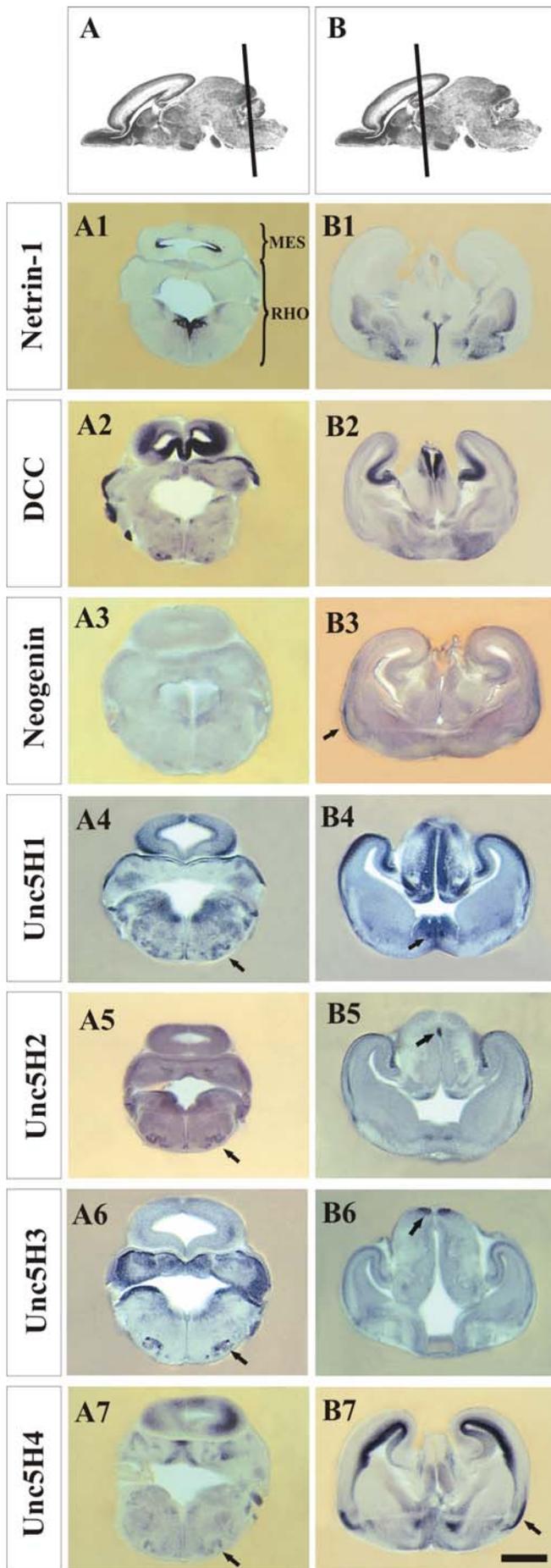


Fig. 31: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 und seine Rezeptoren an coronalen Vibratomschnitten der Wildtyp-Maus des Stadiums E16,5

Die Linien in den schematischen Zeichnungen der embryonalen Maus des Stadiums E16,5 geben die Schnittebenen der Vibratomschnitte an.

Schnittdicke: 150µm

Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von A1-7 bzw. B1-7 wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Balken: 1mm in A1-7; 800µm in B1-7

MES: Mesencephalon

RHO: Rhombencephalon

Expressionsmuster des postnatalen Stadiums P5

Im postnatalen Gehirn sind Netrin-1 und seine Rezeptoren nur noch in sehr spezifischen Bereichen des Gehirns exprimiert. Dabei wurden die prominentesten Bereiche ausgewählt: Der Cortex mit angrenzendem Hippocampus (Fig. 32A1-7), das Cerebellum (Fig. 32B1-7), der Hirnstamm (Fig. 32C1-7) und der Bulbus olfactorius (Fig. 32D1-7). Netrin-1 ist im postnatalen Bereich des Cortex gar nicht und im Hippocampus nur sehr schwach exprimiert. Eine genaue Zuordnung des Expressionsmusters im Hippocampus ist aber durch diese Abbildung nicht möglich. Daneben zeigt sich eine starke Expression von Netrin-1 in der Fimbria und im posterioren Thalamus (Pfeil, Fig. 32A1). Die Netrin-1 Rezeptoren sind dagegen alle, in unterschiedlicher Stärke, im Hippocampus vorhanden. So ist DCC sowohl im Gyrus dentatus als auch in der CA1, 2, und 3 Region stark exprimiert. Daneben zeigt sich noch eine Expression in der Fimbria (Fig. 32A2). Neogenin ist im Hippocampus hauptsächlich in der CA3 Region nachweisbar, während die anderen Bereiche ein schwächeres Expressionsmuster zeigen. Außerdem ist Neogenin im supragranulären Bereich des Cortex vorhanden (Fig. 32A3). Damit ist Neogenin der einzige der Netrin-1 Rezeptoren der im Cortex stark exprimiert ist. Die Rezeptoren Unc5H1-4 sind alle im gesamten Hippocampus exprimiert. Die stärkste Expression dabei zeigt Unc5H1 in der CA3 Region (Fig.XA4). In allen anderen Bereichen des Hippocampus sind die Rezeptoren nur schwach nachweisbar (Fig. 32A4-7). Zusätzlich ist Unc5H1 in der Fimbria, im anterioren Thalamus und schwach in der lateralen subgranulären Schicht exprimiert (Fig. 32A4). Unc5H2 ist ebenfalls in der Fimbria und in der lateralen subgranulären Schicht des Cortex schwach exprimiert. Daneben zeigt sich aber auch eine schwache Expression in der lateralen infragranulären Schicht des Cortex (Fig. 32A5). Unc5H3 ist neben dem Hippocampus auch im Thalamus exprimiert (Fig. 32A6). Unc5H4 zeigt ein vergleichbares Expressionsmuster wie Neogenin, das aber bedeutend schwächer und nicht so diskret wie die Expression von Neogenin ist (Fig. 32A7). Zusätzlich ist der Unc5H4 Rezeptor sehr prominent in der Amygdala exprimiert (ohne Abb.). Im postnatalen Stadium P5 scheinen die untersuchten Rezeptoren dieser Studie auf Grund ihrer Expressionsmuster immer noch wichtig für die Entwicklung des Hippocampus zu sein, die erst postnatal ihre entgültige Struktur erreicht. Im Cortex sind nur wenige Netrin-1 Rezeptoren exprimiert, Netrin-1 selbst jedoch nicht. Daher scheint auch hier ein anderer Ligand entscheidend an der Aktivierung der Rezeptoren beteiligt zu sein.

In den Schichten des Cerebellums zeigt sich eine sehr unterschiedliche Expression von Netrin-1 und seinen Rezeptoren. Zur besseren Beurteilung des Expressionmusters in den einzelnen Schichten wurden entsprechende Bereiche mit einer höheren Vergrößerung aufgenommen (Fig. 33). Es ist aber auch hier schon zu erkennen, daß Netrin-1 und seine Rezeptoren alle im Cerebellum exprimiert sind (Fig. 32B1-7). Netrin-1 ist damit im postnatalen Cerebellum erstmals exprimiert. Das Expressionsmuster von Unc5H1-3 ist sehr schwach und in der höheren Vergrößerung ist eine Färbung kaum noch zu erkennen (Fig. 33).

Bei einer Vergrößerung, die einzelne Zellkörper erkennen läßt, wird deutlich, daß Netrin-1, DCC und auch Neogenin im Cerebellum im Stratum molekulare exprimiert sind (Fig. 33A-C). Daneben ist Netrin-1 in vereinzelt Zellen des Stratum granulosum (Fig. 33A), DCC in Zellen, die durch das Marklager zu ihrem Bestimmungsort wandern (Fig. 33B), und Neogenin nur schwach in der lateralen Hälfte des Stratum granulosum exprimiert. Die Unc5H1, 2 und 3 Rezeptoren sind alle sehr schwach im Stratum granulosum exprimiert (Fig. 33D-F). Der Unc5H1 Rezeptor ist innerhalb dieser Schicht nur in der medialen Hälfte, also in dem Bereich, in dem Neogenin nicht exprimiert ist, zu finden. Unc5H4 ist ausschließlich im Stratum purkinjense exprimiert und hebt sich damit von den restlichen Expressionsmustern deutlich ab (Fig. 33G). Da Netrin-1 und seine Rezeptoren alle im postnatalen Cerebellum der Maus, in unterschiedlichen Bereichen und Stärke, exprimiert sind, scheinen sie entscheidend für die postnatale Reifung des Cerebellums zu sein.

Im Bereich des Stammhirns sind Netrin-1 und seine Rezeptoren in diesem Entwicklungsstadium nur sehr vereinzelt exprimiert. So ist Netrin-1 im anterioren Pons sowie im Hypothalamus und im Nucleus mammillaris exprimiert (Pfeil, Fig. 32C1). DCC dagegen zeigt nur eine sehr schwache Expression im Hypothalamus und die Rezeptoren Neogenin, Unc5H1-3 keinerlei Expression im Hirnstamm (Fig. 32C2-6). Nur Unc5H4 zeigt eine starke Expression in der superioren und inferioren Oliven, der Medulla sowie im anterioren und posterioren Pons (Pfeil, Fig. 32C7). Somit findet sich im Hirnstamm meist eine Expression in den Zielgebieten der tangentialen Wanderungen der unteren rhombischen Lippe.

Im Bereich des Bulbus olfactorius sind Netrin-1 und seine Rezeptoren, außer Unc5H3, alle exprimiert. Netrin-1 ist insbesondere in der granulären Schicht, der subventrikulären Zone und im rostralen Wanderungsstrom exprimiert (Pfeil, Fig. 32D1). Zusätzlich zeigt sich eine Expression im Rhinencephalon, im Nucleus accumbens und in

der septalen subventrikulären Zone (Fig. 32D1). DCC dagegen ist nur in der subventrikulären Zone des Bulbus olfactorius, im Rhinencephalon und im anterioren Nucleus olfactorius exprimiert (Fig. 32D2). Neogenin zeigt ein vergleichbares Expressionsmuster wie DCC (Fig. 32D3). Unc5H1 ist neben der Mitralzellschicht auch im Rhinencephalon und im Stratum granulosum des Bulbus olfactorius accessorius (Fig. 32D4) und Unc5H2 in der internen und externen plexiformen Schicht sowie ebenfalls im Rhinencephalon exprimiert (Fig. 32D5). Unc5H4 zeigt eine Expression, wie Netrin-1, in den Zellen des rostralen Wanderungsstroms. Zusätzlich ist Unc5H4 in der Mitralzellschicht sowie im Rhinencephalon und im Stratum granulosum des Bulbus olfactorius accessorius exprimiert (Fig. 32D7). Auf Grund der hier vorliegenden komplementären Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren ist ein Einfluß auf den rostralen Wanderungsstrom, der ein lebenslang anhält, durchaus wahrscheinlich.

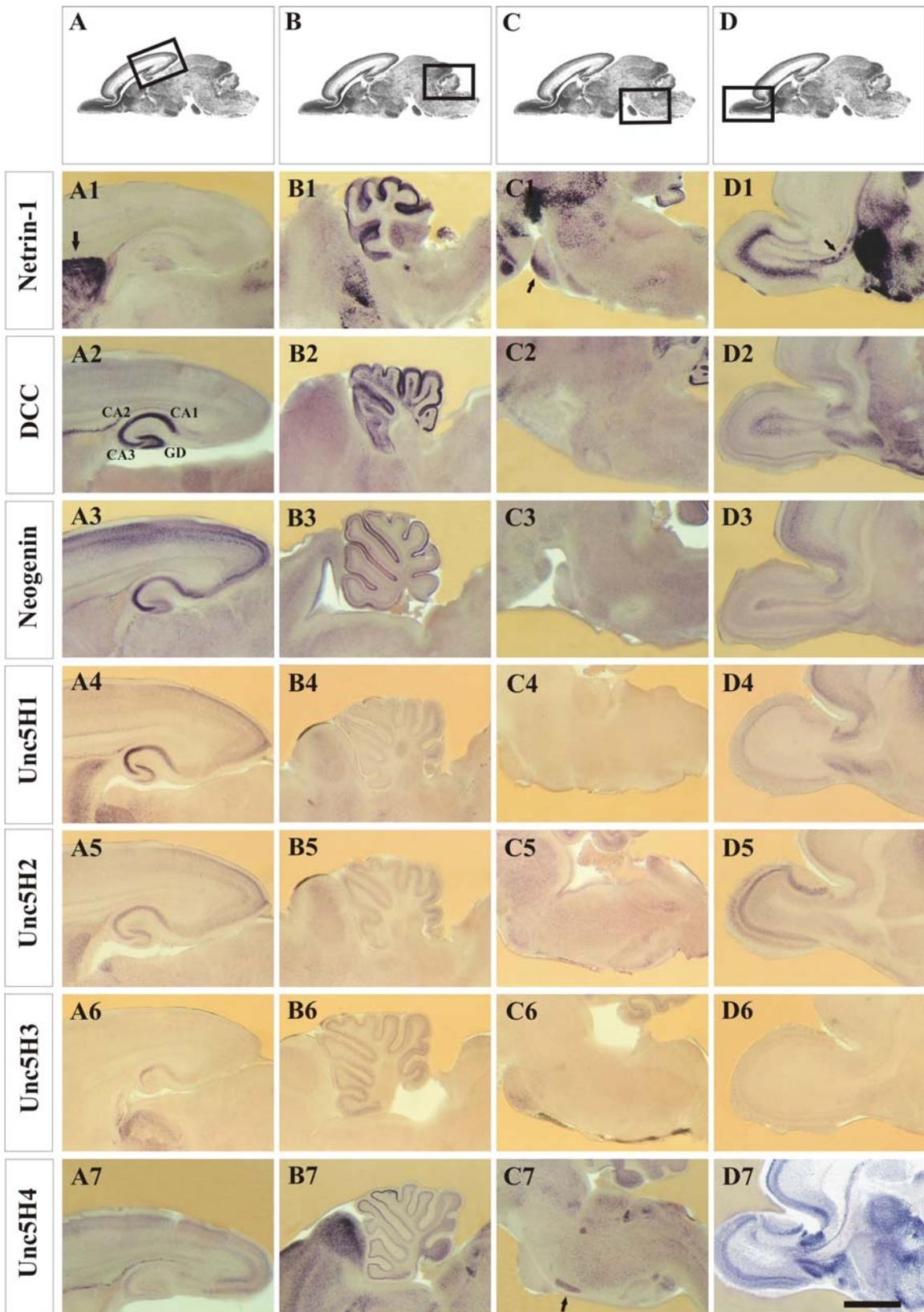


Fig. 32: Bildbeschreibung siehe folgende Seite

Fig. 32: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 und seine Rezeptoren an sagittalen Vibratonschnitten der Wildtyp-Maus des Stadiums P5

Die Linien in den schematischen Zeichnungen des embryonalen Gehirns des Stadiums P5 (A-D) (Paxinos G., 1994) geben die Schnittebenen der Vibratonschnitte an.

