

**Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors
Uncx4.1 im murinen Mittelhirn**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

Vorgelegt von

Tamara Irmgard Rabe

aus Oldenburg

Göttingen Juni 2011

Referent: Prof. Dr. Ernst A. Wimmer
Koreferent: Prof. Dr. Ahmed Mansouri

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Embryogenese der Maus	1
1.2	Entwicklung des zentralen Nervensystems von Vertebraten	2
1.3	Die Entwicklung des Mittelhirns in Vertebraten und die Bedeutung des Isthmus'	3
1.3.1	Molekulare Mechanismen der Mittelhirnentwicklung	4
1.3.2	Morphologische Strukturen des murinen Mittelhirns	7
1.4	Die neuronalen Subpopulationen des murinen Mittelhirns	9
1.4.1	Entwicklung der dopaminergen Neuronen des ventralen Mittelhirns	10
1.4.2	Entwicklung der serotonergen Neuronen im Hinterhirn	16
1.4.3	Entwicklung der GABAergen Neuronen im murinen Mittelhirn	17
1.4.4	Entwicklung der glutamatergen Neuronen im murinen Mittelhirn	19
1.4.5	Verschiedene Marker der neuronalen Subpopulationen des murinen Mittelhirns	20
1.5	Der Transkriptionsfaktor <i>Uncx4.1</i>	21
1.5.1	Das Expressionsmuster von <i>Uncx4.1</i> in Vertebraten	22
1.5.2	Die Funktion von <i>Uncx4.1</i> während der Embryonalentwicklung	23
1.6	Das Cre-LoxP System	24
1.7	Zielsetzung	26
2	Ergebnisse	28
2.1	Expressionsanalyse von <i>Uncx4.1</i> im embryonalen Mittelhirn der Maus	28
2.1.1	<i>Uncx4.1</i> ist in der Mantelzone des Mittelhirns exprimiert	28
2.1.2	<i>Uncx4.1</i> ist in allen neuronalen Subtypen des embryonalen Mittelhirns exprimiert	29
2.2	Untersuchungen zur Funktion von <i>Uncx4.1</i> während der Entwicklung dopaminergener Neuronen im Mittelhirn	33
2.2.1	Der Verlust von <i>Uncx4.1</i> führt zu einer Reduzierung dopaminergener Neuronen im ventralen Mittelhirn	33
2.2.2	In Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> ist keine vermehrte Apoptose im Mittelhirn detektierbar	36

2.2.3	Die Proliferation und Differenzierung des neuronalen Gewebes ist im Mittelhirn <i>Uncx4.1</i> -defizienter Mausembryonen nicht gestört	37
2.2.4	Die Positionierung dopaminerger und serotonerger Neuronen an der MHG ist in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> nicht beeinträchtigt	38
2.2.5	Expressionsanalyse von <i>Lmx1a</i> , <i>Foxa2</i> , <i>Ngn2</i> , <i>Nurr1</i> und <i>Mash1</i> im ventralen Mittelhirn von <i>Uncx4.1</i> ^{-/-} Embryonen	40
2.2.6	Die Expression von <i>Uncx4.1</i> im Mittelhirn <i>Lmx1a</i> -defizienter Embryonen	44
2.2.7	Die Expression von <i>Uncx4.1</i> im Mittelhirn <i>Ngn2</i> -defizienter Embryonen	45
2.2.8	Analyse der β -Catenin Expression im ventralen Mittelhirn <i>Uncx4.1</i> -defizienter Embryonen	46
2.2.9	Die Analyse dopaminerger Neuronen in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> mit Hilfe einer konditionalen Knockoutlinie	47
2.3	Untersuchungen zur Funktion von <i>Uncx4.1</i> während der Entwicklung GABAerger Neuronen im embryonalen Mittelhirn	53
2.4	Untersuchungen zur Funktion von <i>Uncx4.1</i> während der Entwicklung glutamaterger Neuronen im embryonalen Mittelhirn	55
2.4.1	Die Inaktivierung von <i>Uncx4.1</i> hat Einfluss auf bestimmte Subtypen der glutamatergen Neuronen im Mittelhirn	55
2.4.2	Die Anzahl Pax6-positiver Zellen des ventralen Mittelhirns ist in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> ab E13.5 erhöht	58
2.4.3	<i>Uncx4.1</i> und <i>Ngn2</i> sind in <i>Pax6</i> -defizienten Mäusen normal exprimiert	59
2.5	Protein-Interaktionsstudien von <i>Uncx4.1</i> mit <i>Ngn2</i> und <i>Pax6</i>	61
2.5.1	<i>In-vitro</i> Analyse der potentiellen Interaktion von <i>Uncx4.1</i> , <i>Ngn2</i> und <i>Pax6</i> in HeLa und Hek293T Zellen	61
2.5.2	<i>Ngn2</i> und <i>Pax6</i> interagieren auf Protein-Protein Ebene miteinander . .	62
2.6	Analyse der Pax6-positiven Zellen in <i>Ngn2</i> -defizienten Mäusen	63
2.7	Analyse der Oligodendrozyten in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i>	64
2.8	Untersuchungen der Axone in <i>Uncx4.1</i> ^{-/-} -Mausembryonen	66
2.8.1	Die Level der synaptischen Proteine sind nicht in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> unverändert	66
2.8.2	Die Axone der Colliculi superiores sind in <i>Uncx4.1</i> -Nullmutanten verändert	68

2.8.3	Die Inaktivierung von <i>Uncx4.1</i> führt zu verkürzten Axonen und einer verringerten Anzahl axonaler Auswüchse	71
3	Diskussion	74
3.1	<i>Uncx4.1</i> ist in postmitotischen Neuronen des Mittelhirns exprimiert	75
3.2	Die Funktion von <i>Uncx4.1</i> während der Entwicklung dopaminerger Neuronen im Mittelhirn	76
3.3	<i>Uncx4.1</i> spielt keine Rolle während der Entwicklung der GABAergen Neuronen im embryonalen Mittelhirn der Maus	80
3.4	Die Funktion von <i>Uncx4.1</i> während der Entwicklung der glutamatergen Neuronen des Mittelhirns	82
3.5	Potentielle Rolle von <i>Uncx4.1</i> während der Gliogenese	85
3.6	Potentielle Rolle von <i>Uncx4.1</i> bei der Bildung der Axone in den Colliculi superiores	85
4	Zusammenfassung	89
5	Material und Methoden	91
5.1	Molekularbiologische Methoden	91
5.1.1	Extraktion genomischer DNA aus Gewebeproben	91
5.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	91
5.1.3	Ethanolpräzipitation von DNA	92
5.1.4	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	92
5.1.5	Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA	93
5.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	93
5.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	95
5.1.8	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	95
5.1.9	Aufreinigung von PCR-Produkten	95
5.1.10	Restriktionsverdau von DNA	96
5.1.11	DNA-Ligation	96
5.1.12	Sequenzierungen	97
5.1.13	Herstellung kalzium-kompetenter Zellen	97
5.1.14	Transformation von DNA in kalzium-kompetente Zellen	98

5.1.15	Herstellung von Glycerolstocks	98
5.1.16	Aufreinigung von total RNA aus Hefe	98
5.1.17	Herstellung DIG und Fluorescein markierter Proben	99
5.2	Tierexperimentelle Methoden	100
5.2.1	Tiere	100
5.2.2	Generierung konditionaler <i>Uncx4.1</i> Mausmutanten	100
5.2.3	Tamoxifenverabreichung	101
5.2.4	BrdU-Injektion	102
5.3	Histologische Methoden	103
5.3.1	Präparation von Embryonen und adulten Gehirnen	103
5.3.2	Einbetten in Kryomatrix	103
5.3.3	Einbetten in Paraffin	104
5.3.4	Einbetten in 2% „Low Melting Point“ Agarose	104
5.3.5	Anfertigung von Gewebeschnitten	105
5.3.6	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (IHC) auf Gewebeschnitten	105
5.3.7	BrdU-Färbung	106
5.3.8	LacZ Färbung ganzer Embryonen	108
5.3.9	LacZ Färbung von Kryoschnitten	108
5.3.10	TUNEL-Methode	109
5.3.11	Golgi-Färbung	109
5.3.12	DiI-Färbung	110
5.3.13	Detektion von mRNA mittels <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH) auf Gewe- beschnitten	110
5.3.14	Statistische Analyse	112
5.4	Zellbiologische Methoden	113
5.4.1	Zelllinien	113
5.4.2	Transiente Transfektion	113
5.4.3	Indirekte Immunfluoreszenz auf Zellen (ICC)	114
5.5	Proteinbiochemische Methoden	114
5.5.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Gewebe	114
5.5.2	Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Zellen	115
5.5.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	115

5.5.4	Co-Immunopräzipitation	115
5.5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	116
5.5.6	Western Blotting	116
Literaturverzeichnis		XVI
6	Danksagung	XXXVI
7	Curriculum vitae	XXXVIII

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung der Keimblätter in der Entwicklung von Vertebraten.	2
2	Schematische Darstellung der frühen Gehirnentwicklung in Vertebraten.	3
3	Schematische Darstellung der Expressionsdomänen verschiedener Signalmoleküle der MHG	6
4	Schematische Darstellung der morphologischen Strukturen und Kerngebiete des Mittelhirns	8
5	Schematische Darstellung der neuronalen Populationen im embryonalen Mittelhirn	10
6	Dopaminerge Neuronen des Mittelhirns und ihre Entwicklung	11
7	Marker der verschiedenen neuronalen Populationen im Mittelhirn von Mausembryonen	21
8	Schematische Darstellung des <i>Uncx4.1</i> -Proteins und seiner Domänen	22
9	Expression von <i>Uncx4.1</i> im Mittelhirn der Maus.	29
10	ISH von <i>Uncx4.1</i> -mRNA und verschiedener neuronaler Marker an E11.5 und E12.5 Wildtyp-Gehirnen.	30
11	<i>Uncx4.1</i> ist in dopaminergen, glutamatergen und GABAergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert	32
12	Die Expression von TH ist in <i>Uncx4.1</i> homozygoten Embryonen reduziert . . .	34
13	Die Anzahl dopaminerger Neuronen des ventralen Mittelhirns ist in <i>Uncx4.1</i> -defizienten Embryonen reduziert	35
14	Der Funktionsverlust von <i>Uncx4.1</i> hat keinen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Zellen im ventralen Mittelhirn	36
15	Weder die Proliferation noch die Differenzierung der Neuronen im Mittelhirn ist in der Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> beeinflusst	37
16	Dopaminerge und serotonerge Neuronen weisen in <i>Uncx4.1</i> ^{-/-} Embryonen unveränderte Expressionsdomänen an der MHG auf.	39
17	Analyse neuronaler Marker, die während der Bildung der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns beteiligt sind	41
18	Die Anzahl Nurr1-positiver Neuronen ist während der Entwicklung in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> gleichbleibend	43