Schnittdicke: 150µm

Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Schnittebenen von A1-7, B1-7, C1-7 bzw. D1-7 wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Balken: 1mm

GD: Gyrus dentatus

CA1-3: CA1-3-Region des Hippocampus

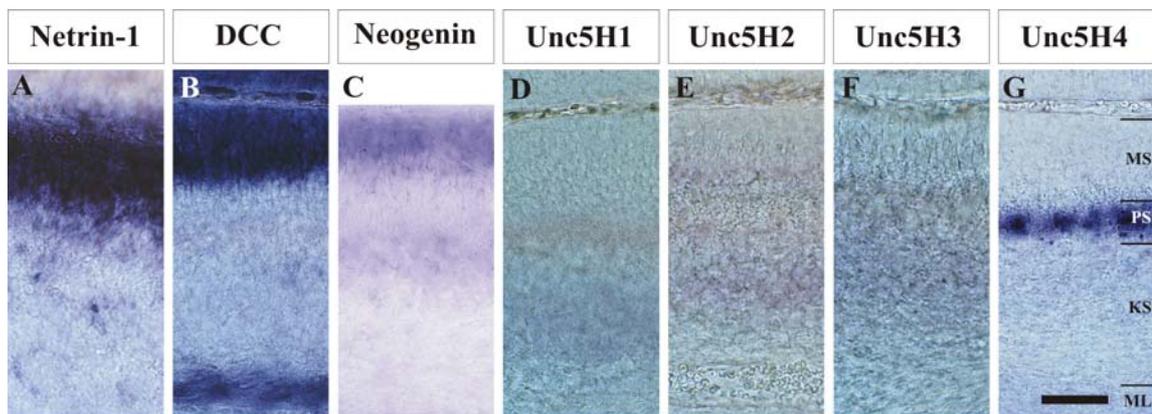


Fig. 33: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 und seine Rezeptoren an sagittalen Vibratonschnitten des Cerebellums der Wildtyp-Maus des Stadiums P5

Schnittdicke: 150µm

Beschreibung der Expressionsmuster im Text. Die Bilder zeigen höhere Vergrößerungen der Bilder B1-7 von Fig. 32

Balken: 50µm

MS: Stratum moleculare

PS: Stratum purkinjense

KS: Stratum granulosum

ML: Marklager

Expressionsmuster des adulten Stadiums

Im adulten Gehirn sind Netrin-1 und seine Rezeptoren nur noch in sehr spezifischen Bereichen des Gehirns exprimiert. In den Übersichtsaufnahmen der sagittalen Schnitte sind kaum Unterschiede zum frühen postnatalen Stadium zu erkennen (Fig. 34A1-7). Zur detaillierten Expressionsanalyse wurden die prominentesten Bereiche ausgewählt und vergrößert dargestellt: Der Cortex mit angrenzendem Hippocampus (Fig. 34B1-7), das Cerebellum (Fig. 34C1-7) und der Hirnstamm (Fig. 34D1-7). Netrin-1 ist im adulten Gehirn weder im Cortex noch im Hippocampus exprimiert (Fig. 34B1). Der DCC Rezeptor ist im Gyrus dentatus, der CA1-3 Region sowie in der Fimbria exprimiert (Fig. 34B2). Somit stimmt das Expressionsmuster von DCC im adulten Telencephalon mit dem des frühen postnatalen Telencephalon überein. Neogenin ist im adulten Gehirn im

Gyrus dentatus sowie in den CA1-3 Regionen exprimiert. Eine Expression im Cortex ist nicht mehr zu erkennen (Fig. 34B3). Im Expressionsmuster von Unc5H1 im Hippocampus zeigt sich im Gegensatz zur frühen postnatalen Expression eine Veränderung in der relativen Stärke der Färbung der Gebiete zueinander. So ist im adulten Gehirn die stärkste Expression im Gyrus dentatus und nicht mehr in der CA3-Region zu beobachten. Daneben ist der Rezeptor weiterhin in den CA1-3 Regionen exprimiert und zusätzlich noch im lateralen supragranulären Teil des Cortex (Fig. 34B4). Das Expressionsmuster von Unc5H2 im adulten Gehirn entspricht dem des frühen postnatalen Gehirns. So ist der Rezeptor weiterhin im Gyrus dentatus, der CA1-3 Region sowie im lateralen supragranulären und infragranulären Teil des Cortex exprimiert (Fig. 34B5). Der Unc5H3 Rezeptor ist im Hippocampus sowohl im Gyrus dentatus als auch in der CA1-3 Region exprimiert (Fig. 34B6) damit hat sich die Expression im Gegensatz zum frühen postnatalen Stadium in diesem Gebiet verstärkt. Das Expressionsmuster von Unc5H4 hat sich im adulten Stadium im Gyrus dentatus verstärkt und in den restlichen Bereichen des Hippocampus abgeschwächt (Fig. 34B7). Zusätzlich ist der Unc5H4 Rezeptor sehr prominent in der Amygdala exprimiert (ohne Abb.). Da sich die relative Expressionsstärke einiger Rezeptoren zueinander im Hippocampus im Vergleich zum frühen postnatalen Gehirn verändert hat, scheinen die Rezeptoren im adulten Hippocampus eine andere Aufgabe zu erfüllen als noch im embryonalen oder postnatalen Stadium. Da im Hippocampus zeitlebens neue Neurone gebildet werden und diese ins Stratum granulosum einwandern, könnte dies die lebenslange Expression dieser Rezeptoren erklären. Da Netrin-1 im Hippocampus nicht exprimiert ist, scheinen die exprimierten Rezeptoren auch hier von einem anderen noch unbekanntem Liganden aktiviert zu werden.

Im Cerebellum ist Netrin-1 in den gleichen Bereichen exprimiert ist, wie im frühen postnatalen Stadium (Fig. 34C1). DCC, Neogenin sowie Unc5H4 dagegen sind im adulten Cerebellum nicht mehr exprimiert (Fig. 34C2, 3, 7). Dagegen sind Unc5H1-3 im adulten Gehirn bedeutend stärker exprimiert als im frühen postnatalen Gehirn. So zeigt sich ein Expressionsmuster von Unc5H1-3 im Stratum granulosum des Cerebellums (Fig. 34C4-6). Da im adulten Cerebellum keine Zellwanderungen stattfinden, könnten die in diesem Bereich exprimierten Proteine auch entscheidend für andere Prozesse, z.B. die Reifung von synaptischer Plastizität sein.

Im Bereich des Hirnstamms sind Netrin-1 und seine Rezeptoren im adulten Gehirn nur noch sehr schwach und in wenigen Regionen exprimiert. Netrin-1 ist noch im

Hypothalamus (Pfeil, Fig. 34D1), Unc5H2 in der Oliva inferior sowie im Pons (Pfeil, Fig. 34D5) und Unc5H3 ausschließlich im Pons exprimiert (Fig. 34D6). Die Rezeptoren DCC, Neogenin, Unc5H1 und Unc5H4 zeigen in diesem Stadium keinerlei Expression mehr (Fig. 34D2, 3, 4, 7). Dieses schwache Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren im Hirnstamm läßt sich durch die beendeten Zellwanderungen erklären. Im adulten Gehirn finden im Hirnstamm keine Zellwanderungen mehr statt.

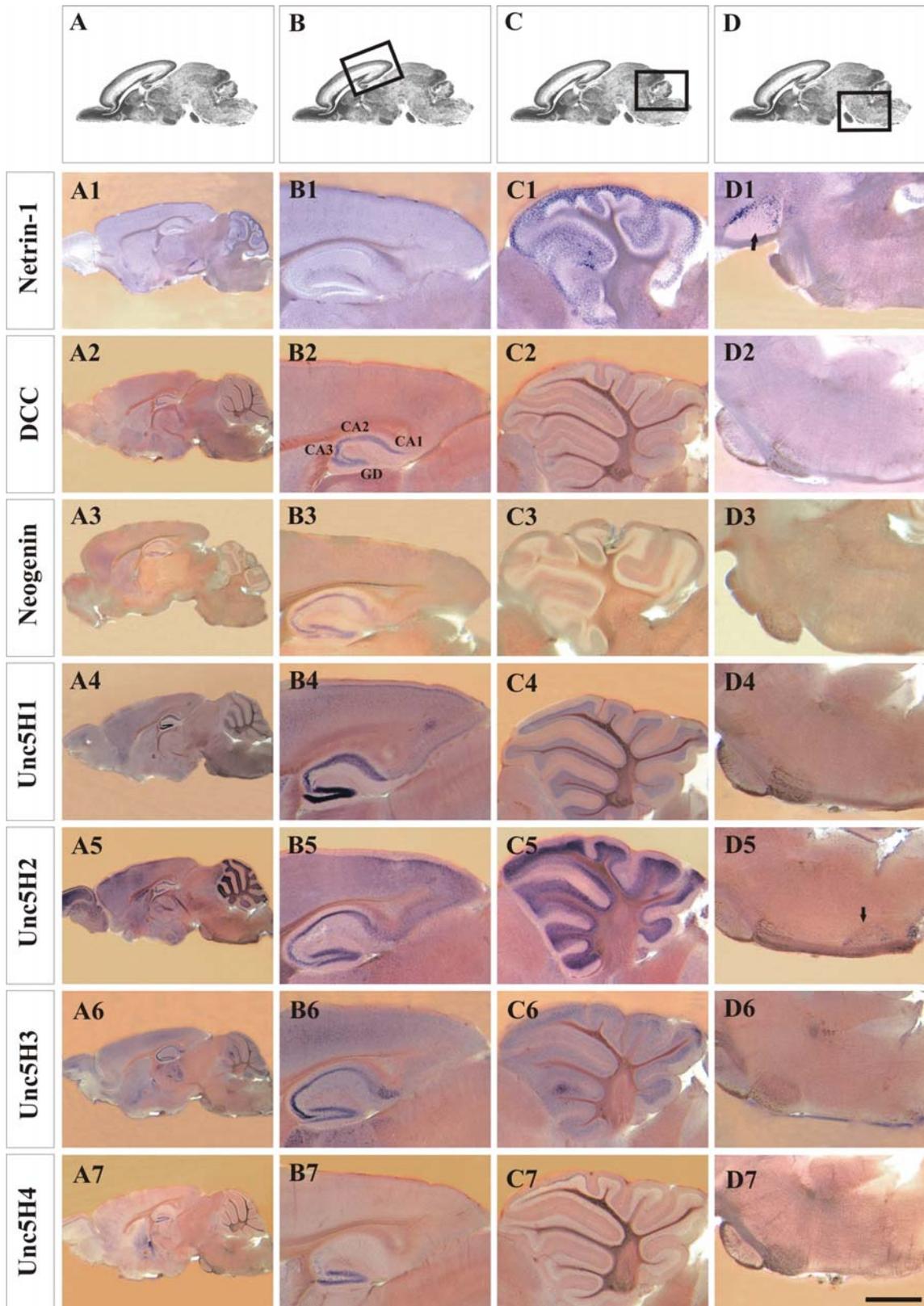


Fig. 34: *In situ* Hybridisierung gegen Netrin-1 und seine Rezeptoren an sagittalen Vibratomschnitten der adulten Wildtyp-Maus

Die Linien in den sagittalen Darstellungen des Gehirns der adulten Maus geben die Schnittebenen der Vibratomschnitte an (A-D). Schnittdicke: 150 μ m. Beschreibung der Expressionsmuster im Text.

Die Schnittebenen von A1-7, B1-7, C1-7 bzw. D1-7 wurden an vergleichbarer Position gewählt.

Balken: 1mm in B1-7, C1-7, D1-7; 3,125mm in A1-7

GD: Gyrus dentatus

CA1-3: CA1-3-Region des Hippocampus

Insgesamt bietet diese Studie erstmals einen direkten Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und Unc5H1-4. Die Expression von Neogenin ist zu jedem untersuchten Stadium nur in wenigen Kerngebieten zu erkennen, daher ist der Einfluß dieses Rezeptors für die tangentialen Wanderungen des embryonalen und postnatalen Gehirns vermutlich gering. Das Expressionsmuster von Unc5H4 dagegen ist besonders in den Stadien E12,5 - P5 in Zielkernen tangentialer Wanderungen prominent. In der frühen Entwicklung und im adulten Gehirn spielt Unc5H4 jedoch, abgesehen vom Hippocampus, keine Rolle. Auffällig ist die meist komplementäre Expression von Netrin-1 und DCC. Dies spricht für eine hohe Interaktion zwischen diesem Rezeptor und dem Netrin-1 Liganden. Die Rezeptoren Unc5H2 und Unc5H3 sind im Rhombencephalon sowohl im Nucleus cuneatus lateralis und Nucleus reticularis lateralis als auch im Pons und den Körnerzellen des Cerebellums exprimiert. In den Körnerzellen des Cerebellums ist zusätzlich auch das Unc5H1 exprimiert. Daher ist eine Funktion dieser Rezeptoren für den pes, aes und die Wanderung der Körnerzellen ins Cerebellum sehr wahrscheinlich. Zu näheren Untersuchungen der Bedeutung dieser Rezeptoren für die tangentialen Wanderungen des Gehirns bieten sich Überexpressionsstudien in der YT-P_{hPax6}-tTA-transgenen Mäuselinie an, wie dies bereits für den Unc5H3 Rezeptor im pes in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Dadurch kann ihre Funktion für die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons und Bulbus olfactorius untersucht werden. Interessant wäre auch eine vergleichende Studie über die Funktionsweise des embryonalen und adulten rostralen Wanderungsstroms in den Bulbus olfactorius, da bis heute nicht geklärt wurde, ob es Unterschiede zwischen embryonalen und adulten tangentialen Wanderungen gibt. Im Cerebellum z.B. sind die Netrin-1 Rezeptoren weit entfernt von Netrin-1 exprimiert. Es ist daher wahrscheinlich, daß es einen oder mehrere weitere Liganden für diese Rezeptoren gibt, die bis heute aber unbekannt sind. Netrin-3, als Homolog des Netrin-1, kommt auf Grund seiner geringen Expression im gesamten Gehirn (siehe Ergebnisse; Fig.5) für diese Funktion nicht in Frage.