19	Uncx4.1-positive Zellen in <i>Lmx1a</i> -defizienten Mäusen	44
20	<i>Ngn2</i> -defiziente Neuronen der ventralen Mittellinie weisen keine Uncx4.1-Expression auf	45
21	Analyse der β -Catenin Expression in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i>	46
22	Cmv-Cre; <i>Uncx4.1</i> ^{fl/-} Embryonen exprimieren kein Uncx4.1 im Mittelhirn der Maus	47
23	Der Expressionsverlust von Uncx4.1 in Cre-ER; <i>Uncx4.1</i> ^{fl/-} Mäusen im Mittelhirn	48
24	Analyse von Markern dopaminerger Neuronen des Mittelhirns auf coronalen Gewebeschnitten adulter Cre-ER; <i>Uncx4.1</i> ^{fl/-} Mäuse	50
25	<i>Foxa2</i> -Cre; <i>Uncx4.1</i> ^{fl/-} Mausmutanten zeigen einen Verlust der Uncx4.1-Expression im ventralen Mittelhirn.	51
26	Analyse von Markern dopaminerger Neuronen des Mittelhirns auf coronalen Gewebeschnitten adulter <i>Foxa2</i> -Cre; <i>Uncx4.1</i> ^{fl/-} Mäuse	52
27	GABAerge Neuronen sind in <i>Uncx4.1</i> -defizienten Embryonen normal entwickelt.	54
28	Analyse glutamaterger Marker in <i>Uncx4.1</i> -defizienten und Kontrollembryonen	56
29	Die Anzahl der Isl1-positiven Oculomotorneuronen ist in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> unverändert	57
30	Die Anzahl Pax6-positiver Zellen ist in Abwesenheit von <i>Uncx4.1</i> ab E13.5 erhöht	59
31	Die Expression von <i>Uncx4.1</i> und <i>Ngn2</i> ist in Abwesenheit von <i>Pax6</i> unverändert	60
32	Immunfärbung der transfizierten Zellen	62
33	<i>Ngn2</i> und <i>Pax6</i> zeigen Protein-Protein Interaktion.	63
34	Die Anzahl Pax6-positiver Zellen ist in <i>Ngn2</i> -defizienten Mausembryonen im Vergleich zum WT nicht verändert	64
35	Die Expression von GFAP ist im Mittelhirn adulter Cre-ER; <i>Uncx4.1</i> ^{fl/-} Mäuse .	65
36	Die Level verschiedener vesikulärer und nicht vesikulärer postsynaptischer Proteine sind in <i>Uncx4.1</i> ^{-/-} -Embryonen unverändert.	67
37	Die Inaktivierung von <i>Uncx4.1</i> führt zu einer Kompensation der Synapsin I+II Expression in den Colliculi superiores	69
38	Die Inaktivierung von <i>Uncx4.1</i> führt zu einer Veränderung der Calbindin Expression in den Colliculi superiores	70
39	DiI Färbung der Neuronen im dorsalen Mittelhirn an E16.5 und E18.5	72

40	<i>Uncx4.1</i> -Nullembryonen zeigen morphologische Veränderungen der Neuronen im Mittelhirn	73
41	Verpaarungs-Strategie konditionaler <i>Uncx4.1</i> Mausmutanten.	101
42	Zeitliche Übersicht der Tamoxifenverabreichung	102

Tabellenverzeichnis

1	Zusammenfassung der Veränderung dopaminergener Neuronen im ventralen Mittelhirn <i>Uncx4.1</i> -defizienter Embryonen.	77
2	Zusammenfassung der Veränderung GABAerger Marker im ventralen Mittelhirn <i>Uncx4.1</i> -defizienter Embryonen.	81
3	Zusammenfassung der Veränderung spezifischer Marker glutamaterger Neuronen im Mittelhirn <i>Uncx4.1</i> -defizienter Embryonen.	83
4	Zusammensetzung des Lysispuffer	91
5	Zusammensetzung des LB-Mediums	92
6	Zusammensetzung des TE-Puffers	92
7	Zusammensetzung einer PCR-Reaktion	93
8	Verwendete Primersequenzen.	94
9	Standard-PCR Programm	94
10	10x TBE Puffer	95
11	Liste der verwendeten Plasmide	97
12	Ansatz zur Herstellung von DIG oder Fluorescein markierter RNA-Sonden	99
13	Liste der verwendeten Mauslinien	100
14	Dauer der PFA-Fixierung für das Einbetten in Kryomatrix	103
15	20x PBS	104
16	Aufbereitung des Gewebes für die Paraffineinbettung	104
17	Übersicht über die Schritte der IHC	106
18	Verwendete Antikörper	107
19	Zusammensetzung der Fix A Fixierlösung für die LaZ-Färbung	108
20	Zusammensetzung der LacZ-Färbelösung	108
21	LacZ-Fixierungslösung für Kryoschnitte	109
22	Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers	111
23	KTBT Zusammensetzung	111
24	NTMT Zusammensetzung	112
25	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE	116

Abkürzungsverzeichnis

μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
+/?	heterozygot für das Knockout-Allel oder Wildtyp
-/-	homozygot für das Knockout-Allel
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Abb.	Abbildung
AP	Alarplatte
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	„ <i>Bicinchoninic acid</i> “
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bHLH	„ <i>basic helix-loop-helix</i> “
Bo	Bulbus olfactorius
BP	Basalplatte
BrdU	5'-Brom-2'-deoxyuridin
Brn3a	„ <i>Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A</i> “
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	Circa
Cb	Cerebellum
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
d.h.	das heisst

DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DAT	„ <i>dopamine transporter</i> “
DEPC	Dimethylsulfid
dest.	destilliert
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Di	Diencephalon
Dig	Digoxigenin-11-UTP
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DP	Deckplatte
dTT	Dithiothreitol
E	Embryonalstadium oder Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
en	„ <i>engrailed</i> “
engl.	englisch
et al.	und andere
etc.	und so weiter
EtOH	Ethanol
FCS	fatales Kälberserum
FGF	„ <i>fibroblast growth factor</i> “
fl	gefloxt

Foxa2	„Forkhead box A 2“
FR	Formatio reticularis
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABAerge Neuronen	Neuronen, deren Neurotransmitter die γ -Aminobuttersäure ist
Gbx2	„Gastrulation and brain-specific homeobox protein 2“
GP	Bodenplatte
HCl	Salzsäure
HH	Hinterhirn
Hox	Homöobox
IF	Colliculi inferiores
IHC	Immunohistochemie
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
Lmx	„Lim homeodomain transcription factor“
loxP	„locus of crossing over in P1“
mA	Milliampere
Mash1	„Achaete-scute complex-like 1“
max.	maximal
mDA Neuronen	Mittelhirn dopaminerge Neurone, dopaminerge Neurone des Mittelhirns
MH	Mittelhirn
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	„messenger ribonucleic acid“

Msx1	„ <i>msh homeobox homolog 1</i> “
MZ	Mantelzone
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBTC	„ <i>Nitro blue tetrazolium chloride</i> “
Ngn2	„ <i>Neurogenin 2</i> “
NGS	Ziegenserum
NGS	normales Ziegenserum
Nurr1	„ <i>Nuclear receptor related 1 protein</i> “
OD	Optische Dichte
Otx2	„ <i>orthodenticle homolog 2</i> “
P	postnatales Stadium
PAG	Substantia grisea periaquaeductalis
Pax6	„ <i>Paired box gene 6</i> “
PBS	„ <i>phosphat bufferd saline</i> “
PBT	„ <i>phosphat bufferd saline</i> “ mit 0,1 % Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pitx3	„ <i>Paired-like homeodomain transcription factor 3</i> “
r1-r4	Rhombomer 1-4
rab3a	ras-related protein 3a
RM	Rückenmark
RN	Nucleus ruber

RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SC	Colliculi superiores
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Shh	„ <i>sonic hedgehog</i> “
SN	Substantia Nigra
Synbrev	Synaptobrevin
Syntag	Syntagmin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tectum
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylenediamin
Tg	Tegmentum
TH	Tyrosinhydroxylase
Tuj1	neuronales Klasse III β -Tubulin
TUNEL	„ <i>Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> “
v/v	Volumen/ Volumen
VACht	vesikulärer Acetylcholintransporter
VH	Vorderhirn
Vmat2	„ <i>vesicular monoamine transporter 2</i> “
vMH	ventrales Mittelhirn

VTA ventrales tegmentales Areal

VZ ventrikuläre Zone

WB Western Blot

Wnt „*wingless-type MMTV integration site family, member 1*“

WT Wildtyp

ZNS zentrales Nervensystem

°C Grad Celsius

1 Einleitung

Die Entwicklung des Gehirns in seiner Komplexität unterliegt verschiedenen Vorgängen, wie Zellteilung, Induktion, Musterbildung, Differenzierung, Migration und vielen Weiteren. Morbus Parkinson ist die wohl bekannteste neurologische Krankheit die mit dem Mittelhirn assoziiert wird. Sie ist auf das Absterben dopaminergener Neuronen im ventralen Mittelhirn zurückzuführen. Für die erfolgreiche Behandlung dieser Krankheit ist es notwendig zu verstehen, welche genetischen und molekularbiologischen Faktoren an ihrer Entstehung beteiligt sind.

1.1 Embryogenese der Maus

Der Organismus und somit auch das Mittelhirn, entwickelt sich aus einer einzigen Zelle. Die gesamte Dauer der Embryogenese der Maus beträgt zwischen 18 und 20 Tagen, welche als Embryonalstadium oder Embryonaltag 18 (E18) und 20 (E20) bezeichnet werden. Nach der Befruchtung der Eizelle führen frühe Zellteilungen 3.5 Tage nach der Befruchtung (E3.5) zur Bildung der so genannten Blastocyste. Die Blastocyste besteht aus der inneren Zellmasse (engl. „*inner cell mass*“) und dem Trophektoderm. Während aus der inneren Zellmasse später der Embryo hervorgehen wird, bildet sich aus dem Trophektoderm extraembryonales Gewebe, wie die Plazenta. Circa vier Tage nach der Befruchtung (E4) folgt die Implantation des Gewebes in die Gebärmutter, ehe die Gastrulation mit Bildung des Primitivstreifens (engl. „*primitive streak*“) an E6 einsetzt. Während der Gastrulation werden die Körperachsen festgelegt und es entwickeln sich drei Keimblätter (engl. „*germ layers*“): Das Endoderm, das Mesoderm und das Ektoderm (Abb. 1). Aus dem Endoderm geht später der Verdauungstrakt, die Leber, das Pankreas, sowie der Atmungstrakt hervor, während sich aus dem Mesoderm die Chorda dorsalis (engl. „*Notochord*“), Muskeln, das Herz und die Niere bilden. Das Ektoderm differenziert sich schließlich in Hautgewebe und das Nervensystem. Nach 18-20 Tagen ist die Embryogenese abgeschlossen und es folgt die Geburt (Gilbert, 2006; Rossant & Tam, 2009; Wolpert et al., 2011).

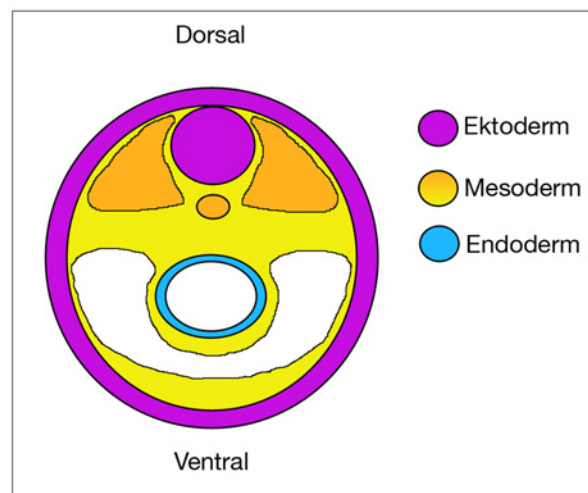


Abb. 1: Schematische Darstellung der Keimblätter in der Entwicklung von Vertebraten. Aus dem Endoderm (hellblau) geht der Verdauungstrakt, die Leber, sowie die Lunge hervor, während sich aus dem Mesoderm (gelb/orange) das Skelett, die Muskeln, die Niere und das kardiovaskuläre System entwickelt. Das Ektoderm (lila) differenziert sich in Hautgewebe und das Nervensystem. Modifiziert nach (Wolpert et al., 2011).

1.2 Entwicklung des zentralen Nervensystems von Vertebraten

Das zentrale Nervensystem (ZNS) geht aus dem Ektoderm hervor (Kap. 1.1). Seine Entstehung beginnt mit der neuralen Induktion. Hierfür sind verschiedene Signalzentren, wie z.B. der „*Hensens's node*“ im Huhn von Bedeutung. In der Mausentwicklung ist neben dem Knoten (engl. „*node*“, ein Äquivalent zum „*Hensens's node*“) noch das anteriore, viscerale Endoderm (engl. „*anterior visceral endoderm*“) notwendig um die Bildung der rostral gelegenen Strukturen des Neuralrohres (Vorder-, Mittel- und Hinterhirn) einzuleiten. Während der Neurulation bildet sich zunächst aus dem dorsalen Bereich des Embryos die Neuralplatte, ehe sich aus Teilen der Neuralplatte das Neuralrohr formiert. Das Neuralrohr kann als Vorläufer des ZNS angesehen werden und gliedert sich in Vorder-, Mittel- und Hinterhirn, sowie Rückenmark (Abb. 2, A). An der Regionalisierung des Neuralrohres in die einzelnen Bereiche des ZNS sind neben Transkriptionsfaktoren verschiedene Signalwege von entscheidender Bedeutung (Gilbert, 2006; Wolpert et al., 2011). In der weiteren Entwicklung entstehen aus den drei rostral gelegenen Gehirnvesikeln fünf Gehirnvesikel. Dabei entsteht aus dem Prosencephalon (Vorderhirn) das Telencephalon und das Diencephalon, während aus dem Rhombencephalon (Hinterhirn) das Meten- und Myelencephalon hervorgehen (Abb. 2, B). Einzig das Mesencephalon (Mittelhirn) bleibt als eine Struktur erhalten (Sanes et al., 2006). Zur Etablierung der dorso-ventralen Achse tragen Signalmoleküle bei, die von der ventral gelegenen Chorda dorsalis, sowie der dorsal gelegenen Epidermis sekretiert werden. Hierzu gehören unter anderem BMP4 (engl. „*Bone*

morphogenetic protein 4“) und BMP7 (engl. „Bone morphogenetic protein 7“, (Lee & Jessell, 1999), sowie Shh (engl. „Sonic Hedgehog“, (Echelard et al., 1993)). Das Ergebnis der dorso-ventralen Musterbildung ist das Entstehen der Boden-, Basal-, Alar- und Deckplatte (Chizhikov & Millen, 2005).

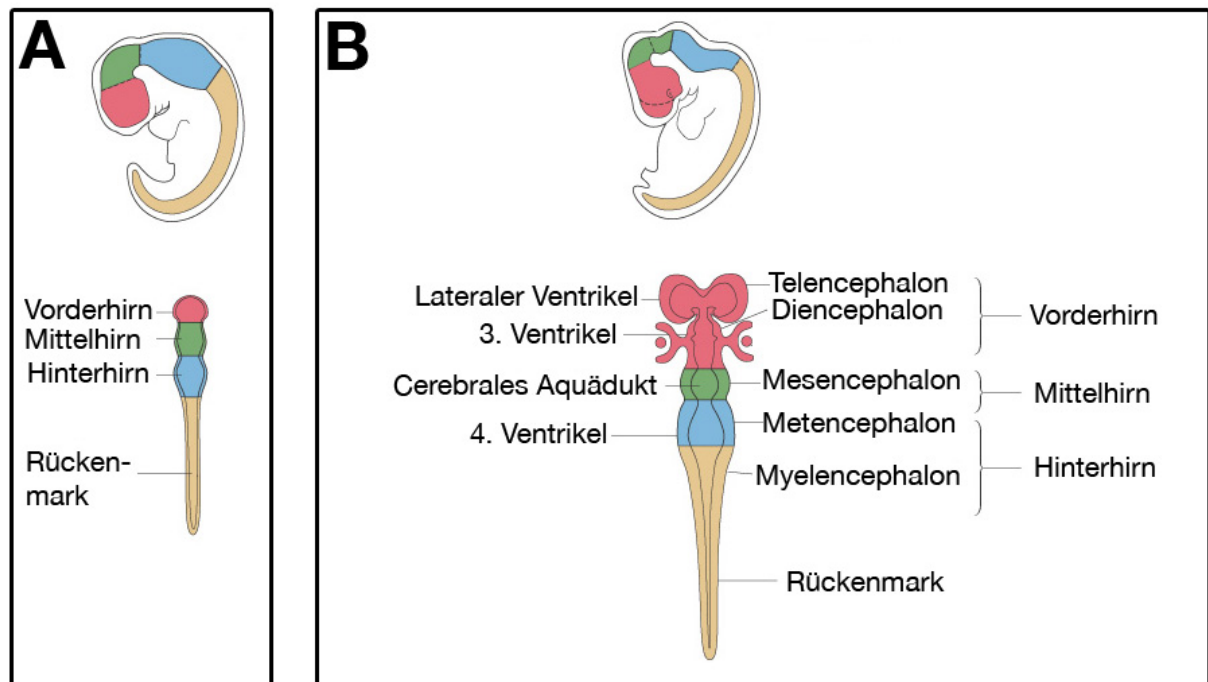


Abb. 2: Schematische Darstellung der frühen Gehirnentwicklung in Vertebraten. Zunächst ist das zentrale Nervensystem in Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn und Rückenmark gegliedert (A). In der weiteren Entwicklung differenziert sich das Vorderhirn in Telencephalon und Diencephalon, während sich das Hinterhirn in Metencephalon und Myelencephalon gliedert (B). Rot markiert den Bereich des Vorderhirns, grün den des Mittelhirns, blau das Hinterhirn (in A) bzw. das Metencephalon (in B). Braun markiert das Rückenmark (in A) bzw. das Myelencephalon und das Rückenmark (in B). Modifiziert nach (Sanes et al., 2006).

1.3 Die Entwicklung des Mittelhirns in Vertebraten und die Bedeutung des Isthmus'

In der Entwicklung des Nervensystems spielen Signalzentren, wie der „Hensens' node“ im Huhn oder der Spemann-Organisator im Frosch eine wichtige Rolle. Während der Entwicklung des Mittelhirns von Vertebraten ist ebenfalls ein solches Signalzentrum von besonderer Bedeutung. So konnte in der Vergangenheit mit Hilfe von Transplantationsstudien gezeigt werden, dass diencephales Gewebe, wenn es ins Mittelhirn transplantiert wird, ein mesencephales Schicksal annimmt (Nakamura et al., 1986; H. Nakamura et al., 1991). Im Gegensatz dazu behält mesencephales Gewebe sein Schicksal bei, wenn es in das Vorderhirn transplantiert

wird (Martinez et al., 1991). Verantwortlich hierfür ist das Signalzentrum der Mittel-Hinterhirn-Grenze (MHG): der Isthmus (Martinez et al., 1991; Bally-Cuif et al., 1992; Bally-Cuif & Wassef, 1994). Der Isthmus ist somit hinreichend für die Induktion eines mesencephalen Schicksals. Ein Verlust des Isthmus' führt allerdings auch zu einer Deletion des Mesen- und Metencephalons. Dies macht deutlich, dass der Isthmus nicht nur hinreichend, sondern notwendig für die Entwicklung des Mittelhirns und des Cerebellums ist (Nieuwkoop, 1991). Im Folgenden wird eine Auswahl einiger wichtiger Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle vorgestellt, die eine Rolle während der Entwicklung des Isthmus' spielen.

1.3.1 Molekulare Mechanismen der Mittelhirnentwicklung

Mehrere Studien der vergangenen Jahre haben verschiedene Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle identifizieren können, die wichtige Funktionen während der Mittelhirnentwicklung übernehmen. So sind u.a. *Otx2*, *Gbx2*, *engrailed1/2 (en1/2)*, *wnt1*, *Fgf8* und *Lmx1b* von zentraler Bedeutung.

Bereits früh in der Entwicklung (E7.5) spielen die beiden Transkriptionsfaktoren *Otx2* (engl. „orthodenticle homologue 2“) und *Gbx2* (engl. „gastrulation brain homeobox 2“) eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Mittel- bzw. Hinterhirns und sind wichtig für die korrekte Positionierung des Isthmus'. Nach der neuralen Induktion ist *Otx2* im anterioren Bereich des Neuroektoderms exprimiert, während *Gbx2* posterior exprimiert ist (Abb. 3, A). In dem Bereich, in dem die Expressionsmuster von *Otx2* und *Gbx2* aufeinander treffen, bildet sich in der weiteren Entwicklung die Mittel-Hinterhirn-Grenze, an der sich der Isthmus formiert (Simoneone, 2000). Ein Aktivitätsverlust von *Otx2* führt zu einer Deletion des Vorder-, Mittel- sowie rostralen Hinterhirns (Acampora et al., 1995; Matsuo et al., 1995), während der Aktivitätsverlust von *Gbx2* in Missbildungen des Isthmus' resultiert (Wassarman et al., 1997; Kikuta et al., 2003). Daneben führt der Verlust von *Gbx2*, ebenso wie eine ektopische Expression von *Otx2* im rostralen Hinterhirn, zu einer caudalen Expansion des Mittelhirns (Wassarman et al., 1997; Broccoli et al., 1999; Kikuta et al., 2003). Trotz ihrer wichtigen Funktion sind *Otx2* und *Gbx2* für die Induktion der Gene an der MHG nicht notwendig. So werden in Abwesenheit beider Transkriptionsfaktoren noch immer verschiedene Gene der MHG, wie *Pax2*, *Wnt1*, *En1* und *Fgf8* exprimiert, wenn auch mit überlappendem Expressionsmuster im anterioren Neuroektoderm (Li & Joyner, 2001).

Nach der Expression von *Otx2* und *Gbx2* (E7.5), folgt die Expression von *Wnt1* (E8.0) und *En1/2* (E8.5) an der MHG (Abb. 3, B). Während die Expression von *Wnt1* (engl. „*wingless-type MMTV integration site family, member 1*“) im Mesencephalon zunächst weit nach anterior reicht, ist sie an E9.5 auf einen schmalen Bereich rostral des Isthmus' begrenzt ((Joyner et al., 2000), Abb. 3, B-C). Die Deletion von *Wnt1* in Mäusen führt zu einem teilweisen Verlust des Mittelhirns, sowie des Cerebellums (McMahon & Bradley, 1990). Jedoch beeinflusst eine ekto- pische Überexpression von *Wnt1* im weiter rostral gelegenen Mittelhirn und weiter caudal ge- legenen Hinterhirn die Positionierung und Musterbildung des Isthmus' nicht (Panhuysen et al., 2004). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Wnt1* nicht an der Induktion der Isthmusak- tivität, wohl aber an der Aufrechterhaltung der Genexpression im Bereich der MHG beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass der Aktivitätsverlust von *Wnt1* zu einem Verlust der später einsetzenden *En1*-Expression führt (McMahon et al., 1992). Die Expressionsmuster von *Wnt1* und *En1* zeigen in Wildtypen zunächst eine recht weite Überlappung (Abb. 3, B), ehe die Ex- pression von *Wnt1* nach rostral und caudal expandiert, während die Expressionsdomäne von *En1* kleiner wird (Abb. 3, C, (Wurst & Bally-Cuif, 2001)). *En1* Mausmutanten zeigen ähnliche Defekte, wie die *Wnt1* Mutanten: das Mittelhirn wird, ebenso wie das rostrale Hinterhirn, nicht ausgebildet (Wurst et al., 1994).