4 Diskussion

Mit der YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Mäuselinie stand ein Werkzeug zur Verfügung, das die gezielte und hochspezifische Expression von beliebigen Transgenen in Pax6-exprimierenden Zellen ermöglicht (Dissertation, Benzing, 2002). Mit diesem Modell können daher nahezu alle tangentialen Wanderungen während der Entwicklung des Mausgehirns untersucht werden. In dieser Arbeit wurde die YT-P_{hPax6}-tTA transgene Mäuselinie ausschließlich zur Untersuchung des pes verwendet. Dazu wurde in die Pax6-positiven Zellen der rhombischen Lippe das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) eingebracht, so daß das Wanderungsverhalten *in vitro* über mehrere Tage dargestellt werden konnte. Zusätzlich wurden Transplantationsversuche durchgeführt, die Aufschluß über die Funktionsweise der einzelnen Wanderungsabschnitte gaben. Die ebenfalls durchgeführten Überexpressionsstudien lieferten Ergebnisse über die Funktion des Unc5H3 Rezeptors für den pes. Begonnen wurde mit einer vollständigen Charakterisierung der YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Mäuselinie.

4.1 Die YT-P_{hPax6}-tTA transgene Mäuselinie

Zur Analyse des Expressionsmusters der YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Mäuselinie wurden *in situ* Hybridisierungen gegen Pax6 und tTA an Embryonen verschiedener Stadien durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen in weiten Bereichen eine vollkommene Übereinstimmung der Expression. Ausschließlich im Rhombencephalon des Stadiums E14,5 und E16,5 zeigen sich Unterschiede der Pax6 und tTA Expression. Pax6 ist in diesem Gebiet in den tangential wandernden Zellen des pes sowie im medullären Neuroepithel exprimiert. tTA ist ebenfalls in den wandernden Zellen des pes, aber nicht im medullären Neuroepithel exprimiert, dafür aber in der Oliva inferior. Da beide RNAs in den wandernden Zellen des pes exprimiert sind, sollten sich daher bei der Untersuchung dieses Wanderungsstroms keine Probleme ergeben. Die Zellen des Olivenstroms exprimieren in der Wildtyp-Maus kein Pax6. In der YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Mäuselinie scheint das tTA jedoch in der Oliva inferior, nicht aber in den wandernden Zellen exprimiert zu sein. Daher ist es auch durch diese zusätzliche Expression des tTA nicht möglich, diese Wanderung zu untersuchen. Es sollte aber auch keine Auswirkungen auf die Untersuchungen anderer Wanderung haben. Ein möglicher Grund für die ektopische Expression von tTA in der Oliva inferior ist eine Deletion

eines Repressorelements im humanen Pax6 Allel. Eine andere Möglichkeit ist ein Einfluß eines benachbarten Enhancers, durch den es ebenfalls zu einer ektopischen Expression kommen kann. Zusätzlich scheint die Expression von tTA in den Augen und dem ventralen Thalamus der Stadien E10,5-E16,5 im Vergleich zu Pax6 schwächer bzw. verzögert zu sein. Eine schwächere Färbung könnte methodische Gründe haben, da jede *in situ* Probe unterschiedlich gut an die Ziel-RNA anhaftet. Daher ist eine schwächere Färbung einer der beiden Proben nicht mit einer unterschiedlich starken Expression der beiden RNAs gleichzusetzen. Eine weitere Erklärung für die schwächere Expression der tTA-RNA ist eine erhöhte Instabilität der gebildeten tTA-RNA. Insgesamt sollte eine schwächere Expression der tTA- gegenüber der Pax6-RNA aber keine Auswirkungen auf die benötigte Funktionsfähigkeit der transgenen Mäuselinie mit sich bringen. Eine verspätete Expression des tTA gegenüber dem Pax6 deutet auf eine unterschiedliche Transkriptionsrate der RNAs hin. Da die beiden RNAs über ähnliche, aber nicht gleiche Promotoren, humanes Pax6 und murines Pax6, abgelesen werden, ist eine unterschiedliche Transkriptionsrate möglich. Die embryonale Entwicklung des Menschen verläuft bedeutend langsamer als die murine Entwicklung, daher ist es möglich, daß der humane Pax6 Promotor später aktiviert wird als der murine. Unterschiede in der tTA Expressionsstärke von zwei Kerngebieten könnten ebenfalls von der Verwendung des humanen Promotors abhängig sein (Schedl et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit der Typisierung der YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Mäuselinie ist eine immunhistochemische Doppelfärbung gegen die Proteine Pax6 und tTA. Erste Ergebnisse einer Doppelfärbung belegen eine gleichzeitige Expression von Pax6 und tTA in den Körnerzellen des Cerebellums. Die Doppelfärbung war aber nur sehr schwach und fotografisch nicht zu dokumentieren. Daher wurde sie im Ergebnisteil nicht aufgeführt.

4.2 Expression von möglichen regulatorischen Proteinen

Bloch-Gallego und Kollegen konnten in der Netrin1^{-/-} Mutante keine Veränderungen des pes feststellen (Bloch-Gallego et al., 1999). Da zu diesem Zeitpunkt jedoch nur wenige Marker für den pes bekannt waren, mag es zu Veränderungen kommen, die unerkant blieben. In der Pax6^{Sey/Sey} Mutante kommt es zu keiner Veränderung der Expression von Netrin-1 und DCC. Dagegen fehlt der Unc5H1 Rezeptor in der rhombischen Lippe dieser Mutante. Die Unc5H2 und 3 Rezeptoren fehlen im Nucleus cuneatus lateralis der

in der Mutante jedoch erst gar nicht gebildet wird. (Benzing et al., unveröffentlichte Daten). Da das Wanderungsverhalten der Zellen des Rhombencephalons allein durch diese Veränderungen nicht erklärt werden kann, ist es wahrscheinlich, daß auch andere Proteine entscheidend für die korrekte Ausbildung der tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons sind. Daher wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster von zwei Eph-Rezeptoren und zwei Ephrin Liganden auf eine räumliche und zeitliche Korrelation mit den tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons untersucht. Eine gleiche Studie wurde für das Netrin-1 Homolog Netrin-3 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Expressionsstudie zeigten eine Expression von EphA3, EphA7 und EphrinB1 in Bereichen des Rhombencephalons, die entscheidend für die tangentialen Wanderungen sind. Dazu gehören in den Stadien E13,5 und E14,5 die Expression des EphA3 in der rhombischen Lippe, im Nucleus reticularis lateralis, im Cerebellum sowie in der subventrikulären Zone und im Bulbus olfactorius. EphA7 ist zu dieser Zeit ebenfalls in der rhombischen Lippe, im Nucleus reticularis lateralis, im Cerebellum und zusätzlich im Nucleus hypoglossus exprimiert. In den gleichen Stadien ist EphrinB1 ebenfalls in der rhombischen Lippe, im Nucleus hypoglossus und zusätzlich in der subventrikulären Zone exprimiert. Da die Expression dieser Proteine zeitlich mit dem Verlauf der tangentialen Wanderungen der unteren und oberen rhombischen Lippe korrelieren, ist ein Einfluß auf den *pes*, *aes* und der Wanderung in das Stratum granulosum des Cerebellums wahrscheinlich. Die Proteine sind hauptsächlich in den Zielgebieten der rhombencephalon Wanderungen exprimiert, daher ist eine Funktion als Stoppsignal denkbar. Daneben ist aber auch eine Funktion für die Strukturierung der Zielkerne möglich, da die Eph Rezeptoren und ihre Liganden bisher hauptsächlich eine Rolle für direkte Zell-Zell-Interaktionen spielen (Orioli & Klein, 1997). Die Expression von EphA3 und EphrinB1 in der subventrikulären Zone könnte weiterhin wichtig für die Wanderung der Neurone von der ventrikulären Zone in den Neocortex sein. Das Expressionsmuster von EphrinA5 und Netrin-3 zeigte dagegen keine zeitliche oder räumliche Korrelation mit den tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons oder Telencephalons. Daher ist ein Einfluß dieser Proteine auf diese Wanderungen unwahrscheinlich.

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von EphA3, EphA7 und EphrinB1 für die tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons wurden *in situ* Hybridisierungen gegen die RNAs dieser Proteine an Pax6^{Sey/Sey} Mutanten durchgeführt, bei denen sich

jedoch keine Unterschiede in der Expression im Vergleich zur Wildtyp Maus zeigen. Neben den hier untersuchten Eph-Rezeptoren und Liganden ist der EphA4 Rezeptor in E13,5 in den Zellen des Olivenstroms, der Ligand EphrinB3 in der Bodenplatte und der Ligand EphrinA5 soll um den Olivenstrom herum exprimiert sein (de Diego et al., 2002). Ein solches Expressionsmuster des EphrinA5 Liganden konnte durch die hier durchgeführten Expressionsstudien jedoch nicht bestätigt werden. Zusammen mit den hier gewonnen Resultaten konnte mittlerweile eine zeitliche und räumliche Korrelation von drei Eph-Rezeptoren und mindestens zwei Ephrin Liganden mit den tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons bewiesen werden. Ein Einfluß dieser Rezeptoren und Liganden der Tyrosinkinase-Rezeptorklasse für die Wanderungen des Rhombencephalons ist damit möglich. Zur weiteren Untersuchung der Eph-Rezeptoren und ihrer Liganden könnten mit den vorhandenen Methoden Überexpressionsstudien durchgeführt werden. Da die Ephrine nur in gebundenem Zustand an die Eph Rezeptoren binden können, kann vermutlich sowohl die Bedeutung der Eph-Rezeptoren als auch ihrer Liganden für die rhombencephalen Wanderungen durch diesen Versuchsansatz näher untersucht werden. Zusätzlich könnte geklärt werden, ob die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden für die Wanderung selbst oder für die Strukturierung der Kerngebiete eine Rolle spielen.

4.3 Der posteriore extramurale Wanderungsstrom (pes)

In dieser Arbeit konnten durch Transplantations- und Kollagenkokulturversuche erstmals grundlegende Mechanismen des pes im Rhombencephalon der Maus geklärt werden.

Die Zellen des pes werden ab dem Stadium E10,5 in der unteren rhombischen Lippe gebildet und beginnen ab E13,5 ihre tangentiale Wanderung über die piale Oberfläche des Rhombencephalons (Altman & Bayer, 1987c). Da die Zellen bei den Transplantationsversuchen meist problemlos die Schnittstellen kreuzen konnten, ist es wahrscheinlich, daß die Zellen nicht entlang von andersartig gebildeten Fortsätzen wandern. Zu ähnlichen Resultaten kamen Kyriakopoulou und Kollegen durch immunhistochemische Färbungen (Kyriakopoulou et al., 2002). Im weiteren Verlauf der Wanderung werden die Zellen vom Bodenplattenbereich des Rhombencephalons angezogen. Diese Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit gleich durch zwei Versuche unterstützt werden: Einerseits wurden die Zellen des pes in einer

Kollagenkokultur von einem Bodenplattenbereich angezogen und andererseits kam es im Transplantationsversuch, in dem der Bodenplattenbereich entfernt wurde, zu einer sehr ungeordneten Wanderung. Taniguchi und Kollegen veröffentlichten 2002 entsprechende Ergebnisse ihrer Transplantationsversuche, jedoch konnten sie durch die verwendete Methode nicht eindeutig belegen, daß die untersuchten wandernden Zellen dem pes entstammen. Der Bodenplattenbereich hat damit eine entscheidende Bedeutung für die Anziehung der wandernden Zellen, während er für den Beginn der Wanderung nicht ausschlaggebend ist.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Transplantationsexperimente, bei denen die Bodenplatte seitlich verschoben wurde, konnte gezeigt werden, daß der Bodenplattenbereich eine homogene Verteilung des anziehenden Proteins aufweist. Die Ergebnisse des Transplantationsversuchs, bei dem eine ektopische Bodenplatte senkrecht an eine Wanderung gelegt wurde, deuten auf ein anziehendes Protein in der Bodenplatte, das in Form eines Gradienten vorliegt, wodurch die Konzentration lateral der Bodenplatte geringer wäre als in medialen Bereichen. Die wandernden Zellen bevorzugen bei diesem Versuchsaufbau stets die am nächsten gelegene Bodenplatte. Wie weit ein Gradient in die lateralen Bereiche des Stammhirns hineinreicht, ist von der Art des Proteins abhängig. Handelt es sich um ein diffusibles Protein, ist ein Gradient von bis zu 1mm möglich, handelt es sich dagegen um ein substratgebundenes Protein, ist ein Gradient von bis zu 1cm möglich (Goodhill, 1998). Ein entscheidender Ligand der Bodenplatte ist das Netrin-1, das nachweislich anziehend auf die wandernden Zellen des pes wirkt (Alcantara et al., 2000; Taniguchi et al., 2002). Netrin-1 als diffusibles Protein würde daher einen Gradienten von ca. 1mm Weite bilden. Somit könnte dieser Gradient die Zellen der unteren rhombischen Lippe zu Beginn ihrer Wanderung erreichen, da in diesem embryonalen Stadium die rhombische Lippe ca. 0,5-1mm von der Bodenplatte entfernt ist (siehe z.B. Fig.13).

Ein anderes Protein, das ebenfalls entlang der Bodenplatte exprimiert ist, Sonic Hedgehog, hat *in vivo* und *in vitro* nachweislich einen anziehenden Einfluß auf die kommissuralen Axone der Bodenplatte (Charron et al., 2003). Bei diesem Protein handelt es sich um ein Signalmolekül, das in einer definierten Region gebildet wird und sich von seiner Quelle wegbewegt um einen Konzentrationsgradienten über eine weite Strecke zu bilden (Charron et al., 2003). Durch diese Eigenschaft könnte der Gradient von Sonic Hedgehog die Zellen der unteren rhombischen Lippe ebenfalls gleich zu

Beginn ihrer Wanderung erreichen und anziehend auf diese Zellen wirken. Bis heute ist eine Wirkung von Sonic Hedgehog auf Zellwanderungen jedoch noch nicht bewiesen.

Das Netrin-3 Protein, als Homolog des Netrin-1, kann auf Grund seines RNA-Expressionsmusters nicht an der anziehenden Wirkung der Bodenplatte beteiligt sein.