Neben *Otx2*, *Gbx2*, *Wnt1* und *En1/2* spielt auch *Fgf8* (engl. '*fibroblast growth factor 8*') wäh- rend der Mittel-Hinterhirnentwicklung eine entscheidende Rolle. Die Expression von *Fgf8* be- ginnt (um E8.5) an der MHG und im rostralen Mittelhirn (Abb. 3, B), ehe sie später (um E9.5) nur noch als schmaler Ring im rostralen Hinterhirn detektierbar ist (Abb. 3, C, (Wurst & Bally- Cuif, 2001)). Aufgrund seiner Funktion wird angenommen, dass *Fgf8* eines der Schlüsselmo- leküle des Isthmus' darstellt. So zeigen verschiedene Mutationen von *Fgf8*, dass Teile des Mit- telhirns ebenso fehlen, wie das Cerebellum und sogar der Isthmus selbst (Meyers et al., 1998; Chi et al., 2003). Im Unterschied zu *Gbx2*- und *Otx2*-Mutanten werden in *Fgf8*-Mutanten Gene des Isthmus', wie *Wnt1* und *Gbx2* nicht länger exprimiert (Chi et al., 2003). Die beobachteten Defekte der *Fgf8*-Mutanten sind weitestgehend auf einen vermehrten Zelltod zurückzuführen (Chi et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Fgf8* ausreicht um die Bildung des Mittel- und Hinterhirns, ebenso wie die des Isthmus', ekto- pisch im Vorderhirn zu induzieren. Zusätzlich kann die Expression entscheidender Gene des Isthmus', wie *En1/2*, in dem ekto- pisch induzierten Gewebe detektiert werden (Crossley et al., 1996; Martinez et al., 1999; Liu et al., 1999). Seine Funktion übt *Fgf8* über *Otx2* aus, indem es *Otx2* reprimiert (Martinez et al., 1999;

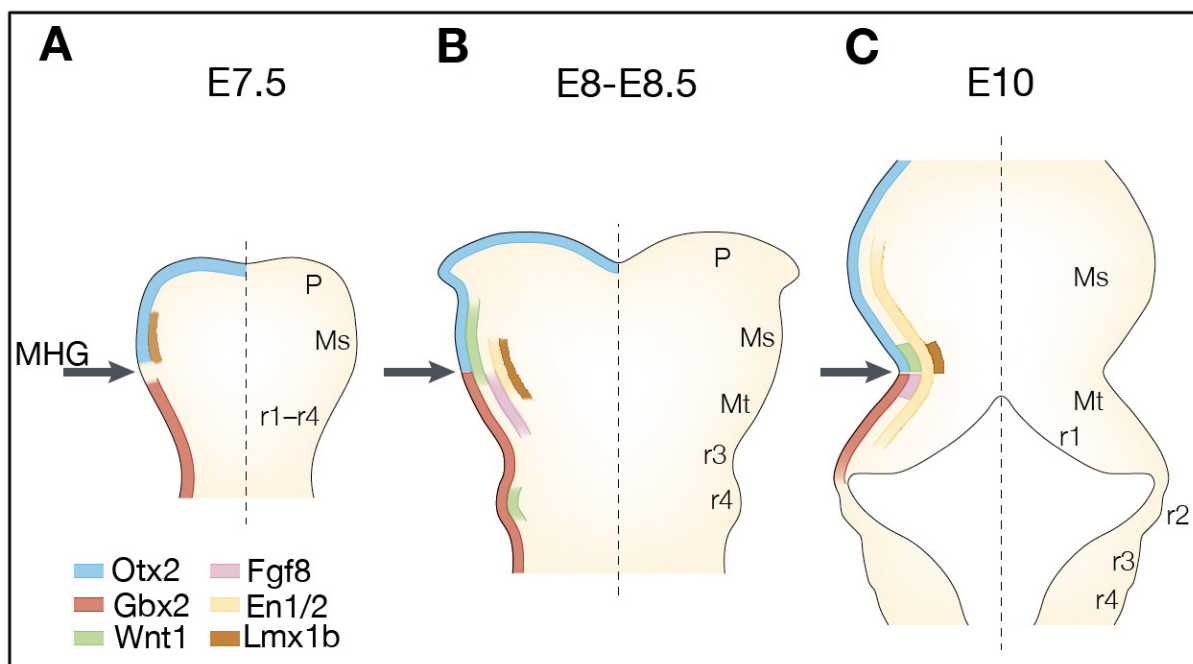


Abb. 3: Schematische Darstellung der Expressionsdomänen verschiedener Signalmoleküle der MHG. Dorsale Ansicht des frühen Mausembryos am Ende der Gastrulation an E7.5 (A), im sechs Somiten Stadium an E8-E8.5 (B) und an E10 (C). Es ist die dynamische Expression verschiedener Gene zu erkennen, die eine Rolle während der Mittelhirn- und Isthmusentwicklung spielen. Ms: Mesencephalon, Mt: Metencephalon, MHG: Mittel-Hinterhirngrenze, P: Prosencephalon, r1-r4: Rhombomere 1 - 4. Die Pfeile deuten auf die MHG. Die gestrichelte Linie markiert die Mittellinie des Embryos. Modifiziert nach (Wurst & Bally-Cuif, 2001).

Liu et al., 1999). *Fgf8* ist für die Erhaltung des Isthmus' absolut notwendig (Chi et al., 2003). Der Transkriptionsfaktor *Lmx1b* ist bereits an E7.5 an der MHG detektierbar und seine Expression reicht bis zum Vorderhirn (Abb. 3, A), während sie sich später auf den Isthmus beschränkt und nahezu vollständig mit *Wnt1* co-lokalisiert ist (Abb. 3, B-C, (Matsunaga et al., 2002; Guo et al., 2007)). Ein Verlust der *Lmx1b* Aktivität führt zu einem Wegfall der *Fgf8* Expression am Isthmus und infolge dessen zu einem schrittweisen Verlust der *Wnt1*, sowie *En1/2* Expression (Matsunaga et al., 2002; Guo et al., 2007). Damit ist *Lmx1b* ebenfalls von entscheidender Bedeutung während der Entwicklung des Isthmus'.

Neben dem Isthmus und seinen Signalen sind noch intrinsische Faktoren der Zellen in der Bodenplatte, ebenso wie Signale des darunter befindlichen Mesoderms (Chorda dorsalis), von zentraler Bedeutung für die Entwicklung des Mittelhirns. Aus der Mittellinie der Neuralplatte geht schließlich das am ventralsten gelegene Gewebe des Mittelhirns hervor. *Shh* ist einer der Faktoren, der mit der Bodenplatte assoziiert ist und trägt entscheidend zu der Entwicklung des Mittelhirns und seiner ventralen Regionalisierung bei. An E8.5 ist die Expression von *Shh* an der ventralen Mittellinie des Mesencephalons detektierbar (Abb. 3, D, (Echelard et al., 1993), (Gale & Li, 2008)). Knockout Studien haben gezeigt, dass ein Verlust von *Shh* zu einem Verlust der

Bodenplatte und zu einer Degeneration der Chorda dorsalis führt (Chiang et al., 1996). Damit einhergehend konnte eine Reduzierung des Mittelhirns, ebenso wie eine Reduzierung entscheidender Marker wie *Otx2* beobachtet werden (Chiang et al., 1996). Eine ektopische Expression von *Shh* führt wiederum zu der Aktivierung bestimmter Gene der Bodenplatte (Echelard et al., 1993). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass aus *Shh*-positiven Zellen verschiedene Kerngebiete des ventralen Mittelhirns hervorgehen (Echelard et al., 1993; Joksimovic et al., 2009a). Aus diesen Ergebnissen wurde von den Autoren geschlossen, dass die Expression von *Shh* hinreichend und notwendig ist um die Bildung der Bodenplatte einzuleiten und die neuronalen Progenitoren des ventralen Mittelhirns korrekt zu etablieren.

1.3.2 Morphologische Strukturen des murinen Mittelhirns

Morphologisch gesehen gliedert sich das Mittelhirn an E11.5 in die Boden-, Basal-, Alar- und Deckplatte (Abb. 4, A, (Chizhikov & Millen, 2005)), während es später von dorsal nach ventral in das Tectum und das Tegmentum unterteilt werden kann (Abb. 4, B).

Das Tectum (dorsal) gliedert sich in die rostral gelegenen Colliculi superiores (SC, engl. „*superior colliculus*“) und die caudal gelegenen Colliculi inferiores (IC, engl. „*inferior colliculus*“) (Abb. 4, B). Die Colliculi superiores bestehen aus einer geschichteten Struktur und sind an der Verschaltung optischer Reflexe beteiligt. So erhalten die SC Reize optischer Signale retinocollicular von der Netzhaut und aus dem visuellen Cortex (O’Leary & McLaughlina, 2005). Die geschichtete Struktur der SC wird durch das sequenzielle, dorsale Auswandern verschiedener Zellgruppen aus der ventrikulären Zone erreicht (Puelles, 2007).

Die caudal gelegenen Colliculi inferiores bestehen aus einer globulären Struktur und sind dem auditorischen System zugeordnet (Puelles, 2007). Sie erhalten ihre Reize unter anderem vom Nucleus cochlearis, sowie vom Nucleus olivaris superior (Puelles, 2007).

Im Gegensatz zum Tectum weist das Tegmentum auf der rostrocaudalen Achse eine eher homogene Struktur auf und ist nicht geschichtet angeordnet. Seine Struktur ist von verschiedenen Kerngebieten geprägt und weist somit eine Kernstruktur auf. Einige der nuklearen Bereiche sind klar voneinander abgrenzbar, während andere eine diffusere Struktur aufweisen (Puelles, 2007).

Die am deutlichsten voneinander abgrenzbaren Strukturen sind das ventrale, tegmentale Areal (VTA, engl. „*ventral tegmental area*“), die Substantia nigra (SN, engl. „*substantia nigra*“), die Oculomotor Neuronen (OM, engl. „*oculomotor neurons*“) und der Nucleus ruber (engl.

„red nucleus“, (Puelles, 2007)). Daneben gibt es u.a. noch den Bereich der Substantia grisea periaquaeductalis (PAG, engl. „periaqueductal gray“) und die Kerne der Formatio reticularis (Abb. 4, C, (Puelles, 2007)).

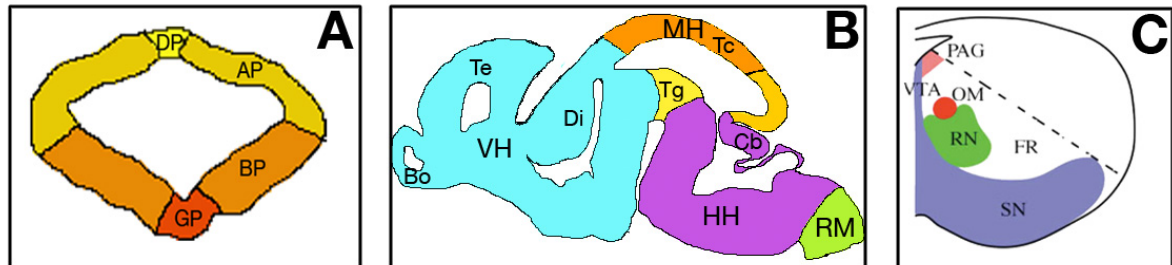


Abb. 4: Schematische Darstellung der morphologischen Strukturen und Kerngebiete des Mittelhirns. (A) Coronale Ansicht des embryonalen Mittelhirns von Mäusen und seine morphologische Struktur an E11.5. (B) Sagittale Ansicht des embryonalen Maushirns an E15.5. Dorsal liegt das Tectum und ventral das Tegmentum. Der dunkel-oranger Bereich umfasst die Colliculi superiores, während der hell-oranger Bereich die Colliculi inferiores umfasst. Der gelbe Bereich umfasst das Tegmentum im ventralen Mittelhirn. (C) Coronale Ansicht des embryonalen Mittelhirns an E15.5. Die Kernbereiche des Mittelhirns sind schematisch dargestellt. AP: Alarplatte, BP: Basalplatte, Bo: Bulbus olfactorius, Cb: Cerebellum, Di: Diencephalon, DP: Deckplatte, FR: Formatio reticularis, GP: Bodenplatte, MH: Mittelhirn, HH: Hinterhirn, OM: Oculomotor Neuronen, PAG: Substantia grisea periaquaeductalis, RM: Rückenmark, RN: Nucleus ruber, SN: Substantia nigra, Tc: Tectum, Te: Telencephalon, Tg: Tegmentum, VH: Vorderhirn, VTA: Ventrales tegmentales Areal. (C) ist modifiziert nach (Puelles, 2007).