Nachdem die Zellen die Bodenplatte gekreuzt haben, wandern sie kontralateral zu ihren Zielkernen, dem Nucleus reticularis lateralis und Nucleus cuneatus lateralis (Altman & Bayer, 1987c). Der Transplantationsversuch der vorliegenden Arbeit, bei dem eine ektopische Bodenplatte senkrecht an eine bereits begonnene Wanderung gelegt wurde, zeigt, daß die Zellen nur vor der Kreuzung der Bodenplatte von dieser angezogen werden. Gleiche Ergebnisse fanden auch Taniguchi und Kollegen (2002). Jedoch ist bei ihrem Versuchsaufbau wieder nicht eindeutig geklärt, ob die wandernden Zellen tatsächlich dem pes entstammen (Taniguchi et al., 2002).

Nach der Kreuzung der Bodenplatte können die Zellen von diesem Bereich nicht mehr angezogen werden. Die Rezeptoren dieser Zellen scheinen daher während der Bodenplattenkreuzung eine Konformationsänderung zu vollziehen, so daß die zuvor anziehend wirkenden Rezeptoren ihre Wirkung verlieren. In einem weiteren Transplantationsversuch der vorliegenden Arbeit wurde der kontralaterale Bereich des Rhombencephalons seitlich verschoben. Dadurch kommt es zu keiner Veränderung in der Wanderungsrichtung der Zellen. Daher scheinen die Zellen nicht entlang eines vorgegebenen Pfades zu wandern. Entweder wird ihr Zielgebiet durch ein Protein festgelegt, das in der Flügelplatte exprimiert ist, oder auf Grund einer Konformationsänderung ihrer Rezeptoren. Taniguchi und Kollegen konnten durch Transplantationsversuche zeigen, daß die Flügelplatte eine anziehende Wirkung auf wandernde Zellen hat, nachdem diese die Bodenplatte gekreuzt haben (Taniguchi et al., 2002). Diese Ergebnisse belegen die Theorie eines anziehenden Proteins für den pes in der Flügelplatte, wobei bis heute nicht bekannt ist, welches Protein dafür in Frage kommt. Da die Zellen sich jedoch nach der Kreuzung der Bodenplatte in zwei verschiedenen Zielgebieten niederlassen, die unterschiedlich weit von der Bodenplatte entfernt sind, müssen die Zellen dieser beiden Kerne eine unterschiedliche Rezeptorausstattung besitzen. Diese Rezeptoren könnten unterschiedlich stark abstoßend auf ein Signal der Bodenplatte und/oder unterschiedlich stark anziehend auf ein Signal der Flügelplatte wirken. Aktuelle Studien zeigen eine Expression von Rho GTPasen (Guanosin Triphosphatase) in den wandernden Zellen des pes (Causeret et al.,

2004). Sobald jedoch die Expression gehemmt wird, stoppen die Zellen ihre Wanderung, das Auswachsen der Axone Richtung Cerebellum wird gleichzeitig aber nicht verändert (Causeret et al., 2004). Es ist daher möglich, dass die Zellen des pes ihre Wanderung so lange fortsetzen, bis die Rho GTPase Expression gestoppt wird. Die Rho GTPase Expression wiederum kann durch drei Typen regulatorischer Proteine gesteuert werden: „guanine nucleotide dissociation inhibitors“ (GDIs), „guanine nucleotide exchange factors“ (GEFs) und GTPase aktivierende Proteine [(GAPs) review siehe: Ridley, 2001].

4.4 Die Bedeutung des Unc5H3 Rezeptors für den pes

Ein gutes Beispiel für einen abstoßend wirkenden Rezeptor ist der Unc5H3 Rezeptor, der von den wandernden Zellen nach der Kreuzung der Bodenplatte und während des Erreichens der beiden Zielgebiete exprimiert wird. In Pax6^{Sey/Sey} Mutanten fehlt der Rezeptor in den Körnerzellen des Cerebellums und im Nucleus cuneatus lateralis, der jedoch in der Mutante nicht gebildet wird. Im Nucleus reticularis lateralis dagegen ist der Rezeptor weiterhin vorhanden. Daher könnte dieser Rezeptor entscheidend für das Erreichen der Zielgebiete sein, indem er weitere Wanderung der Körnerzellen verhindert, nachdem diese ihr Zielgebiet erreicht haben. Der Unc5H3 Rezeptor würde danach als Stoppsignal fungieren. Nach der Beendigung der Wanderung verlassen die Zellen die piale Oberfläche und lassen sich im Parenchym des Rhombencephalons nieder (Altman & Bayer, 1987c).

Die Überexpressionsstudien von Unc5H3, fusioniert mit EGFPm, der vorliegenden Arbeit, zeigten *in vitro* eine Lokalisation der Zellen des pes an der rhombischen Lippe im Parenchym des Rhombencephalons, die sich in einer Kontrollwanderung ausschließlich auf der pialen Oberfläche befanden. Eine Überexpression des Unc5H3 hat daher Einfluß auf die Lokalisation der wandernden Zellen. Auf Grund dieser Resultate könnte der Unc5H3 Rezeptor *in vivo* entscheidend für die Wanderung der Zellen von der pialen Oberfläche in das Parenchym zur Ausbildung der Zielkerne sein, in dem er als Stoppsignal für die wandernden Zellen dient. Da in Pax6^{Sey/Sey} Mutanten jedoch nur der Nucleus reticularis lateralis, nicht aber der Nucleus cuneatus lateralis, eine normale Unc5H3 Expression aufweist, ist es möglich, daß der Unc5H3 Rezeptor nur für die Ausbildung eines dieser Zielkerne wichtig ist.

4.5 Die Funktion des Unc5H3 als „dependence receptor“ (engl.: abhängiger Rezeptor)

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen daneben die apoptotische Wirkung des Unc5H3 Rezeptors, die nur zum Ausdruck kommt, wenn der Rezeptor unabhängig von Netrin-1 exprimiert wird (Llambi et al., 2001). Als „dependence receptor“ wird jeder Rezeptor bezeichnet, der bei gleichzeitiger Expression seines Liganden Apoptose inhibiert und bei unabhängiger Expression Apoptose induziert. Neben dem hier untersuchten Unc5H3 gehören auch die Rezeptoren DCC, Unc5H1, Unc5H2, Neogenin und vermutlich auch Unc5H4 zu dieser Gruppe (Llambi et al., 2001; Mehlen et al., 1998; Matsunaga et al., 2004; Yokota et al., 2004). Für die Rezeptoren Unc5H1-3 konnte bereits nachgewiesen werden, daß die Apoptose nach der Spaltung der intrazellulären Rezeptordomäne durch Caspase3 über die „Death Domäne“ induziert wird (Llambi et al., 2001). Daneben wirkt der Unc5H1 Rezeptor bedeutend stärker Apoptose induzierend als der Unc5H2 und Unc5H3 Rezeptor (Williams et al., 2003). Für den Unc5H1 Rezeptor konnten Williams und Kollegen weiterhin eine Interaktion mit NRAGE [Mitglied der MAGE (Melanoma Antigen-kodierendes Gen) Proteinfamilie] belegen, die wichtig für die apoptotische Wirkung des Rezeptors ist. Hierbei bindet NRAGE an die juxtamembrane proximale Region von Unc5H1, die die PEST (Aminosäure Motiv, das zytoplasmatische Proteine zum schnellen proteolytischen Abbau angreifen soll) und ZU-5 Domäne enthält. Durch diese Bindung wird die Apoptose induziert. Wird die PEST Domäne des Rezeptors deletiert, wird die apoptotische Wirkung des Rezeptors unterdrückt. Diese Funktionsweise des Unc5H1 Rezeptors hat aber eindeutig keine Gültigkeit für den Unc5H2 und Unc5H3 Rezeptor (Williams et al., 2003). Für die apoptotische Wirkung des DCC Rezeptors konnte bereits ein Einfluß der Caspase3 nachgewiesen werden. Hierbei unterdrückt eine Mutation in der Caspase3 die apoptotische Wirkung des Rezeptors (Mehlen et al., 1998). Weiterhin konnte für den DCC Rezeptor gezeigt werden, daß die apoptotische Wirkung unabhängig vom Mitochondrien-abhängigen und vom Death Rezeptor/Caspase8-abhängigen Apoptose induzierenden Weg ist (Forcet et al., 2001). Damit ist bewiesen, daß die durch die „dependence receptors“ induzierte Apoptose vollkommen unabhängig von der bisher bekannten Apoptoseinduktion verläuft. Dadurch ergibt sich ein absolut neues Paradigma der Apoptose: Apoptose ist ein zusätzlicher Mechanismus zur Definierung von Wanderungswegen (Llambi et al.,

2001). Dies beinhaltet, daß jedes auswachsende Axon oder jede wandernde Zelle, die von ihrem korrekten Wanderungsweg abkommt, durch Apoptose am weiteren (Aus-)wandern gehindert wird. Außerdem ergibt sich aus diesen Untersuchungen eine neue Sichtweise der *Netrin-1*^{-/-} Mutante. Möglicherweise sind viele Veränderungen nicht direkt auf das Fehlen des *Netrin-1* Proteins zurückzuführen, sondern aus der daraus resultierenden apoptotischen Wirkung seiner vier „dependence receptors“.

4.6 Weitere wichtige Proteine des pes

Slit / Robo: *Slit* ist, ähnlich wie *Netrin-1*, während des pes in der Bodenplatte und zusätzlich in der rhombischen Lippe des Rhombencephalons der Maus exprimiert. Daneben ist eine Expression des *Slit* Rezeptors *Rig-1* in den wandernden Zellen des pes im Stadium E14,5 zu beobachten, der eine Funktion für die Bodenplattenkreuzung dieser Zellen hat (Diplomarbeit, Tersar, 2003). Diese Aussage wird gestützt durch Untersuchungen an der *Rig-1*^{-/-} Mutante, bei der die Zellen des pes die Bodenplatte nicht kreuzen können (Marillat et al., 2004). Die gleichen Veränderungen wurden auch in HGPPS (horizontal gaze palsy with progressive scoliosis) Patienten gefunden, die eine Mutation im *Rig-1* Gen aufweisen (Jen et al., 2004). Vermutlich ist der Rezeptor-Liganden Komplex nach der Kreuzung der Bodenplatte entscheidend am Verbleiben der Zellen auf der kontralateralen Seite beteiligt. Er verhindert ein Rückkreuzen der Zellen auf die ipsilaterale Seite.

MAP1B: *MAP1B* ist ein Neuron-spezifisches Mikrotubuli-assoziiertes Protein das an der Interaktion von Mikrotubuli und Aktinfilamenten beteiligt ist. Es stellt einen wichtigen abwärts gerichteten Effektor von *Netrin-1* abhängiger neuronaler Wanderungen der unteren rhombischen Lippe und anderer tangentialer Wanderungen dar. *MAP1B*^{-/-} Mutanten zeigen *in vitro* eine reduzierte Anziehung zu einer *Netrin-1* Quelle. Zusätzlich zeigen *MAP1B*^{-/-} Mutanten ähnlich starke Veränderungen des Gehirns wie *Netrin-1*^{-/-} Mutanten. Dazu gehören u.a. veränderte axonale Leitung und Veränderungen im Pons (Del Rio et al., 2004). Da die *MAP1B*^{-/-} Mutante ähnliche Veränderungen wie die *Netrin-1*^{-/-} aufweist und *MAP1B* ein abwärts gerichteter Effektor von *Netrin-1* ist, könnten auch hier die „dependence receptors“ daran beteiligt sein.

TAG-1: *TAG-1* ist ein Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF; Furley et al., 1990) und interagiert mit einigen anderen Proteinen dieser Familie (Buchstaller et al., 1996; Rathjen & Schachner, 1984). Eine Expression des *TAG-1* Proteins ist in den

wandernden Zellen des pes, in den Körnerzellen des Cerebellums sowie in Zellen des Pons zu beobachten. Wird Tag-1 in den Zellen des pes blockiert, resultiert das in einer Änderung im Wanderungsverhalten der Zellen. Ohne TAG-1 stoppen die Zellen ihre Wanderung auf der Hälfte und wandern mehr individuell (Kyriakopoulou et al., 2002).

F-Spondin: F-Spondin ist ein extrazelluläres Matrixmolekül (ECM) mit adhäsiven Eigenschaften (Klar et al., 1992). Ein Teil seiner amino-terminalen Domäne zeigt große Homologien mit einem amino-terminalen Teil des Proteins Reelin, das in der Leitung von corticalen Neuroblasten beteiligt ist (D'Arcangelo et al., 1995). Der zweite Teil seiner amino-terminalen Domäne bildet die Spondin Domäne, die charakteristisch für die neue Proteinfamilie der Mindine ist (Higashijima et al., 1997). F-Spondin wird von der Bodenplatte produziert und sekretiert. Im Huhn verhindert das Protein ein laterales Driften der kommissuralen Axone, nachdem sie die Bodenplatte gekreuzt haben (Burstyn-Cohen et al., 1999).

Bisher wurden ausschließlich Proteine vorgestellt, die im neuronalen Gewebe um die tangentialen Wanderungen herum oder in den wandernden Zellen selbst exprimiert sind. Es ist aber auch möglich, daß andere Gewebetypen anziehende oder abstoßende Signale enthalten. Es gibt Hinweise darauf, daß der pes, ähnlich wie der rostrale Wanderungsstrom zum Bulbus olfactorius, entlang einer Kette durch ein Rohr von Gliazellen, verläuft (Engelkamp, unveröffentlichte Daten). Diese Gliazellen und auch die Meningen, die das neuronale Gewebe umgeben, könnten für die Wanderung wichtige Signale enthalten (de Diego et al., 2002; Ma et al., 1998).

4.7 Tangentiale Wanderung des Olivenstroms

Die Neurone des Olivenstroms beginnen ihre Wanderung von der unteren rhombischen Lippe ab E10,5 durch das Parenchym zu ihrem ipsilateralen Kerngebiet (Altman & Bayer, 1987b). Während der Wanderung ist Netrin-1 im medullären Neuroepithel exprimiert. Ebenso findet sich eine Expression von Unc5H3 und Neogenin in der Mantelschicht der Medulla. Im Zielgebiet der wandernden Zellen, der Oliva inferior, wird in E16,5 sowohl DCC als auch Neogenin exprimiert.