Die VTA ist in dem medialen Bereich der Mantelzone lokalisiert (Abb. 4, C) und ihre Axone innervieren u.a. den präfrontalen Cortex und die Amygdala (Prakash & Wurst, 2006). Die Neuronen der VTA sind an der Modulation kognitiver Prozesse, wie emotionalem und Belohnungsverhalten beteiligt (Prakash & Wurst, 2006). Der hauptsächliche Transmitter dieser Neuronen ist das Dopamin, daher gehören sie neben den Neuronen der SN zu den dopaminergen Neuronen des ventralen Mittelhirns (mDA Neuronen) (Prakash & Wurst, 2006). Die SN ist ebenfalls im ventralen Mittelhirn lokalisiert (Abb. 4, C) und ihre Axone innervieren hauptsächlich das Striatum (Prakash & Wurst, 2006). Die Neuronen der SN sind u.a. an willkürlichen Bewegungsabläufen beteiligt (Prakash & Wurst, 2006).

Neben den Kerngebieten der dopaminergen Neuronen ist der Nucleus ruber lokalisiert (Abb. 4, C). Es ist zu erwähnen, dass nur ein Teil des Nucleus ruber (Pars magnocellularis) im Mittelhirn liegt (Puelles, 2007; Gruber & Gould, 2010). Der Nucleus ruber bekommt Signale vom motorischen Cortex, ebenso wie vom Cerebellum und ist an den Bewegungsabläufen der distalen Extremitäten beteiligt (Puelles, 2007; Gruber & Gould, 2010).

Oberhalb des Kerngebiets des Nucleus ruber liegt das Kerngebiet der Oculomotorneuronen (Puelles, 2007). Seine Nervenbahnen innervieren verschiedene Muskeln des Auges und sind somit an der Augenbewegung beteiligt.

Die Kerne der Substantia grisea periaquaeductalis sind nahe dem Ventrikel lokalisiert und an der Modulation von Schmerz und Verhalten beteiligt, während die Kerne der Formatio reticularis (FR) u.a. auch in motorische Prozesse involviert sind (Abb. 4, C, (Puelles, 2007)). Die Kerne der FR gehören zu den diffusen Kerngebieten des Mittelhirns (Puelles, 2007).

1.4 Die neuronalen Subpopulationen des murinen Mittelhirns

Wie bereits erwähnt, ist der Isthmus um E9.5 vollständig entwickelt und grenzt das Mittelhirn vom Hinterhirn ab (Abb. 6, B). Die Regionalisierung des Mittelhirns ist damit abgeschlossen und es folgt die Spezifikation und Differenzierung der einzelnen Neuronengruppen (Gale & Li, 2008). Morphologisch gliedert sich das Mittelhirn, zu diesem Zeitpunkt von ventral nach dorsal in die Boden-, Basal-, Alar- und Deckplatte (Abb. 4, A). Diese Strukturen können jeweils in die ventrikuläre Zone und die Mantelzone gegliedert werden, wobei sich die Mantelzone wiederum in die intermediäre und marginale Zone aufteilt. Die Zellen der ventrikulären Zone können als neuronale Stammzellen angesehen werden. Sie besitzen die Fähigkeit sich symmetrisch, ebenso wie asymmetrisch, zu teilen und können zu einem neuronalen Subtypen spezifizieren und differenzieren. Nach Beendigung des Zellzyklus verlassen die Zellen den Bereich der ventrikulären Zone und migrieren über die intermediäre Zone zunächst entlang der dorsoventralen Achse, ehe sie nach lateral auswandern. Die Migration der Neuronen erfolgt entlang der sogenannten radialen Gliazellen (Bonilla et al., 2008). Mit Verlassen des Zellzyklus sind die Zellen postmitotisch und es beginnt ihre Differenzierung in einen neuronalen Subtyp.

Die Kerngebiete des ventralen Mittelhirns grenzen sich in frühen Embryonalstadien recht deutlich voneinander ab und es herrscht meistens ein Transmittertyp vor. So haben die Neuronen der VTA und SN hauptsächlich ein dopaminerges Zellschicksal, während die Neuronen des Nucleus ruber glutamaterg sind. Aber auch im dorsalen Mittelhirn lassen sich bestimmte Transmittertypen identifizieren. In Abbildung 5 ist eine schematische Darstellung der verschiedenen Transmittertypen im embryonalen Mittelhirn an E11.5 dargestellt.

In den folgenden Kapiteln wird näher auf die einzelnen Neuronentypen und die molekularen Mechanismen, die an ihrer Entwicklung beteiligt sind, eingegangen.

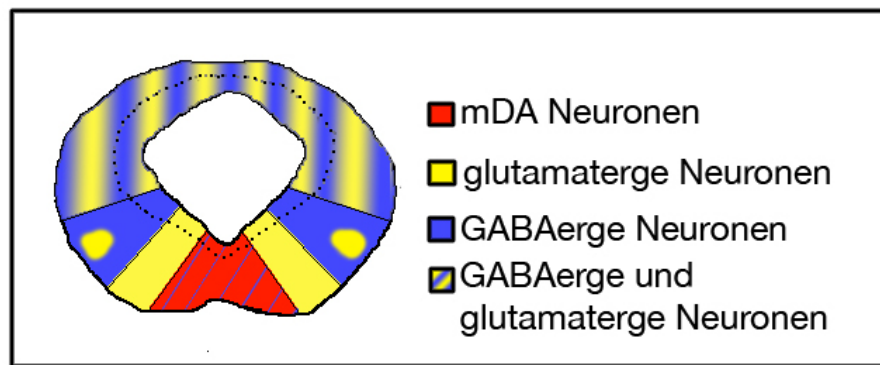


Abb. 5: Schematische Darstellung der neuronalen Populationen im embryonalen Mittelhirn. Die Darstellung zeigt eine coronale Ansicht des embryonalen Mittelhirns an E12.5. Die ventral angeordneten dopaminergen Neuronenpopulationen sind in rot dargestellt. Sie befinden sich in der Bodenplatte, sowie den angrenzenden Bereichen der Basalplatte. Die blaue Linie in dem roten Bereich deutet an, dass hier auch wenige GABAerge Neuronen lokalisiert sind. In der späteren Entwicklung sind in dem Bereich der dopaminergen Neuronen größere Populationen GABAerger Neuronen vorhanden. Gelb zeigt die Bereiche der glutamatergen Neuronen an. Sie sind in der Basal- und Alarplatte lokalisiert. Blau zeigt die Bereiche GABAerger Neuronenpopulationen an. Sie sind in allen Bereichen des murinen Mittelhirns zu finden. Der kleine Bereich der glutamatergen Neuronen in dem Gebiet der ventral gelegenen GABAergen Neuronen zeichnet sich durch die einzigartige Expression von Pax6 aus. Der blau-gelbe Bereich im dorsalen Mittelhirn zeigt eine gemischte Population GABAerger und glutamaterger Neuronen an. Die gestrichelte Linie trennt den Bereich der ventrikulären Zone von der Mantelzone. Das Modell basiert auf den Ergebnissen von Nakatani et al. (2007), Kala et al. (2009) und Waite et al. (2011).

1.4.1 Entwicklung der dopaminergen Neuronen des ventralen Mittelhirns

Dopamin gehört zu den katecholaminergen Neurotransmittern (Elsworth & Roth, 1997) und bildet die Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin. Neuronen, die Dopamin als Transmitter verwenden, werden dopaminerge Neuronen genannt. Im ZNS adulter Mäuse sind ca. 75% der dopaminergen Neuronen im ventralen Mittelhirn lokalisiert, während die restlichen 25% im Vorderhirn, genauer dem Diencephalon sowie dem Bulbus olfactorius, zu finden sind (Wallen & Perlmann, 2003).

Im Mittelhirn gibt es drei Kerngebiete in denen die mDA Neuronen lokalisiert sind: die VTA (auch A10 genannt), die SN (auch A9) und das retrorubale Feld (RRF, auch A8 genannt, Abb. 6). Die Neuronen der VTA gehören ebenso wie die des RRF zu dem mesolimbischen Signalweg (Prakash & Wurst, 2006). Ihre Projektionen reichen u.a. in den präfrontalen Cortex, den Thalamus und den Hippocampus (Abb. 6, C). Sie spielen eine Rolle bei emotionalem Verhalten, Drogenabhängigkeit und dem Belohnungsverhalten (Kelley & Berridge, 2002; Cagniard et al., 2006). Die dopaminergen Neuronen der SN bilden den nigrostriatalen Signalweg und projizieren in das Striatum und die Kerngebiete des Globus pallidus (Abb. 6, C). Ihre Hauptaufgabe ist die Kontrolle von Bewegungsabläufen. Es ist bekannt, dass die Neuronen der SN in Patienten mit Morbus Parkinson degeneriert sind (Lang & Lozano, 1998a,b; Fahn, 2003).

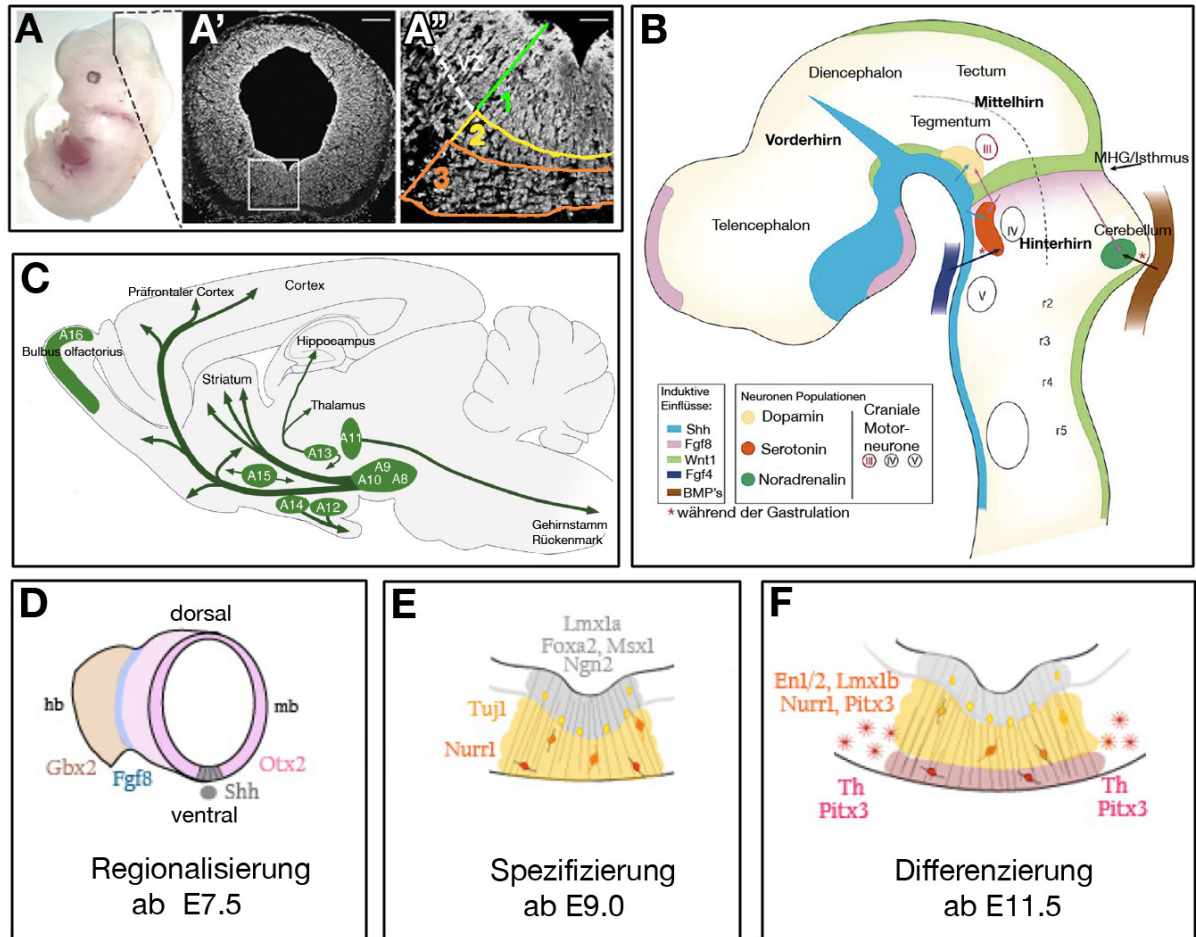


Abb. 6: Dopaminerge Neuronen des Mittelhirns und ihre Entwicklung. (A) Laterale Ansicht eines Mausembryos an E12.5. Die schwarze Linie markiert den Bereich des coronalen Gewebeschnitts in (A'). (A'') ist eine Vergrößerung des Ausschnitts von (A'). Die grüne Linie (1) markiert den Bereich der ventrikulären Zone und somit der Vorläuferzellen, der gelbe Bereich (2) den Bereich der intermediären Zone und somit der unreifen mDA Neuronen, während die orange Linie (3) den Bereich der Mantelzone und reifen mDA Neuronen markiert. (B) Schematische Darstellung der Anordnung der dopaminergen und serotonergen Neuronen an der MHG an E11.5, sagittale Ansicht. Daneben ist die Expression einiger Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle zu sehen. Die Pfeile deuten an, welche Signale die verschiedenen Neuronenpopulationen beeinflussen. Die mit einem Sternchen markierten Pfeile sind nur während der Gastrulation von Bedeutung. (C) Lokalisation der mDA Neuronen im adulten Gehirn, Lateralansicht. (D) Regionalisierung des Neuralrohres und die wichtigsten Expressionsdomänen. Das Mittelhirn ist in rosa dargestellt, die MGH in blau und das Hinterhirn in braun. Der graue Kreis stellt die Chorda dorsalis dar. (E-F) Ausschnitt des ventralen Mittelhirns in coronaler Ansicht um E10.0 (E) und E12.0 (F). Der graue Bereich markiert den Bereich der Vorläufer während der gelbe Bereich die frühen mDA Neuronen markiert. Die Spezifikation der mDA Neuronen erfolgt im Bereich der mDA Vorläufer. Die beteiligten Faktoren sind u.a. *Lmx1a*, *Foxa2*, *Msx1* und *Ngn2*. Wenn die mDA Neuronen postmitotisch werden, treten sie in die intermediäre Zone ein (gelb) und exprimieren u.a. *Nurr1* (E-F). Die reifen mDA Neuronen sind im peripheren Bereich (rot in F) lokalisiert und u.a. durch die Expression von *Pitx3* und *TH* gekennzeichnet (F). Die Abbildungen wurden modifiziert nach: (Prakash & Wurst, 2004; Ang, 2006; Björklund & Dunnett, 2007; Gale & Li, 2008)

Transkriptionsfaktoren während der Initiierung und Spezifizierung der mDA Neuronen

Von der Initiierung bis zur Differenzierung ist eine Vielzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle von Bedeutung. Neben der Bedeutung des Isthmus' für die Entwicklung des Mittel- und Hinterhirns spielt er, ebenso wie die intrinsischen Faktoren der Neuronen in der Bodenplatte, eine entscheidende Rolle bei der Generierung dopaminerger Neuronen. Die Population der mDA Neuronen grenzt, ebenso wie die Population der serotonergen Neuronen an den Isthmus an (Abb. 6, B). Das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren, die bereits in Kapitel 1.3 angesprochen wurden, ist von zentraler Bedeutung für die Initiierung der dopaminerger Neurogenese. So zeigen *Wnt1*-Knockout-Mäuse eine stark reduzierte Anzahl dopaminerger Neuronen im Mittelhirn, welche im Verlauf der Entwicklung ebenfalls degenerieren (Prakash & Wurst, 2006). Neben *Wnt1* ist auch *En1* für das Überleben der frühen mDA Neuronen notwendig, denn in *En1^{+/+}/En2^{-/-}* und *En1^{+/-}/En2^{-/-}* Mausmutanten sind kurz nach ihrer Entstehung keine mDA Neuronen mehr detektierbar (Simon et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *Fgf8* und *Shh* gemeinsam die Bildung von mDA Neuronen im Vorderhirn induzieren können (Ye et al., 1998), was die Wichtigkeit beider Faktoren in der Entstehung der mDA Neuronen verdeutlicht. Spätere Studien konnten zudem demonstrieren, dass zwischen *Shh* und *Wnt1* ein sogenannter „*feedback-loop*“ (engl.) besteht um das dopaminerge Zellschicksal einzuleiten und ihre Neurogenese zu initiieren (Joksimovic et al., 2009b).

Nachdem der Vorgang der Regionalisierung, und somit die Anlage der molekularen Identität der Zellen des ventralen Mittelhirns ein dopaminerges Zellschicksal annehmen zu können, abgeschlossen ist (um E9.0) erfolgt die Spezifikation der mDA Neuronen. Die Vorläufer der mDA Neuronen sind in der ventrikulären Zone detektierbar und zeichnen sich u.a. durch die Expression von *Otx2*, *Lmx1a/b*, *Msx1/2*, *Foxa2* und *En1/2* aus (Ang, 2006). Es wird angenommen, dass *Lmx1a* (engl. „*Lim homeodomain transcription factor 1a*“) ein früher Aktivator des dopaminergen Zellschicksals im ventralen Mittelhirn ist und die Spezifikation der mDA Neuronen einleitet (Andersson et al., 2006b). Durch den Beginn der Expression von *Lmx1a* um E9.0 wird vermutet, dass *Lmx1a* aufwärts von *Msx1* liegt und möglicherweise seine Expression initiiert (Andersson et al., 2006b). Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass die ektopische Expression von *Lmx1a* in Hühnerembryonen die Expression von *Msx1* induziert (Andersson et al., 2006b). Während die Expression von *Lmx1a* jedoch nicht nur in den Vorläufern, sondern auch in den postmitotischen mDA Neuronen detektierbar ist, wird *Msx1* nur von Vorläufern der

mDA Neuronen exprimiert (Andersson et al., 2006b; Ono et al., 2007). Die Aktivierung von *Lmx1a* erfolgt möglicherweise über Shh, denn es wurde gezeigt, dass Shh die Expression von *Lmx1a* und *Msx1* einleiten kann (Andersson et al., 2006b). Interessanterweise führt der spezifische Verlust von Shh in der Bodenplatte jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung in der Anzahl *Lmx1a*-positiver Zellen (Lin et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass nicht allein Shh an der Induktion der *Lmx1a* Expression beteiligt ist, sondern dies eher auf einem Zusammenspiel verschiedener Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren beruht. Während *Lmx1a* notwendig und hinreichend für die Bildung von mDA Neuronen ist (Andersson et al., 2006b; Lin et al., 2009; Nakatani et al., 2010), ist *Msx1* dies nicht. So wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von *Lmx1a* im Mittelhirn von Hühnerembryonen zur Induktion von mDA Neuronen führt, während *Msx1* nicht in der Lage ist die Bildung ektopischer mDA Neuronen einzuleiten (Andersson et al., 2006b). Es wird angenommen, dass *Msx1* durch die Repression von *Nkx6.1* die Differenzierung in ein anderes Zellschicksal verhindert und dadurch zur Generierung der mDA Neuronen beiträgt (Andersson et al., 2006b).

Vergangene Studien haben gezeigt, dass *Lmx1a* und *Msx1* notwendig sind um die Expression von *Ngn2* (engl. „*Neurogenin 2*“) einzuleiten (Andersson et al., 2006b). *Ngn2* gehört zu den proneuralen Genen mit einer bHLH Domäne (engl. „*basic-helix-loop-helix*“). Die Expression von *Ngn2* ist ab E10.75 im ventralen Mittelhirn detektierbar (Andersson et al., 2006a) und ist an E11.5 auf die Vorläuferzellen, sowie die mDA Neuronen in der intermediären Zone beschränkt (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006). In *Ngn2*^{-/-} Mausembryonen sind an E11.5 nahezu keine reifen mDA Neuronen mehr in der Mantelzone detektierbar. An E13.5 sind jedoch wieder vermehrt *Nurr1*-positive Neuronen im Bereich der Bodenplatte detektierbar, was verdeutlicht, dass eine Regeneration reifer mDA Neuronen stattgefunden hat (Kele et al., 2006).

Die Autoren erklären dies mit einer Kompensation durch das proneurale Gen *Mash1*. Des Weiteren ist *Ngn2* notwendig, aber nicht ausreichend für die Differenzierung der mDA Neuronen, wie die ektopische Expression von *Ngn2* in Zellkulturexplantaten des dorsalen Mittelhirns zeigt (Andersson et al., 2006b). *Ngn2* spielt also eine wichtige Rolle während der Generierung postmitotischer mDA Neuronen und ist notwendig für deren Differenzierung in reife mDA Neuronen. Daneben vermittelt *Ngn2* den Übergang der mDA Neuronen aus der proliferativen Zone in die intermediäre Zone (Andersson et al., 2006b; Kele et al., 2006).

Transkriptionsfaktoren während der Differenzierung von mDA Neuronen

Nachdem die Vorläufer der mDA Neuronen den Zellzyklus verlassen haben erfolgt die Differenzierung. Dabei zeichnen sich unreife mDA Neuronen u.a. durch die Expression von *Lmx1a/b*, *Ngn2*, *Nurr1*, *En1/2*, *Foxa2* und *Tuj1* aus (Ang, 2006). Reife, vollständig differenzierte mDA Neuronen hingegen exprimieren u.a. noch *Pitx3* und *TH*, wohingegen kein *Ngn2* Protein mehr detektierbar ist (Ang, 2006). Die ersten reifen mDA Neuronen können an E11.5 in der Mantelzone des ventralen Mittelhirns detektiert werden. Ein Auswahl von Faktoren, die an der frühen und terminalen Differenzierung beteiligt und für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, werden im Folgenden vorgestellt.

Nurr1: Die Expression von *Nurr1* (engl. „*Nuclear receptor related protein 1*“) ist im ventralen Mittelhirn muriner Embryonen ab E10.5 detektierbar (Zetterstrom et al., 1997). In *Nurr1*-defizienten Mausembryonen werden mDA Neuronen zwar generiert und nehmen einen dopaminergen Phänotyp an (Saucedo-Cardenas et al., 1998), die Expression von *TH* (Tyrosin Hydroxylase) bleibt jedoch aus. *TH* ist das limitierende Enzym der Dopaminsynthese und wird daher allgemein als Marker ausdifferenzierter dopaminergener Neuronen verwendet. Neben *TH* ist auch das Protein *VMAT2* (engl. „*vesicular monoamine transporter 2*“), ebenso wie *DAT* (engl. „*dopamine transporter*“) in *Nurr1*-defizienten Mausembryonen abwesend (Smits et al., 2003). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass *Nurr1* notwendig ist für die Regulation verschiedener Proteine, die an der Dopaminsynthese beteiligt sind und somit die Transmittersynthese reguliert. Zusätzlich konnte in *Nurr1*-Knockout-Mäusen beobachtet werden, dass Marker wie *Pitx3*, *En1* und *Lmx1b* zunächst normal exprimiert, später jedoch herunter reguliert sind (Saucedo-Cardenas et al., 1998). Es wird vermutet, dass *Nurr1* nicht nur an der Regulation der Transmittersynthese, sondern auch an der frühen Differenzierung und dem Erhalt der mDA Neuronen beteiligt ist. Übereinstimmend damit hat eine Inaktivierung von *Nurr1* in adulten Mäusen einen Verlust der *TH* Expression zur Folge (Kadkhodaei et al., 2009).