Diese tangentielle Wanderung unterscheidet sich von den restlichen des Rhombencephalons durch das Fehlen der Pax6 Expression in den wandernden Zellen. Trotz dieses Unterschiedes scheint die Wanderung dieser Zellen teilweise von gleichen Signalmolekülen abhängig zu sein. So exprimieren die Axone der wandernden Zellen

erst nach ihrer Bodenplattenkreuzung den Rezeptor DCC (de Diego et al., 2002). Für die korrekte Bildung der Oliva inferior scheint Netrin-1 eine große Rolle zu spielen, da in Netrin-1^{-/-} Mutanten die Zahl der Neurone dieses Gebiets verringert ist, bzw. manche Neurone ektopisch entlang des Wanderungsstroms lokalisiert sind (Bloch-Gallego et al., 1999). Diese Reduktion könnte auch, wie bereits beschrieben, durch den sekundären Effekt der „dependence receptors“ zu Stande kommen. Die Bodenplatte hat eine anziehende Wirkung auf die wandernden Zellen und gleichzeitig stellt sie ein Stoppsignal dar (de Diego et al., 2002; Bloch-Gallego et al., 1999). Da Netrin-1 in der Bodenplatte und Neogenin in der Oliva inferior exprimiert wird, könnten diese Proteine als anziehendes und als Stoppsignal für die wandernden Zellen in Frage kommen. Die anziehende Wirkung von Netrin-1 für die Zellfortsätze und auch -nuclei der Oliva inferior konnte bereits gezeigt werden (Causeret et al., 2002). Daneben konnte eine Koexpression von Slit1 und Slit2 in der Bodenplatte nachgewiesen werden, wobei sie einen schwachen abstoßenden Effekt auf das Axonwachstum der Neurone der Oliva inferior haben. Kombiniert mit Netrin-1 hebt Slit1 die anziehende Wirkung von Netrin-1 konzentrationsabhängig teilweise bzw. ganz auf. Slit ist somit entscheidend an der korrekten Positionierung der Neurone der Oliva inferior beteiligt, indem es die Zellkörper stoppt, wenn sie die Bodenplatte erreicht haben (Causeret et al., 2002). Für die axonale Leitung dieser Zellen zum Cerebellum stellt das Cerebellum ein anziehendes Signal zur Verfügung, das erst anziehend auf die Axone wirkt, wenn diese die Bodenplatte gekreuzt haben. Vor der Kreuzung wirkt nur die Bodenplatte anziehend. Welches Protein für diese anziehende Wirkung des Cerebellums verantwortlich ist, konnte jedoch noch nicht geklärt werden (Zhu et al., 2003).

4.8 Tangentiale Wanderung des anterioren extramuralen Wanderungsstroms (aes)

Die Zellen des aes beginnen ihre Wanderung von der unteren rhombischen Lippe zwischen E12,5 und E15,5, wandern ipsilateral um die Brückenbeuge herum und lassen sich im NRPT und Pons nieder. Die Axone dieser Zellen terminieren als Moosfasern im Cerebellum (Altman & Bayer, 1987d).

Während dieser Wanderung findet sich eine Expression von Netrin-1 im medullären Neuroepithel. Der Rezeptor DCC dagegen wird von den wandernden Zellen selbst exprimiert. Neogenin und Unc5H1 werden während der Wanderung ausschließlich von

der Medulla exprimiert, Unc5H2 zeigt darüber hinaus eine Expression in der Formatio reticularis und in E14,5 auch in der rhombischen Lippe. Der Unc5H3 Rezeptor wird zu Beginn dieser Wanderung im Pons und zum Ende in der rhombischen Lippe exprimiert. Der Unc5H4 Rezeptor ist in den wichtigen Bereichen dieser Wanderung nicht exprimiert. Dieses Expressionsmuster läßt auf eine bedeutende Rolle von Netrin-1 und seinen Rezeptoren für den *aes* schließen, was auch bereits belegt werden konnte. Netrin-1 stellt über DCC ein anziehendes Signal für die wandernden Zellen dieses Stroms dar (Yee et al., 1999). Welche Bedeutung jedoch die restlichen Rezeptoren für diese Wanderung haben, konnte noch nicht geklärt werden. Aktuelle Studien zeigen, daß die Zellen vor dem Erreichen ihres Zielgebiets ihre Wanderungsrichtung ändern und radial in ihr Zielgebiet einwandern (Ono et al., 2004). Eine Beteiligung des Unc5H3 Rezeptors an der Positionierung der Zellen im Parenchym kann durch die vorliegenden Ergebnisse der Überexpressionsstudie vermutet werden. Da der Unc5H3 Rezeptor im Pons, als Zielgebiet des *aes*, exprimiert wird, könnte der Rezeptor auch hier eine Rolle für die radiale Einwanderung der Zellen ins Parenchym spielen.

4.9 Tangentiale Wanderung von der oberen rhombischen Lippe ins Cerebellum

Die Zellen dieses Wanderungsstroms ziehen zu Beginn tangential entlang der pialen Oberfläche ins Cerebellum. Dort angekommen ändern sie ihre Wanderungsrichtung und ziehen radial ins Stratum granulosum (Altman & Bayer, 1987a).

Der Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren während der Entwicklung des Cerebellums zeigt bereits ab E10,5 eine Expression von DCC und Unc5H3. Netrin-1 ist während der embryonalen Entwicklung nicht im Cerebellum exprimiert, erst im postnatalen Stadium ist es vorhanden. Bis zum Stadium E16,5 sind alle Netrin-1 Rezeptoren im Cerebellum exprimiert. Im postnatalen Stadium sind Netrin-1, DCC und Neogenin im Stratum moleculare, Unc5H1, 2 und 3 im Stratum granulosum und Unc5H4 im Stratum purkinjense exprimiert. In der embryonalen Entwicklung des Cerebellums ist Netrin-1 somit nicht, seine Rezeptoren jedoch gut exprimiert. Daher ist es wahrscheinlich, daß es einen oder mehrere weitere Liganden für diese Rezeptoren gibt. Für den Rezeptor Neogenin wurde in einer aktuellen Studie ein neuer Ligand vorgestellt: das „repulsive guidance molecule“ (RGM). Dieses Protein bindet besser an Neogenin als Netrin-1. Die Proteine haben jedoch keine signifikante

Sequenzübereinstimmung und zusätzlich können DCC, Unc5H1 und 3 das RGM nicht binden. Es gibt jedoch eine Ähnlichkeit mit dem Netrin-1-DCC Komplex: RGM bindet, genau wie Netrin-1 an DCC, an die Fibronectin Typ III ähnliche Region von Neogenin. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob dies auch für die Bindung von Netrin-1 an Neogenin der Fall ist (Rajagopalan et al., 2004). Zusätzlich konnte Neogenin als „dependence receptor“, abhängig vom RGM, identifiziert werden (Matsunaga et al., 2004).

Die Körnerzellen exprimieren während ihrer Wanderung Pax6. In Pax6^{Sey/Sey} Embryonen bilden die Körnerzellen im externen Stratum granulosum keine Parallelfaseraxone und wandern entsprechend auch nicht an diesen entlang (Yamasaki et al., 2001). Daher scheint Pax6 für die korrekte Ausbildung der axonalen Verbindungen verantwortlich zu sein und aus diesem Defekt resultierend kommt es zu einer verfrühten Beendigung der Wanderung dieser Zellen. Aus der Literatur sind drei Mutationen bekannt, die sich alle auf den Unc5H3 Rezeptor beziehen: „cerebellar vermis defect“ [cvd (Kuwamura et al., 1994)], „hobble“ (Kuramoto et al., 2004) und „rostral cerebellar malformation“ [rcm (Lane et al., 1992)]. All diese Mutationen führen ausschließlich zu Veränderungen des Cerebellums. In der Mutation „cvd“, kommt es, wie der Name schon sagt, hauptsächlich zum Fehlen der Vermis (Kuwamura et al., 1994). In der Mutation „hobble“ kommt es hauptsächlich zu Strukturanomalien in der Laminierung des Cerebellums (Kuramoto et al., 2004) und in der Mutation „rcm“ kommt es zu einer veränderten Wanderung der Purkinje- und Körnerzellen in den Colliculus inferior und ins Tegmentum des Mesencephalons. Daneben wandern die Körnerzellen auch in die weiße Substanz des Cerebellums ein. Die Körnerzellen scheinen daher innerhalb und außerhalb des Cerebellums eine Schlüsselrolle für die Festlegung der Cerebellumgrenzen zu spielen (Goldowitz et al., 2000). Unc5H3 hat dabei vermutlich eine abstoßende Funktion (Przyborski et al., 1998). Da diese Mutationen alle vom Einwandern der Zellen in die Schichten des Cerebellums abhängig sind, scheint Unc5H3 hier eine ähnliche Funktion wie vermutlich im pes zu haben. Welche Rolle jedoch die anderen Unc5 Rezeptoren, insbesondere der Unc5H4 Rezeptor mit seiner separierten Expression in der Purkinjellschicht spielt, ist bis heute nicht bekannt. Da Netrin-1 und seine Rezeptoren nicht nur im embryonalen und postnatalen, sondern auch im adulten Cerebellum exprimiert sind, scheinen diese Rezeptoren nicht nur für die Zellwanderung

entscheidend zu sein. Möglichweise sind sie auch wichtig für die ein Leben lang anhaltende Plastizität.

4.10 Tangentiale Wanderungen im Telencephalon

Im Telencephalon wandern während der Entwicklung des Gehirns GABAerge Interneurone und vermutlich auch Oligodendrozyten vom medialen und vom caudalen Ganglienhügel über unterschiedliche Wege zum dorsalen Telencephalon. Neurone der corticalen-striatalen Grenze wandern zum ventralen Telencephalon (Corbin et al., 2001; Maricich et al., 2001). Der rostrale Wanderungsstrom der olfaktorischen Interneurone wird im nächsten Abschnitt separat diskutiert werden.

Der Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren während der Entwicklung des Telencephalons zeigt bereits ab E10,5 eine Expression von Netrin-1, DCC und Unc5H1 im Hypothalamus. In späteren embryonalen Stadien kommt noch eine Expression von Neogenin und Unc5H4 in diesem Gebiet dazu. Im Epithalamus ist in der frühen Entwicklung bereits DCC und Unc5H4 exprimiert. In den darauf folgenden Stadien sind auch Unc5H2 und Unc5H3 vorhanden. Im Thalamus sind anfänglich DCC, Unc5H1 und 4 exprimiert und später auch Netrin-1, Unc5H1 und Unc5H4. Neogenin ist in diesem Gebiet zu keiner Zeit exprimiert. Auf Grund dieser Expressionsmuster ist es wahrscheinlich, daß Netrin-1 und seine Rezeptoren an der Ausbildung dieser Kerngebiete beteiligt ist. Besonders der Thalamus, als „Tor zum Cortex“, weist eine hoch organisierte Verschaltung durch Efferenzen aus dem Stammhirn und Afferenzen zum Cortex auf. Eine Funktion von Netrin-1 und DCC für die axonale Leitung während der Entwicklung des Cortex konnte auch bereits nachgewiesen werden (Livesey & Hunt, 1997; Richards et al., 1997). Es ist daher möglich, daß Netrin-1 und seine Rezeptoren in diesen Gebieten nicht in die neuronale Zellwanderung sondern in die Führung der auswachsenden Axone involviert sind.

Für das Protein Slit dagegen gibt es bereits Beweise für seine Funktion in der tangentialen Wanderung im Cortex: Slit spielt eine wichtige Rolle für die Wanderung der GABAergen Interneurone, z.B. indem es abstoßend auf die Zellen des lateralen Ganglienhügels in der ventrikulären Zone wirkt (Zhu et al., 1999). Daneben wirkt Slit aber auch abstoßend auf auswachsende Axone (Brose et al., 2000).

Ein Einfluß von Netrin-1 und seinen Rezeptoren auf die radiale Wanderung im Cortex ist unwahrscheinlich, da sie nur schwach oder gar nicht in diesem Gebiet exprimiert

sind. Im Hippocampus ist eine erste Expression von DCC und Neogenin in E16,5 zu beobachten. Ab E18,5 sind die Rezeptoren Unc5H1-4 in den verschiedenen Bereichen unterschiedlich stark exprimiert. Daher könnten Netrin-1 und seine Rezeptoren für die korrekte Schichtenbildung sowie das Einwandern der Körnerzellen ins Stratum granulosum sein.

Im adulten Gehirn bleibt die Expression aller Netrin-1 Rezeptoren erhalten, ausschließlich die relative Stärke der Expression der verschiedenen Bereiche des Hippocampus ist unterschiedlich. Zusätzlich ist im adulten Hippocampus auch Netrin-1 exprimiert. Neben dieser späten Expression von Netrin-1 konnten Steup und Kollegen zusätzlich einen anziehenden Effekt von Netrin-1 auf die commissuralen Neurone des Gyrus dentatus und der CA3 Region zu ihrem Ziel, dem kontralateralen Hippocampus belegen (Steup et al., 2000). Weiterhin gibt es Hinweise für eine Bedeutung des Netrin-1 Proteins für reziproke septo-hippocampale Verschaltungen (Pascual et al., 2004). Eine Bedeutung von Netrin-1 und seinen Rezeptoren für die Wanderung der neu gebildeten Körnerzellen ins Stratum granulosum des Gyrus dentatus konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden. Da Unc5H3 hier eine sehr prominente Expression aufweist, ist es möglich, daß der Rezeptor wichtig für das Einwandern der Körnerzellen ins Stratum granulosum ist. Bis heute konnte für die tangentialen Wanderungen des Cortex kein Einfluß von Netrin-1 und seinen Rezeptoren beobachtet werden. Jedoch gibt es Beweise für eine Funktion des Slit Proteins für diese Wanderungen. Da Slit über Robo die Aktivität von DCC verändern kann, ist eine Funktion dieses Rezeptors und seines Liganden Netrin-1 wahrscheinlich.