Pitx3: *Pitx3* gehört zu den „*paired-like related*“ Homöobox enthaltenden Transkriptionsfaktoren und seine Expression startet um E11.5 im ventralen Mittelhirn der Maus, kurz nach der Expression von *Nurr1* (Smidt et al., 1997). In späteren Entwicklungsstadien (E13.5) liegt eine nahezu vollständige Co-Expression von *TH* und *Pitx3* vor. *Pitx3* wird also vermutlich in allen dopaminergen Neuronen des ventralen Mittelhirns exprimiert (Smidt et al., 1997; Maxwell et al., 2005). *Pitx3* ist der einzige bekannte Faktor, dessen Expression nur in mDA Neuronen,

jedoch nicht in dopaminergen Neuronen des Vorderhirns, detektierbar ist (Smidt et al., 1997). Studien an der natürlich vorkommenden „*aphakia*“ Maus, bei der kein Pitx3 Protein gebildet wird, zeigten, dass Pitx3 für die korrekte Bildung der mDA Neuronen in der SN notwendig ist (Nunes et al., 2003; van den Munckhof et al., 2003; Smidt et al., 2004). Deutlich wird dies u.a. durch den Verlust der TH Expression in der SN, aber nicht der VTA, in „*aphakia*“ Mausmutanten (Maxwell et al., 2005). Da die Neuronen der VTA nicht so stark betroffen sind, wie die der SN, scheinen verschiedene Signalkaskaden an der Differenzierung und dem Erhalt der mDA Neuronen in den einzelnen Domänen notwendig zu sein. Bei Patienten mit Morbus Parkinson ist ein ähnliches Phänomen zu beobachten: Die Neuronen der SN degenerieren, während die der VTA und des RRF nicht so stark betroffen sind. Neuere Studien konnten zeigen, dass Pitx3 ebenso wie Nurr1 die Expression von *VMAT2* und *DAT* reguliert (Hwang et al., 2009), was auf eine gemeinsame Funktion von Pitx3 und Nurr1 hinweist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass Pitx3 und Nurr1 an dieselben Promotorregionen binden (Jacobs et al., 2009).

Lmx1b: Neben *Pitx3* und *Nurr1* spielt ebenso *Lmx1b* eine Rolle zur Erhaltung von mDA Neuronen. So zeigen *Lmx1b*-defiziente Mäuse eine nahezu vollständig fehlende Expression von Pitx3, während die Expression von Nurr1 nicht betroffen zu sein scheint (Smidt et al., 2000). Auch TH wird anfänglich exprimiert (Smidt et al., 2000). Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass mindestens zwei verschiedene Signalwege zur Differenzierung dopaminergener Neuronen im ventralen Mittelhirn existieren, da die Expression von *Lmx1b* in den „*aphakia*“ Mausmutanten, ebenso wie in den *Nurr1*-defizienten Tieren nicht verändert ist (Wallen & Perlmann, 2003).

Foxa2: Der Transkriptionsfaktor *Foxa2* (engl. „*forkhead box a 2*“), auch bekannt als *Hnf3 β* ist neben seiner Rolle bei der Entwicklung der Bodenplatte, auch wichtig für die Differenzierung der mDA Neuronen. So zeigen Studien von *Foxa2*-defizienten Mausembryonen, dass in diesen Tieren die Differenzierung der mDA Neuronen inhibiert ist (Ferri et al., 2007). *Foxa1* und *Foxa2* Doppelmutanten weisen sogar eine verminderte Neurogenese, ebenso wie eine unvollständige Differenzierung der mDA Neuronen auf (Ferri et al., 2007).

1.4.2 Entwicklung der serotonergen Neuronen im Hinterhirn

Die serotonergen Neuronen des Hinterhirns, auch 5-HT Neuronen genannt, grenzen an die dopaminergen Neuronen des Mittelhirns (Abb. 6, B) und können in zwei Hauptgruppen, bestehend aus verschiedenen Kerngebieten, eingeteilt werden. Die eine Gruppe wird als rostrale Gruppe bezeichnet, während die andere als caudale Gruppe bezeichnet wird (Gaspar et al., 2003). Die 5-HT Neuronen der caudalen Gruppe liegen größtenteils in der Medulla oblongata und projizieren hauptsächlich ins Cerebellum. Die serotonergen Neuronen der rostral gelegenen Kerngebiete sind im Mesencephalon und Pons lokalisiert. Ihre Projektionen sind weitreichend und sie innervieren u.a. den Hippocampus, die Amygdala, den Thalamus und Hypothalamus, sowie die Basalganglien (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 2008). Die 5-HT Neuronen werden um E10.0 und E12.5 im Mausembryo generiert.

Initiierung und Spezifikation der serotonergen Neuronen

Notwendig für die Induktion und Entwicklung der serotonergen Neuronen sind die Signale des Isthmus' und der Bodenplatte. Insbesondere *Fgf8*, *Shh* und *Gbx2* spielen eine Rolle während ihrer Entwicklung. So zeigte sich, dass bei einer Verschiebung der *Fgf8* und *Gbx2* Expression Richtung rostral die Bildung 5-HT-positiver Neuronen im Mittelhirn erfolgt (Brodski et al., 2003). Da die Signale von *Fgf8* und *Shh* auch für die Entwicklung der dopaminergen Neuronen wichtig sind und sie deren Entwicklung sogar induzieren können, ergab sich der Schluss, dass weitere Signalmoleküle oder intrinsische Faktoren an der Induktion der serotonergen Neuronen beteiligt sind. Diese Hypothese konnte durch Studien von Ye et al. (1998) belegt werden. So ist es möglich, 5-HT Neuronen ektopisch im Gewebe des ventralen Mesencephalons zu induzieren, wenn *Fgf4* hinzu gegeben wird. Somit zeigt sich, dass *Fgf8* und *Shh* allein nicht hinreichend, wohl aber notwendig sind für die Induktion der serotonergen Neurogenese (Ye et al., 1998).

Ein früher Marker der Vorläuferzellen der 5-HT Neuronen ist *Nkx2.2*. Die Expression von *Nkx2.2* ist notwendig für die Bildung der 5-HT Neuronen, was eine Studie an *Nkx2.2*-defizienten Tieren zeigte (Briscoe et al., 1999). Es ist allerdings zu erwähnen, dass offenbar nicht alle 5-HT Neuronen abhängig von *Nkx2.2* sind, da im rostralen Bereich weiterhin 5-HT-positive Neuronen detektierbar sind (Briscoe & Ericson, 1999; Briscoe et al., 1999). Nachfolgend auf die Expression von *Nkx2.2* folgt die Expression von *Nkx6.1*. *Nkx6.1* ist notwendig für die Induktion der Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren, die an der Spezifizierung der 5-HT

Neuronen beteiligt sind. So sind Nkx2.2 und Nkx6.1 gemeinsam an der Induktion der Expression von *Gata2* und *Gata3* beteiligt (Craven et al., 2004). Eine Studie an avianen und murinen Embryonen, bei denen *Gata2* inaktiviert, sowie überexprimiert wurde, zeigt, dass *Gata2* notwendig und ausreichend ist um die Transkription von *Lmx1a* und *Pet1* zu induzieren (Craven et al., 2004). *Gata3* hingegen scheint nicht an der Spezifizierung der 5-HT Neuronen beteiligt zu sein und kann den Verlust von *Gata2* nicht kompensieren (Craven et al., 2004).

Transkriptionsfaktoren während der Differenzierung der serotonergen Neuronen

Während *Gata2* eine Rolle während der Spezifizierung spielt, sind *Lmx1a* und *Pet1* an der Differenzierung der serotonergen Neuronen beteiligt und ihre Expression wird durch *Gata2* induziert (Craven et al., 2004). *Pet1* ist allerdings nur in den Neuronen der Nuclei raphes (engl. „*raphe nucleus*“) exprimiert. Die Analyse *Pet1*-defizienter Mäuse zeigte, dass *Pet1* für die terminale Differenzierung dieser 5-HT-positiven Neuronenpopulation notwendig ist (Hendricks et al., 2003). Ebenso wie *Pet1* ist *Lmx1b* für die Differenzierung serotonerger Neuronen in den Nuclei raphe notwendig. So zeigen *Lmx1b*^{-/-} Mausembryonen ebenfalls eine gestörte Entwicklung der 5-HT Neuronen in diesem Bereich (Ding et al., 2003). Daneben scheint *Lmx1b* für die Aufrechterhaltung der differenzierten 5-HT Neuronen notwendig zu sein, wie eine neuere Studie in konditionalen Mausembryonen zeigt. In diesen Mausmutanten ist *Lmx1b* in der *Pet1*-Domäne deletiert (Zhao et al., 2006).

1.4.3 Entwicklung der GABAergen Neuronen im murinen Mittelhirn

Der weitverbreitetste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn ist die γ -Aminobuttersäure. Neuronen die diesen Transmittertyp verwenden, werden GABAerge Neuronen genannt. GABAerge Neuronen sind im gesamten ZNS vorhanden und variieren in ihrer Morphologie, Genexpression und in ihren Projektionen (Bennett & Balcar, 1999). Im embryonalen Mittelhirn sind GABAerge Neuronen in der frühen Entwicklung (E11.5), wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, zunächst im dorsalen Teil der Basalplatte, ebenso wie in der Alarplatte lokalisiert (Abb. 5, (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009). Später (E16.5) können sie auch in der Domäne der dopaminergen Neuronen, genauer in der SN, detektiert werden (Kala et al., 2009). Daneben sind sie im Tectum, der PAG und der *Formatio reticularis* lokalisiert.

Frühere Studien haben gezeigt, dass an der Entwicklung der GABAergen Neuronen in verschiedenen Gehirnarealen von Vertebraten ganz unterschiedliche regulatorische Netzwerke involviert sind. So konnte gezeigt werden, dass in der Neurogenese GABAerger Neuronen im Vorderhirn neben *Shh* u.a. *Gsh2* in der Musterbildung eine Rolle spielt (Corbin et al., 2000), während z.B. im ventralen Rückenmark *Shh*, *Nkx6.1* und *Irx3* involviert sind (Briscoe et al., 2000). In dem Spezifikationsprozess sind ebenfalls unterschiedliche Transkriptionsfaktoren beteiligt. So ist im Vorderhirn die Expression von *Dlx1/2* für die Spezifizierung GABAerger Neuronen von Bedeutung (Anderson et al., 1997), während im ventralen Rückenmark *Gata2* eine Rolle spielt (Zhou & Engel, 2000). Einzig das proneurale Gen *Mash1* ist für die Entwicklung aller GABAergen Neuronen in allen Gehirnarealen von Bedeutung (Casarosa et al., 1999; Miyoshi & Bessho, 2004; Li et al., 2005).

Über die Entwicklung der GABAergen Neuronen im murinen Mittelhirn ist bislang nur wenig bekannt, da der Fokus aufgrund seiner klinischen Relevanz deutlich auf der Entwicklung der dopaminergen Neuronen lag. Es wird angenommen, dass *Mash1* und der Transkriptionsfaktor *Helt* an der GABAergen Neurogenese beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, dass *Mash1* für die Generierung der dorsal gelegenen GABAergen Neuronen absolut notwendig ist, während seine Inaktivierung im ventralen Mittelhirn nur zu einer verzögerten Differenzierung führt (Peltopuro & Kala, 2010).