4.11 Tangentiale Wanderung in den Bulbus olfactorius

Die Zellen des rostralen Wanderungsstroms beginnen ihre Wanderung vom lateralen Ganglienhügel, ziehen in den Bulbus olfactorius und bilden dort die Körnerzellen und Interneurone. Im postnatalen Stadium P5 sind Netrin-1 und seine Rezeptoren, außer Unc5H3, alle im Bulbus olfactorius exprimiert. In den wandernden Zellen selbst findet sich ausschließlich eine Expression von Netrin-1 und Unc5H4. Alle anderen Rezeptoren sind in benachbarten Bereichen exprimiert: DCC und Neogenin in der subventrikulären Zone, Unc5H1 in der Mitralzellschicht und Unc5H2 in der internen und externen plexiformen Schicht. Damit zeigen Netrin-1 und Unc5H4 eine komplementäre Expression zu den restlichen Rezeptoren. Zusätzlich ist Unc5H4 aber auch in der

Mitralzellschicht exprimiert. Im Tractus olfactorius lateralis findet sich eine Expression von Neogenin und Unc5H4, nicht aber von Netrin-1. Über die Funktion von Netrin-1 und seinen Rezeptoren für den rostralen Wanderungsstrom ist bisher noch nichts bekannt. Für das Protein Slit jedoch konnte bereits gezeigt werden, daß es im Septum die Mittellinienkreuzung des Tractus olfactorius lateralis verhindert. Außerdem wirkt es allgemein abstoßend auf die Axone des Bulbus olfactorius (Nguyen-Ba-Charvet & Chedotal, 2002). Neben dieser Funktion für die Axonleitung konnte aber auch bereits ein abstoßender Einfluß von Slit auf die olfactorischen Interneurone des rostralen Wanderungsstroms beobachtet werden (Hu, 1999). Da Slit über Robo die Aktivität von DCC verändern kann (s.o), und die Proteine alle im Bulbus olfactorius exprimiert werden, ist auch hier eine Funktion dieser Rezeptoren und Liganden wahrscheinlich.

5 Ausblick

Insgesamt steht mit der YT-P_{hPax6}-tTA transgenen Mäuselinie ein ideales Werkzeug zur Untersuchung tangentialer Wanderungen im embryonalen und adulten Gehirn der Maus zur Verfügung. Mit dieser Arbeit wurden einige der möglichen Anwendungsmöglichkeiten und der daraus resultierenden Ergebnisse vorgestellt. Die YT-P_{hPax6}-tTA transgene Mäuselinie kann zur Untersuchung aller Pax6-positiven Wanderungsströme des embryonalen Gehirns der Maus verwendet werden. Dazu gehören im Rhombencephalon der pes, der aes und die Wanderung der Körnerzellen ins Cerebellum, sowie im Telencephalon der rostrale Wanderungsstrom. Da der rostrale Wanderungsstrom ein Leben lang anhält, kann seine Funktionsweise auch im adulten Gehirn erforscht werden.

Zur Untersuchung der in die Wanderung involvierten Rezeptoren bieten sich, wie hier verwendet, Über- bzw. Missexpressionsstudien an. Dadurch kann die Funktion des Rezeptors für die Wanderung leicht getestet werden. Handelt es sich jedoch um einen „dependence receptor“ wie der in dieser Arbeit verwendete Unc5H3 Rezeptor, sollte der Rezeptor nicht gleich zu Beginn der Wanderung exprimiert werden, sondern erst später oder nur zu den Zeiten, in denen er auch *in vivo* exprimiert wird. Dadurch werden die Zellen vermutlich nicht apoptotisch sterben und die Auswirkungen der Über-/Missexpression des Rezeptors auf die Wanderung kann beobachtet werden. Eine spätere Expression des Rezeptors in den wandernden Zellen könnte durch eine spätere Elektroporation erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit den Rezeptor später während der Wanderung zu exprimieren, wäre die Verwendung eines Promotors, der nur in postmitotischen Zellen aktiviert wird. Die Proteine Necdin (Uetsuki et al., 1996) und T α 1- α -Tubulin, (Gloster et al., 1994, 1999) werden z.B. nur in postmitotischen Zellen exprimiert. Die Zellen des Rhombencephalons starten ihre Wanderung von der rhombischen Lippe erst, wenn sie postmitotisch geworden sind. Würden die Promotoren von Necdin oder T α 1- α -Tubulin zur Expression des Rezeptors verwendet, sollten die Zellen den Rezeptor erst exprimieren, wenn sie ihre Wanderung begonnen haben. Durch die Verwendung des Necdin- oder T α 1- α -Tubulin Promotors wäre es daher möglich die Expression des Rezeptors zu verzögern. Soll dagegen der Rezeptor nur überexprimiert werden, wenn er *in vivo* auch exprimiert wird, bietet es sich an, den Promotor des jeweils verwendeten Rezeptors zu verwenden. Damit wäre eine selektive

Überexpression des Rezeptors sichergestellt. Jedoch stellt dieser Versuchsaufbau einen hohen experimentellen Aufwand dar.

Zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Liganden auf tangential wandernde Zellen bieten sich Kollagenkokulturen an, da dadurch ein anziehender oder abstoßender Effekt eindeutig nachgewiesen werden kann. Zur näheren Untersuchung können diese Kulturen immunhistochemisch angefärbt werden.

Neben diesen Untersuchungen an den bereits bekannten für die tangentialen Wanderungen wichtigen Proteinen, ist eine Suche nach weiteren entscheidenden Proteinen ratsam. Die wandernden Zellen von der oberen rhombischen Lippe z.B. reagieren nicht auf die anziehende Wirkung einer Netrin-1 Quelle. Daher ist es wahrscheinlich, daß es einen oder mehrere andere anziehend wirkende Liganden für die tangentialen Wanderungen gibt. Für den Neogenin Rezeptor wurde in einer aktuellen Studie ein neuer Ligand vorgestellt (Rajagopalan et al., 2004), möglicherweise werden in Kürze auch weitere Liganden für die Rezeptoren DCC und Unc5H1-4 gefunden werden.

6 Zusammenfassung

Während der embryonalen Entwicklung des Gehirns der Maus erreichen neuronale Vorläuferzellen entweder über radiale oder tangential Wanderung ihre Zielgebiete. Bei der tangentialen Wanderung ziehen die Zellen entlang der pialen Oberfläche, wobei sie weite Strecken zurücklegen können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Mechanismen tangentialer Wanderungen im embryonalen Gehirn der Maus aufzuklären. Dabei wurden die Untersuchungen exemplarisch am posterioren extramuralen Wanderungsstrom (pes) des Rhombencephalons durchgeführt. Zur grundlegenden Untersuchung des pes stand die YT-P_{hPax6}-tTA-transgene Mäuselinie zur Verfügung, mit der eine gezielte GFP-Markierung der Pax6-positiven Zellen dieser Wanderung realisiert werden konnte. Mit Hilfe dieser transgenen Mäuselinie wurden Transplantations-, Kollagenkokulturrexperimente sowie Überexpressionsstudien am pes durchgeführt. Zusätzlich wurden Expressionstudien zur Identifizierung von Proteinen erstellt, die Einfluß auf die Wanderungen des Rhombencephalons nehmen könnten.

Über den Verlauf des pes konnte gezeigt werden, daß die Zellen nicht entlang von andersartig gebildeten Fortsätzen wandern. Zudem hat die homogen strukturierte Bodenplatte, vermutlich über Netrin-1, eine anziehende Wirkung auf die Zellen. Die anziehende Wirkung wird jedoch aufgehoben, sobald diese Zellen die Bodenplatte gekreuzt haben. Nach der Kreuzung wirkt entweder die Flügelplatte anziehend oder/und die Bodenplatte abstoßend auf die wandernden Zellen, so daß diese ihre kontralateralen Zielgebiete erreichen können. Ferner konnte für diese Wanderung der Unc5H3 Rezeptor als „dependence receptor“ bestätigt werden. Daneben kommt dem Rezeptor während des Einwanderns der Zellen in das Parenchym möglicherweise eine Funktion bei der Zielerkennung zu. Außerdem konnten EphA3, EphA7 und EphrinB1 als mögliche regulatorische Proteine der tangentialen Wanderungen des Rhombencephalons identifiziert werden.

Zusätzlich wurde erstmals ein direkter Vergleich der Expressionsmuster von Netrin-1 und seinen Rezeptoren DCC, Neogenin und Unc5H1-4 durchgeführt, der eine wahrscheinliche Aufgabe dieser Proteine nicht nur für die tangentialen Wanderungen im Rhombencephalon sondern auch für tangentiale und radiale Wanderungen im Telencephalon belegt. Durch diese Untersuchungen konnten erstmals grundlegende Mechanismen des pes geklärt, sowie Proteine, die in tangentialen Wanderungen involviert sind, identifiziert werden.

7 Anhang

7.1 Übersetzung der lateinischen Begriffe

| | | | |
|--------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| Bulbus olfactorius | Riechkolben | Oliva inferior | Olivenkern |
| Cerebellum | Kleinhirn | Pons | Brücke |
| Corpus mamillaria | Mamillarkörper | Prosencephalon | Vorderhirn |
| Cortex | Großhirnrinde | Rhombencephalon | Rautenhirn |
| Diencephalon | Zwischenhirn | Rhombische Lippe | Rautenlippe |
| Hippocampus | hippocampus= Seepferdchen | Stratum granulosum | Körnerzellschicht |
| Medulla spinalis | Rückenmark | Stratum moleculare | Molekularschicht |
| Mesencephalon | Mittelhirn | Stratum purkinjense | Purkinjezellschicht |
| Metencephalon | Hinterhirn | Telencephalon | Groß-/Endhirn |
| Myelencephalon | Nachhirn | | |
| Nervus opticus | Sehnerv | | |

7.2 Transplantationsversuche

Auflistung der Ergebnisse jedes einzelnen Versuchs

1. Den Bodenplattenbereich ausgeschnitten und verschoben

Anzahl der verwendeten tragenden Weibchen 12

Transplantationen

| | | |
|--|----|--------|
| Normale Wanderung | 12 | 63,20% |
| Zellen bleiben an Schnittstelle hängen | 3 | 15,80% |
| Zellen ändern Wanderungsrichtung wenig elektrop./schwach Fluoreszenz | 3 | 15,80% |
| | 1 | 5,30% |
| gesamt | 19 | 100% |

Kontrolle

| | | |
|---|----|--------|
| Normale Wanderung | 7 | 63,60% |
| wenig elektrop./schwach Fluoreszenz | 2 | 18,20% |
| Zellen bleiben an Schnittstelle hängen | 2 | 18,20% |
| gesamt | 11 | 100% |

2. Den Bodenplattenbereich ausgeschnitten und entfernt

Anzahl der verwendeten tragenden Weibchen 6

Transplantationen

| | | |
|---|----|------|
| normale Wanderung | 2 | 20% |
| Zellen sind orientierungslos, wandern aber | 6 | 60% |
| Zellen bleiben an Schnittstelle hängen | 2 | 20% |
| gesamt | 10 | 100% |

Kontrolle

| | | |
|--|---|--------|
| normale Wanderung | 5 | 71,40% |
| wenig elektrop./schwach Fluoreszenz | 2 | 28,60% |
| gesamt | 7 | 100% |

3. Bodenplatte senkrecht an Bodenplatte gelegt

Anzahl der verwendeten tragenden Weibchen 10

Transplantationen

| | | |
|--|----|------|
| Zellen wandern zur neuen Bodenplatte (senkrecht) | 12 | 80% |
| normale Wanderung | 3 | 20% |
| gesamt | 15 | 100% |

Kontrollen 0

4. Durch Bodenplatte geschnitten und den kontralateralen Bereich des Hirnstamms in Richtung Cerebellum verschoben

Anzahl der verwendeten tragenden Weibchen 15

Transplantationen

| | | |
|---|----|--------|
| Normale Wanderung wenig elektrop./schwach Fluoreszenz | 26 | 74,30% |
| Zellen bleiben an Schnittstelle hängen | 5 | 14,30% |
| | 4 | 11,40% |
| gesamt | 35 | 100% |

Kontrolle

| | | |
|---|----|--------|
| Normale Wanderung wenig elektrop./schwach Fluoreszenz | 18 | 81,80% |
| | 4 | 18,20% |
| gesamt | 22 | 100% |

7.3 Apoptoseversuch

Anzahl der Apoptosen pro definierten Bereich jeder rhombischen Lippe

| Elektroporiert mit | Einzelwerte | Mittelwerte | Standardabweichung |
|----------------------------|---------------------|-------------|--------------------|
| nicht elektroporiert | 3, 13, 14, 9, 10 | 9,8 | 4,32434966 |
| TE-Puffer und Fast Green | 15, 18, 7, 10, 13 | 12,6 | 4,27784993 |
| TREbi-EGFPm Vektor | 20, 16, 17, 21, 15 | 17,8 | 2,58843582 |
| Unc5H3+EGFPm Fusionsvektor | 50, 104, 59, 68, 99 | 76 | 21,6425507 |

8 Literaturverzeichnis

- Ackerman, S. L., Kozak, L. P., Przyborski, S. A., Rund, L. A., Boyer, B. B. & Knowles, B. B. (1997) The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature*, 386, 838-842.
- Alcantara, S., Ruiz, M., De Castro, F., Soriano, E. & Sotelo, C. (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development*, 127, 1359-1372.
- Altman, J. & Bayer, S. A. (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. II. Cytogenesis and histogenesis of the inferior olive, pontine gray, and the precerebellar reticular nuclei. *J.Comp Neurol.*, 179, 49-75.
- Altman, J. & Bayer, S. A. (1987) Development of the precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. *J.Comp Neurol.*, 257, 477-489.
- Altman, J. & Bayer, S. A. (1987) Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J.Comp Neurol.*, 257, 490-512.
- Altman, J. & Bayer, S. A. (1987) Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J.Comp Neurol.*, 257, 513-528.
- Altman, J. & Bayer, S. A. (1987) Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J.Comp Neurol.*, 257, 529-552.
- Anchan, R. M., Drake, D. P., Haines, C. F., Gerwe, E. A. & LaMantia, A. S. (1997) Disruption of local retinoid-mediated gene expression accompanies abnormal development in the mammalian olfactory pathway. *J.Comp Neurol.*, 379, 171-184.
- Bard, J. L., Kaufman, M. H., Dubreuil, C., Brune, R. M., Burger, A., Baldock, R. A. & Davidson, D. R. (1998) An internet-accessible database of mouse developmental anatomy based on a systematic nomenclature. *Mech.Dev.*, 74, 111-120.
- Benzing K. Transgene Mausmodelle zur Untersuchung von Nervenzellwanderungen. 2002. Dissertation
- Bergemann, A. D., Cheng, H. J., Brambilla, R., Klein, R. & Flanagan, J. G. (1995) ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Mol.Cell Biol.*, 15, 4921-4929.
- Birgbauer, E., Oster, S. F., Severin, C. G. & Sretavan, D. W. (2001) Retinal axon growth cones respond to EphB extracellular domains as inhibitory axon guidance cues. *Development*, 128, 3041-3048.

- Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M. & Sotelo, C. (1999) Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J.Neurosci.*, 19, 4407-4420.
- Boulder Committee (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat.Rec.*, 166, 257-261.
- Bourrat, F. & Sotelo, C. (1990) Migratory pathways and selective aggregation of the lateral reticular neurons in the rat embryo: a horseradish peroxidase in vitro study, with special reference to migration patterns of the precerebellar nuclei. *J.Comp Neurol.*, 294, 1-13.
- Bradke, F. & Dotti, C. G. (2000) Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 10, 574-581.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. & Kidd, T. (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, 96, 795-806.
- Brunjes, P. C., Fisher, M. & Grainger, R. (1998) The small-eye mutation results in abnormalities in the lateral cortical migratory stream. *Brain Res.Dev.Brain Res.*, 110, 121-125.
- Buchstaller, A., Kunz, S., Berger, P., Kunz, B., Ziegler, U., Rader, C. & Sonderegger, P. (1996) Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion. *J.Cell Biol.*, 135, 1593-1607.
- Burstyn-Cohen, T., Tzarfaty, V., Frumkin, A., Feinstein, Y., Stoeckli, E. & Klar, A. (1999) F-Spondin is required for accurate pathfinding of commissural axons at the floor plate. *Neuron*, 23, 233-246.
- Caric, D., Gooday, D., Hill, R. E., McConnell, S. K. & Price, D. J. (1997) Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development*, 124, 5087-5096.
- Causeret, F., Danne, F., Ezan, F., Sotelo, C. & Bloch-Gallego, E. (2002) Slit Antagonizes Netrin-1 Attractive Effects during the Migration of Inferior Olivary Neurons. *Dev.Biol.*, 246, 429-440.
- Causeret, F., Hidalgo-Sanchez, M., Fort, P., Backer, S., Popoff, M. R., Gauthier-Rouviere, C. & Bloch-Gallego, E. (2004) Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. *Development*, 131, 2841-2852.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. P. & Tessier-Lavigne, M. (2003) The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Axonal Chemoattractant that Collaborates with Netrin-1 in Midline Axon Guidance. *Cell*, 113, 11-23.
- Chi, N. & Epstein, J. A. (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.*, 18, 41-47.

- Chuang, S. E., Chen, A. L. & Chao, C. C. (1995) Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res.*, 23, 1641.
- Ciossek, T., Millauer, B. & Ullrich, A. (1995) Identification of alternatively spliced mRNAs encoding variants of MDK1, a novel receptor tyrosine kinase expressed in the murine nervous system. *Oncogene*, 10, 97-108.
- Conover, J. C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D. & Alvarez-Buylla, A. (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat.Neurosci.*, 3, 1091-1097.
- Corbin, J. G., Nery, S. & Fishell, G. (2001) Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat.Neurosci.*, 4, 1177-1182.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 33-38.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I. & Curran, T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374, 719-723.
- Davis, S., Gale, N. W., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M. & Yancopoulos, G. D. (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*, 266, 816-819.
- de Diego, I., Kyriakopoulou, K., Karagogeos, D. & Wassef, M. (2002) Multiple influences on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla. *Development*, 129, 297-306.
- Del Rio, J. A., Gonzalez-Billault, C., Urena, J. M., Jimenez, E. M., Barallobre, M. J., Pascual, M., Pujadas, L., Simo, S., La Torre, A., Wandosell, F., Avila, J. & Soriano, E. (2004) MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr.Biol.*, 14, 840-850.
- Dellovade, T. L., Pfaff, D. W. & Schwanzel-Fukuda, M. (1998) Olfactory bulb development is altered in small-eye (Sey) mice. *J.Comp Neurol.*, 402, 402-418.
- Drescher, U. (1997) The Eph family in the patterning of neural development. *Curr.Biol.*, 7, R799-R807.
- Ellenberger, C., Jr., Hanaway, J. & Netsky, M. G. (1969) Embryogenesis of the inferior olivary nucleus in the rat: a radioautographic study and a re-evaluation of the rhombic lip. *J.Comp Neurol.*, 137, 71-79.
- Ellis, J., Liu, Q., Breitman, M., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Tempest, H. V., Warren, S., Muir, E., Schilling, H. & . (1995) Embryo brain kinase: a novel gene of the eph/elk receptor tyrosine kinase family. *Mech.Dev.*, 52, 319-341.
- Engelkamp, D., Rashbass, P., Seawright, A. & van, H., V (1999) Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development*, 126, 3585-3596.

- Engelkamp, D. (2002) Cloning of three mouse *Unc5* genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech.Dev.*, 118, 191-197.
- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., Stoeckli, E. T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R. T., Gordon, J. I., Tessier-Lavigne, M. & Weinberg, R. A. (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*Dcc*) gene. *Nature*, 386, 796-804.
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G. & Kinzler, K. W. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247, 49-56.
- Feldheim, D. A., Kim, Y. I., Bergemann, A. D., Frisen, J., Barbacid, M. & Flanagan, J. G. (2000) Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron*, 25, 563-574.
- Flanagan, J. G. & Vanderhaeghen, P. (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu.Rev.Neurosci.*, 21, 309-345.
- Flenniken, A. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D. & Wilkinson, D. G. (1996) Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Dev.Biol.*, 179, 382-401.
- Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D. E. & Mehlen, P. (2001) The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98, 3416-3421.
- Friedman, G. C. & O'Leary, D. D. (1996) Eph receptor tyrosine kinases and their ligands in neural development. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 6, 127-133.
- Frisen, J., Yates, P. A., McLaughlin, T., Friedman, G. C., O'Leary, D. D. & Barbacid, M. (1998) Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, 20, 235-243.
- Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J. & Jessell, T. M. (1990) The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell*, 61, 157-170.
- Gad, J. M., Keeling, S. L., Wilks, A. F., Tan, S. S. & Cooper, H. M. (1997) The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Dev.Biol.*, 192, 258-273.
- Ganju, P., Shigemoto, K., Brennan, J., Entwistle, A. & Reith, A. D. (1994) The Eck receptor tyrosine kinase is implicated in pattern formation during gastrulation, hindbrain segmentation and limb development. *Oncogene*, 9, 1613-1624.
- Gao, P. P., Sun, C. H., Zhou, X. F., DiCicco-Bloom, E. & Zhou, R. (2000) Ephrins stimulate or inhibit neurite outgrowth and survival as a function of neuronal cell type. *J.Neurosci.Res.*, 60, 427-436.
- Gehring, W. J. (1996) The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells*, 1, 11-15.

- Gehring, W. J. & Ikeo, K. (1999) Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.*, 15, 371-377.
- Gilthorpe, J. D., Papantoniou, E. K., Chedotal, A., Lumsden, A. & Wingate, R. J. (2002) The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development*, 129, 4719-4728.
- Gloster, A., Wu, W., Speelman, A., Weiss, S., Causing, C., Pozniak, C., Reynolds, B., Chang, E., Toma, J. G. & Miller, F. D. (1994) The T alpha 1 alpha-tubulin promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J.Neurosci.*, 14, 7319-7330.
- Gloster, A., El Bizri, H., Bamji, S. X., Rogers, D. & Miller, F. D. (1999) Early induction of Talphal alpha-tubulin transcription in neurons of the developing nervous system. *J.Comp Neurol.*, 405, 45-60.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23, 175-182.
- Goldowitz, D., Hamre, K. M., Przyborski, S. A. & Ackerman, S. L. (2000) Granule cells and cerebellar boundaries: analysis of Unc5h3 mutant chimeras. *J.Neurosci.*, 20, 4129-4137.
- Goodhill, G. J. (1998) Mathematical guidance for axons. *Trends Neurosci.*, 21, 226-231.
- Gotz, M., Stoykova, A. & Gruss, P. (1998) Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*, 21, 1031-1044.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.*, 36, 59-74.
- Guthrie, S. & Lumsden, A. (1994) Collagen Gel coculture of Neural Tissue. *Neuroprotocols*, 4, 116-120.
- Harkmark, W. (1954) Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *J.Comp Neurol.*, 100, 115-209.
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G. & Hall, D. H. (1990) The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron*, 4, 61-85.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K. L., Hack, M. A., Chapouton, P., Barde, Y. A. & Gotz, M. (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat.Neurosci.*, 5, 308-315.
- Higashijima, S., Nose, A., Eguchi, G., Hotta, Y. & Okamoto, H. (1997) Mindin/F-spondin family: novel ECM proteins expressed in the zebrafish embryonic axis. *Dev.Biol.*, 192, 211-227.
- Himanen, J. P. & Nikolov, D. B. (2003) Eph receptors and ephrins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 35, 130-134.

- Hofmann, K. & Tschopp, J. (1995) The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Lett.*, 371, 321-323.
- Holder, N. & Klein, R. (1999) Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development*, 126, 2033-2044.
- Holland, S. J., Peles, E., Pawson, T. & Schlessinger, J. (1998) Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 8, 117-127.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M. & Stein, E. (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell*, 97, 927-941.
- Hu, H. (1999) Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron*, 23, 703-711.
- Imondi, R., Wideman, C. & Kaprielian, Z. (2000) Complementary expression of transmembrane ephrins and their receptors in the mouse spinal cord: a possible role in constraining the orientation of longitudinally projecting axons. *Development*, 127, 1397-1410.
- Imondi, R. & Kaprielian, Z. (2001) Commissural axon pathfinding on the contralateral side of the floor plate: a role for B-class ephrins in specifying the dorsoventral position of longitudinally projecting commissural axons. *Development*, 128, 4859-4871.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High-Efficiency Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- Irving, C., Nieto, M. A., DasGupta, R., Charnay, P. & Wilkinson, D. G. (1996) Progressive spatial restriction of Sek-1 and Krox-20 gene expression during hindbrain segmentation. *Dev.Biol.*, 173, 26-38.
- Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G. & Hedgecock, E. M. (1992) UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron*, 9, 873-881.
- Jen, J. C., Chan, W. M., Bosley, T. M., Wan, J., Carr, J. R., Rub, U., Shattuck, D., Salamon, G., Kudo, L. C., Ou, J., Lin, D. D., Salih, M. A., Kansu, T., Al Dhalaan, H., Al Zayed, Z., MacDonald, D. B., Stigsby, B., Plaitakis, A., Dretakis, E. K., Gottlob, I., Pieh, C., Traboulsi, E. I., Wang, Q., Wang, L., Andrews, C., Yamada, K., Demer, J. L., Karim, S., Alger, J. R., Geschwind, D. H., Deller, T., Sicotte, N. L., Nelson, S. F., Baloh, R. W. & Engle, E. C. (2004) Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science*, 304, 1509-1513.
- Jimenez, D., Lopez-Mascaraque, L., De Carlos, J. A. & Valverde, F. (2002) Further studies on cortical tangential migration in wild type and Pax-6 mutant mice. *J.Neurocytol.*, 31, 719-728.

- Jones, T. L., Karavanova, I., Chong, L., Zhou, R. P. & Daar, I. O. (1997) Identification of XLerk, an Eph family ligand regulated during mesoderm induction and neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Oncogene*, 14, 2159-2166.
- Karam, S. D., Burrows, R. C., Logan, C., Koblar, S., Pasquale, E. B. & Bothwell, M. (2000) Eph receptors and ephrins in the developing chick cerebellum: relationship to sagittal patterning and granule cell migration. *J.Neurosci.*, 20, 6488-6500.
- Kaufman & Bard (1999) The anatomical basis of mouse development. *Academic Press*
- Kawano, H., Fukuda, T., Kubo, K., Horie, M., Uyemura, K., Takeuchi, K., Osumi, N., Eto, K. & Kawamura, K. (1999) Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats. *J.Comp Neurol.*, 408, 147-160.
- Keeling, S. L., Gad, J. M. & Cooper, H. M. (1997) Mouse Neogenin, a DCC-like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis. *Oncogene*, 15, 691-700.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S., Culotti, J. G. & Tessier-Lavigne, M. (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell*, 87, 175-185.
- Keleman, K. & Dickson, B. J. (2001) Short- and long range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron*, 32, 605-617.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de, I. T., Jr. & Tessier-Lavigne, M. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*, 78, 425-435.
- Kilpatrick, T. J., Brown, A., Lai, C., Gassmann, M., Goulding, M. & Lemke, G. (1996) Expression of the Tyro4/Mek4/Cek4 gene specifically marks a subset of embryonic motor neurons and their muscle targets. *Mol.Cell Neurosci.*, 7, 62-74.
- Klambt, C., Jacobs, J. R. & Goodman, C. S. (1991) The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell*, 64, 801-815.
- Klar, A., Baldassare, M. & Jessell, T. M. (1992) F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell*, 69, 95-110.
- Krull, C. E., Lansford, R., Gale, N. W., Collazo, A., Marcelle, C., Yancopoulos, G. D., Fraser, S. E. & Bronner-Fraser, M. (1997) Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr.Biol.*, 7, 571-580.
- Kuramoto, T., Kuwamura, M. & Serikawa, T. (2004) Rat neurological mutations cerebellar vermis defect and hobble are caused by mutations in the netrin-1 receptor gene *Unc5h3*. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 122, 103-108.
- Kuwamura, M., Yoshida, T., Yamate, J., Kotani, T. & Sakuma, S. (1994) Hereditary cerebellar vermis defect in the Lewis rat. *Brain Res.Dev.Brain Res.*, 83, 294-298.

- Kyriakopoulou, K., de, D., I, Wassef, M. & Karagozeos, D. (2002) A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development*, 129, 287-296.
- Lambert, d. R. & Goffinet, A. M. (2001) Neuronal migration. *Mech.Dev.*, 105, 47-56.
- Lane, P. W., Bronson, R. T. & Spencer, C. A. (1992) Rostral cerebellar malformation, (rcm): a new recessive mutation on chromosome 3 of the mouse. *J.Hered.*, 83, 315-318.
- Lauffenburger, D. A. & Horwitz, A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-369.
- Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S. L. & Tessier-Lavigne, M. (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature*, 386, 833-838.
- Liebl, D. J., Morris, C. J., Henkemeyer, M. & Parada, L. F. (2003) mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J.Neurosci.Res.*, 71, 7-22.
- Livesey, F. J. & Hunt, S. P. (1997) Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol.Cell Neurosci.*, 8, 417-429.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E. & Mehlen, P. (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.*, 20, 2715-2722.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271, 978-981.
- Lumsden, A. & Keynes, R. (1989) Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature*, 337, 424-428.
- Lumsden, A. & Krumlauf, R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science*, 274, 1109-1115.
- Lumsden, A. (1999) Closing in on rhombomere boundaries. *Nat.Cell Biol.*, 1, E83-E85.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T. & Springer, T. A. (1998) Impaired B-lymphopoiesis, myeloopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 9448-9453.
- Manitt, C., Colicos, M. A., Thompson, K. M., Rousselle, E., Peterson, A. C. & Kennedy, T. E. (2001) Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. *J.Neurosci.*, 21, 3911-3922.
- Maricich, S. M., Gilmore, E. C. & Herrup, K. (2001) The role of tangential migration in the establishment of mammalian cortex. *Neuron*, 31, 175-178.
- Marillat, V., Sabatier, C., Failli, V., Matsunaga, E., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M. & Chedotal, A. (2004) The slit receptor rig-1/robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron*, 43, 69-79.

- Mastick, G. S., Davis, N. M., Andrew, G. L. & Easter, S. S., Jr. (1997) Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development*, 124, 1985-1997.
- Mastick, G. S. & Andrews, G. L. (2001) Pax6 regulates the identity of embryonic diencephalic neurons. *Mol. Cell Neurosci.*, 17, 190-207.
- Matsunaga, E., Araki, I. & Nakamura, H. (2000) Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development*, 127, 2357-2365.
- Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P. P., Mueller, B. K., Strittmatter, S. M., Mehlen, P. & Chedotal, A. (2004) RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat. Cell Biol.*, 6, 749-755.
- McConnell, S. K. (1991) The generation of neuronal diversity in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14, 269-300.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S. J., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S. & Bredesen, D. E. (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*, 395, 801-804.
- Mellitzer, G., Xu, Q. & Wilkinson, D. G. (2000) Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 400-408.
- Merz, D. C., Zheng, H., Killeen, M. T., Krizus, A. & Culotti, J. G. (2001) Multiple signaling mechanisms of the UNC-6/netrin receptors UNC-5 and UNC-40/DCC in vivo. *Genetics*, 158, 1071-1080.
- Ming, G., Wong, S., Henley, J., Yuan, X., Song, H., Spitzer, N. & Poo, M. (2002) Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature*, 417, 411-418.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. & Ogawa, M. (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*, 31, 727-741.
- Morris, N. R., Efimov, V. P. & Xiang, X. (1998) Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.*, 8, 467-470.
- Murase, S. & Horwitz, A. F. (2002) Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J. Neurosci.*, 22, 3568-3579.
- Nguyen-Ba-Charvet, K. T. & Chedotal, A. (2002) Role of Slit proteins in the vertebrate brain. *J. Physiol Paris*, 96, 91-98.
- O'Leary, D. D. & Wilkinson, D. G. (1999) Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9, 65-73.
- Orioli, D. & Klein, R. (1997) The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet.*, 13, 354-359.
- Pascual, M., Pozas, E., Barallobre, M. J., Tessier-Lavigne, M. & Soriano, E. (2004) Coordinated functions of Netrin-1 and Class 3 secreted Semaphorins in the guidance of reciprocal septohippocampal connections. *Mol. Cell Neurosci.*, 26, 24-33.

- Paxinos, G., Ashwell, K. W. S., Törk, I. (1994) Atlas of the developing rat nervous system. *Academic Press*
- Price, J., Turner, D. & Cepko, C. (1987) Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 84, 156-160.
- Przyborski, S. A., Knowles, B. B. & Ackerman, S. L. (1998) Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. *Development*, 125, 41-50.
- Püschel AW (1999) Divergent properties of mouse netrins. *Mech.Dev.*, 83, 65-75.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E. & Dickson, B. J. (2000) Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the Drosophila CNS. *Cell*, 103, 1033-1045.
- Rajagopalan, S., Deitinghoff, L., Davis, D., Conrad, S., Skutella, T., Chedotal, A., Mueller, B. K. & Strittmatter, S. M. (2004) Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat.Cell Biol.*, 1-7.
- Rakic, P. (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46, 882-891.
- Ramon y Cajal (1892) La retine des vertebres. *La Cellule*, 9, 119-258.
- Rathjen, F. G. & Schachner, M. (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.*, 3, 1-10.
- Richards, L. J., Koester, S. E., Tuttle, R. & O'Leary, D. D. (1997) Directed growth of early cortical axons is influenced by a chemoattractant released from an intermediate target. *J.Neurosci.*, 17, 2445-2458.
- Ridley, A. J. (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.*, 11, 471-477.
- Rogers, J. H., Ciossek, T., Menzel, P. & Pasquale, E. B. (1999) Eph receptors and ephrins demarcate cerebellar lobules before and during their formation. *Mech.Dev.*, 87, 119-128.
- Sabatier, C., Plump, A. S., Le, M., Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E. Y. & Tessier-Lavigne, M. (2004) The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell*, 117, 157-169.
- Sajjadi, F. G., Pasquale, E. B. & Subramani, S. (1991) Identification of a new eph-related receptor tyrosine kinase gene from mouse and chicken that is developmentally regulated and encodes at least two forms of the receptor. *New Biol.*, 3, 769-778.
- Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., van, H., V & Hastie, N. D. (1996) Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell*, 86, 71-82.

- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 5857-5864.
- Seaman, C. & Cooper, H. M. (2001) Netrin-3 protein is localized to the axons of motor, sensory, and sympathetic neurons. *Mech.Dev.*, 101, 245-248.
- Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C. & Tessier-Lavigne, M. (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*, 87, 1001-1014.
- Shimomura, O. & Johnson, F. H. (1975) Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 72, 1546-1549.
- Sidman, R. L. & Rakic, P. (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.*, 62, 1-35.
- Simpson, J. H., Kidd, T., Bland, K. S. & Goodman, C. S. (2000) Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron*, 28, 753-766.
- Stein, E. & Tessier-Lavigne, M. (2001) Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science*, 291, 1928-1938.
- Stein, E., Zou, Y., Poo, M. & Tessier-Lavigne, M. (2001) Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science*, 291, 1976-1982.
- Steup, A., Lohrum, M., Hamscho, N., Savaskan, N. E., Ninnemann, O., Nitsch, R., Fujisawa, H., Puschel, A. W. & Skutella, T. (2000) Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol.Cell Neurosci.*, 15, 141-155.
- Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C. & Gruss, P. (1996) Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. *Development*, 122, 3453-3465.
- Stoykova, A., Gotz, M., Gruss, P. & Price, J. (1997) Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development*, 124, 3765-3777.
- Stuckmann, I., Weigmann, A., Shevchenko, A., Mann, M. & Huttner, W. B. (2001) Ephrin B1 is expressed on neuroepithelial cells in correlation with neocortical neurogenesis. *J.Neurosci.*, 21, 2726-2737.
- Taniguchi, H., Tamada, A., Kennedy, T. E. & Murakami, F. (2002) Crossing the ventral midline causes neurons to change their response to floor plate and alar plate attractive cues during transmedian migration. *Dev.Biol.*, 249, 321-332.
- Tersar, K. Rig-1 Analyse des Expressionsmusters sowie der möglichen Beteiligung an neuronaler Zellwanderung und Morphogenese. 2003. Dissertation
- Theiler, K. (1972) The House Mouse: Development and Normal Stages from Fertilization to 4 weeks of Age. *Berlin: Springer-Verlag*.

- Thiebault, K., Mazelin, L., Pays, L., Llambi, F., Joly, M. O., Scoazec, J. Y., Saurin, J. C., Romeo, G. & Mehlen, P. (2003) The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 4173-4178.
- Thomas, J. B., Crews, S. T. & Goodman, C. S. (1988) Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the Drosophila nervous system. *Cell*, 52, 133-141.
- Trepel M. (1999) Neuroanatomie. *Verlag Urban & Fischer*.
- Uetsuki, T., Takagi, K., Sugiura, H. & Yoshikawa, K. (1996) Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J.Biol.Chem.*, 271, 918-924.
- van, H., V & Williamson, K. A. (2002) PAX6 in sensory development. *Hum.Mol.Genet.*, 11, 1161-1167.
- Vielmetter, J., Kayyem, J. F., Roman, J. M. & Dreyer, W. J. (1994) Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J.Cell Biol.*, 127, 2009-2020.
- Vielmetter, J., Chen, X. N., Miskevich, F., Lane, R. P., Yamakawa, K., Korenberg, J. R. & Dreyer, W. J. (1997) Molecular characterization of human neogenin, a DCC-related protein, and the mapping of its gene (NEO1) to chromosomal position 15q22.3-q23. *Genomics*, 41, 414-421.
- Vitalis, T., Cases, O., Engelkamp, D., Verney, C. & Price, D. J. (2000) Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *J.Neurosci.*, 20, 6501-6516.
- Wadsworth, W. G., Bhatt, H. & Hedgecock, E. M. (1996) Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron*, 16, 35-46.
- Wang, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. & Tessier-Lavigne, M. (1999) Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J.Neurosci.*, 19, 4938-4947.
- Warren, N. & Price, D. J. (1997) Roles of Pax-6 in murine diencephalic development. *Development*, 124, 1573-1582.
- Warren, N., Caric, D., Pratt, T., Clausen, J. A., Asavaritikrai, P., Mason, J. O., Hill, R. E. & Price, D. J. (1999) The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb.Cortex*, 9, 627-635.
- Williams, M. E., Strickland, P., Watanabe, K. & Hinck, L. (2003) UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J.Biol.Chem.*, 278, 17483-17490.
- Winslow, J. W., Moran, P., Valverde, J., Shih, A., Yuan, J. Q., Wong, S. C., Tsai, S. P., Goddard, A., Henzel, W. J. & Hefti, F. (1995) Cloning of AL-1, a ligand for an Eph

- related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron*, 14, 973-981.
- Xu, Q., Alldus, G., Holder, N. & Wilkinson, D. G. (1995) Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development*, 121, 4005-4016.
- Yamasaki, T., Kawaji, K., Ono, K., Bito, H., Hirano, T., Osumi, N. & Kengaku, M. (2001) Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development*, 128, 3133-3144.
- Yee, K. T., Simon, H. H., Tessier-Lavigne, M. & O'Leary, D. M. (1999) Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron*, 24, 607-622.
- Yin, Y., Sanes, J. R. & Miner, J. H. (2000) Identification and expression of mouse netrin-4. *Mech.Dev.*, 96, 115-119.
- Yokota, N., Mainprize, T. G., Taylor, M. D., Kohata, T., Loreto, M., Ueda, S., Dura, W., Grajkowska, W., Kuo, J. S. & Rutka, J. T. (2004) Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene*, 23, 3444-3453.
- Yokoyama, N., Romero, M. I., Cowan, C. A., Galvan, P., Helmbacher, F., Charnay, P., Parada, L. F. & Henkemeyer, M. (2001) Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline. *Neuron*, 29, 85-97.
- Zhong, Y., Takemoto, M., Fukuda, T., Hattori, Y., Murakami, F., Nakajima, D., Nakayama, M. & Yamamoto, N. (2004) Identification of the Genes that are Expressed in the Upper Layers of the Neocortex. *Cereb.Cortex*. Bisher nur online veröffentlicht.
- Zhou, R. (1998) The Eph family receptors and ligands. *Pharmacol.Ther.*, 77, 151-181.
- Zhou, X., Suh, J., Cerretti, D. P., Zhou, R. & DiCicco-Bloom, E. (2001) Ephrins stimulate neurite outgrowth during early cortical neurogenesis. *J.Neurosci.Res.*, 66, 1054-1063.
- Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J. Y. & Rao, Y. (1999) Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron*, 23, 473-485.
- Zhu, Y. & Guthrie, S. (2002) Expression of the ETS transcription factor ER81 in the developing chick and mouse hindbrain. *Dev.Dyn.*, 225, 365-368.
- Zhu, Y., Khan, K. & Guthrie, S. (2003) Signals from the cerebellum guide the pathfinding of inferior olivary axons. *Dev.Biol.*, 257, 233-248.
- Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W. W., Guy, J. & Muzyczka, N. (1996) A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J.Virol.*, 70, 4646-4654.

Mein Dank gilt....

... **Dieter Engelkamp**, meinem Betreuer am MPI für Hirnforschung, für ein immer spannender werdendes Thema, Tipps und Tricks im Labor, viel Geduld und ausgefallene Urlaubsgrüße.

... **Heinz Wässle**, Direktor der Abteilung Neuroanatomie, für das Interesse, die großzügige Unterstützung und die hartnäckigen Gespräche am Mittagstisch.

... **Thomas Holstein** und seinem Team für die universitäre Betreuung und hilfreichen Anregungen.

... **Gabi Lahner und Herr Prof. Zimmermann** für die Unterstützung durch das Graduiertenkolleg „Neuronale Plastizität“.

... **Gerlinde Heiss-Herzberger, Uschi Arbogast und Silke Zeissler** für die wertvolle technische Unterstützung bei molekularbiologischen Methoden, in der Zellkultur und bei der Mäusezucht.

... **der Bande aus dem 4. Stock** für Pausen, Unterhaltung, Tee, Schokolade, Feierabend-Äppler...

... **Andrea** für die kritische Korrektur und die gute „Mo-Fr-Betreuung“ meines Liebsten

... **Jörg** für seinen motivierenden Zuspruch und seine Beharrlichkeit

Lebenslauf

Stefanie Flunkert

geboren am 26. Dezember 1975 in Recklinghausen
ledig

Schulbesuch

in Recklinghausen: 1982-1995
Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife: Juni 1995;
Gymnasium Petrinum zu Recklinghausen

Studium Biologie (Diplom): Oktober 1995- Juni 2001, Universität Bielefeld

Diplomarbeit „Zur Frage eines bleibenden Einflusses von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) auf die Mitoserate im Hippocampus der Maus“ in der Abteilung Neuroanatomie (Leitung: Prof. Dr. Dr. Gertraud Teuchert-Noodt): September 2000 – Juni 2001;
Diplomprüfungen in den Fächern: Neurobiologie (Hauptfach), Tierphysiologie, Verhaltensforschung und Physiologische Psychologie

Promotion zum Dr. rer. nat.: 2001-2004; Technische Universität Darmstadt

Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main, in der Abteilung Neuroanatomie (Direktor: Prof. Dr. Heinz Wässle) unter Anleitung von Dr. Dieter Engelkamp

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu habe.

Frankfurt, 07.09.2004

Stefanie Flunkert