Eine funktionelle Analyse *Helt*-defizienter Mausembryonen zeigte, dass neben *Mash1* ebenfalls *Helt* eine entscheidende Rolle spielt. So nehmen die GABAergen Neuronen in Abwesenheit von *Helt* ein glutamaterges Zellschicksal an (Nakatani et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass *Helt* die Entscheidung ein GABAerges Zellschicksal anzunehmen begünstigt und somit an der Spezifikation beteiligt ist. Des Weiteren scheint *Helt* den Austritt aus dem Zellzyklus und den Eintritt in die intermediäre Zone zu fördern (Kala et al., 2009). Diese Aufgabe kommt in dopaminergen Neuronen *Ngn2* zu (Kap. 1.4.1).

Ein ähnlicher Phänotyp wie in *Helt*-defizienten Mausembryonen kann in *Gata2*^{-/-} Mausembryonen beobachtet werden. Auch hier nehmen nahezu alle GABAergen Neuronen ein glutamaterges Zellschicksal an (Kala et al., 2009). Die einzige Ausnahme bilden hierbei die GABAergen Neuronen in der Domäne der dopaminergen Neuronen (Abb. 5, (Kala et al., 2009)). Dies deutet darauf hin, dass auch hier möglicherweise verschiedene Signalwege für die Differenzierung der Neurotransmitteridentität in verschiedenen morphologischen Strukturen notwendig sind. Da *Gata2* ausschließlich von postmitotischen Neuronen exprimiert wird, wird angenommen,

dass es sich hierbei um ein postmitotisches Selektorgan handelt und an der Differenzierung der GABAergen Neuronen beteiligt ist (Kala et al., 2009).

1.4.4 Entwicklung der glutamatergen Neuronen im murinen Mittelhirn

Die glutamatergen Neuronen gehören zu der größten Gruppe der exzitatorischen Neuronen im Gehirn. Daher sind sie ebenso wie die GABAergen Neuronen in vielen Bereichen des ZNS lokalisiert. So u.a. auch im Vorderhirn, Mittelhirn und Hinterhirn (Bennett & Balcar, 1999). Im ventralen Mittelhirn muriner Embryonen grenzen die glutamatergen Neuronen dorsal an die Domäne der dopaminergen Neuronen an, wobei sie sich hauptsächlich im Nucleus ruber und den Oculomotorneuronen befinden (Nakatani et al., 2007; Waite et al., 2011). Daneben ist eine kleine Subpopulation Pax6-positiver glutamaterger Neuronen in der Domäne der GABAergen Neuronen lokalisiert (Abb. 5, (Kala et al., 2009; Waite et al., 2011)). Darüber hinaus sind sie auch im dorsalen Mittelhirn zu verzeichnen (Abb. 5, (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Waite et al., 2011)). Bislang gibt es nicht viele Studien zur glutamatergen Neurogenese im Mittelhirn. Erst kürzlich rückten diese in das Interesse der Wissenschaft. Es ist, wie bei den GABAergen Neuronen auch, davon auszugehen, dass verschiedene Signalwege zur Entwicklung der einzelnen glutamatergen Neuronenpopulationen in den verschiedenen Gehirnarealen führen. So konnte zum Beispiel im Rückenmark gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Tlx1 und Tlx3 die Differenzierung in ein glutamaterges Zellschicksal fördern, während das GABAerge Zellschicksal unterdrückt wird (Cheng et al., 2004). Im Telencephalon wird diese Aufgabe von Otx2 wahrgenommen (Puelles et al., 2006). Ein gemeinsames Merkmal der glutamatergen Neurogenese scheint zu sein, dass das GABAerge Schicksal unterdrückt wird, wenn die Zellen zu glutamatergen Neuronen ausdifferenzieren (Casarosa et al., 1999; Fode et al., 2000; Parras et al., 2002; Cheng et al., 2004; Schuurmans et al., 2004; Cheng et al., 2005). Dies konnte, ebenso wie die Tatsache, dass das glutamaterge Schicksal zu Gunsten des GABAergen Schicksals unterdrückt wird, auch im Mittelhirn gezeigt werden (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009).

Auf der molekularen Ebene sind bislang nur wenige Faktoren bekannt, die eine Rolle während der Einleitung des glutamatergen Zellschicksals spielen. Nakatani et al. (2007) konnten zeigen, dass Helt ein GABAerges Zellschicksal fördert (Kapitel 1.4.3).

Studien im Vorderhirn zeigen, dass sowohl *Ngn1*, als auch *Ngn2*, für die Entwicklung eines

glutamatergen Transmitterphänotyps wichtig sind und beide Gene bereits in den Vorläufern exprimiert werden. Daher ist anzunehmen, dass sie bereits bei der Spezifikation eine Rolle spielen (Schuermans et al., 2004). Neuere Ergebnisse zeigen, dass dies auch im Mittelhirn der Fall ist (Nakatani et al., 2007).

Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass *Ngn1* das Potenzial hat ein glutamaterges Zellschicksal zu induzieren (Nakatani et al., 2007). Somit liegen die *Ngn*-Gene in der Genkaskade abwärts von *Helt* und ihre Expression wird von dem Helt-Protein induziert.

Welche Faktoren die Differenzierung der glutamatergen Neuronen steuern ist bislang relativ unbekannt. Kala et al. (2009) zeigten, dass *Gata2* als postmitotisches Selektorgen fungiert und direkt von Helt aktiviert wird. Somit unterdrückt nicht Helt, sondern *Gata2* die Differenzierung in ein glutamaterges Zellschicksal (Kala et al., 2009).

Nkx6.1 ist unter anderem in den glutamatergen Neuronen des Nucleus ruber exprimiert, die sich durch das Vorhandensein *Brn3a*-positiver Neuronen auszeichnen (Nakatani et al., 2007; Prakash et al., 2009). Prakash et al. (2009) konnten zeigen, dass *Otx2* notwendig und hinreichend ist, um die Expression von *Nkx6.1* einzuleiten, während *Nkx6.1* für die Generierung *Brn3a*-positiver Neuronen notwendig ist. Somit scheint *Otx2* in den glutamatergen Neuronen, ebenso wie im Telencephalon, ein wichtiger Transkriptionsfaktor zu sein, der an der Entwicklung der glutamatergen Neuronen beteiligt ist (Prakash et al., 2009).

1.4.5 Verschiedene Marker der neuronalen Subpopulationen des murinen Mittelhirns

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Transkriptionsfaktoren vorgestellt, die an der Entwicklung der verschiedenen Neuronenpopulationen beteiligt sind. Zum besseren Verständnis dieser Arbeit ist hier noch einmal eine Darstellung der einzelnen Neuronenpopulationen im Vergleich aufgezeigt und welche molekularen Marker von diesen exprimiert werden. Es sind nur die Marker aufgeführt, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

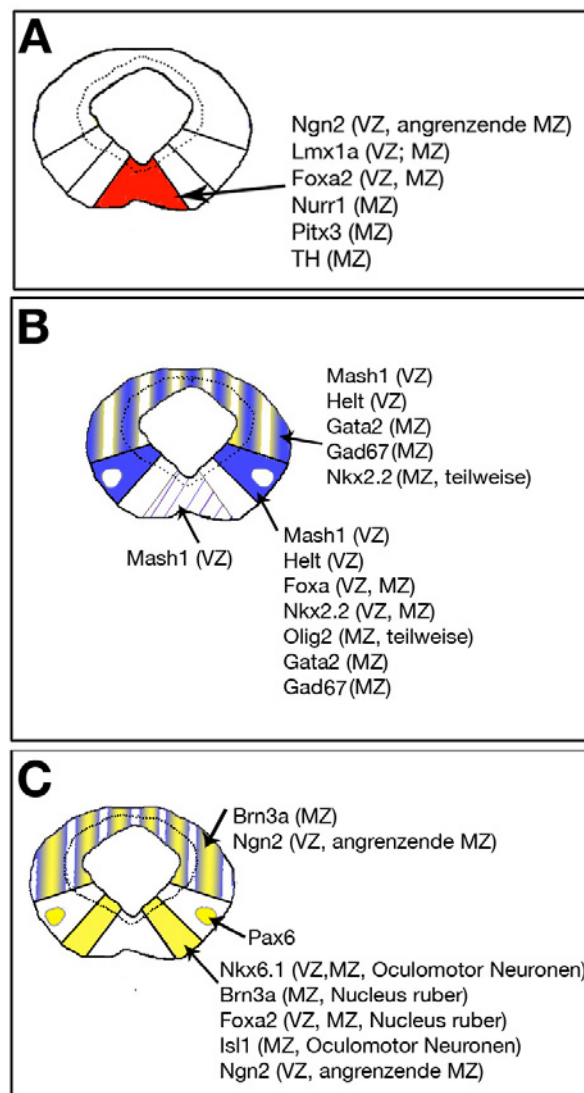


Abb. 7: Marker der verschiedenen neuronalen Populationen im Mittelhirn von Mausembryonen. (A-C) Schematische Darstellung coronaler Gewebeschnitte des murinen Gehirns an E12.5. Der rote Bereich markiert das Areal, in dem die dopaminergen Neuronen lokalisiert sind (A), während der gelbe Bereich zeigt, wo die glutamatergen (B) und der Blaue wo die GABAergen Neuronen lokalisiert sind (C). Im dorsalen Mittelhirn zeigt der blau-gelbe Bereich an, dass hier eine gemischte Population glutamaterger und GABAerger Neuronen vorliegt (B-C). VZ zeigt an, dass die Marker von Neuronen der Subpopulation in der ventrikulären Zone exprimiert werden, während MZ anzeigt, dass sie in der Mantelzone exprimiert werden. Oculomotor Neuronen und Nucleus ruber bedeutet, dass die Marker von Neuronen dieser speziellen Kerngebiete exprimiert werden. VZ: ventrikuläre Zone, MZ: Mantelzone. Das vorliegende Schema wurde erstellt nach (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Waite et al., 2011).

1.5 Der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1*

Der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1* gehört zu der Gen-Gruppe, die eine „*paired-type-related*“ (engl.) Homöodomäne enthalten. Es wurde 1996 als erstes von Rovescalli et al. beschrieben. Später konnte *Uncx4.1* von zwei weiteren unabhängigen Forschungsgruppen isoliert und näher charakterisiert werden (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997).

Die Homöodomäne ist eine ca. 60 Aminosäuren umfassende Proteindomäne. Sie bindet DNA und kann so die Expression verschiedener Gene regulieren. Oft stehen Homöoboxgene am Beginn einer Signalkaskade und spielen eine weitreichende Rolle während der Entwicklung. Sie sind unter anderem an der Formierung der Körperachsen beteiligt. Ihre notwendige Rolle wird durch ihre starke Konservierung in verschiedenen Spezies deutlich (Manak & Scott, 1994; Gellon & McGinnis, 1998; Garcia-Fernández, 2005; Joseph C. Pearson & McGinnis, 2005). Die bekanntesten Gene, die eine Homöobox enthalten sind die Hox-Gene. Sie sind in Gruppen (engl. „cluster“) angeordnet und wurden als erstes in *Drosophila melanogaster* entdeckt (Deschamps, 2007).

Uncx4.1 gehört ebenfalls zu den Transkriptionsfaktoren, die eine Homöodomäne enthalten (Abb. 8) und ist in der Maus in der distalen Region des Chromosoms fünf lokalisiert. Uncx4.1 zeigt eine 88%ige Homologie mit dem Unc-4 Protein des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (Rovescalli et al., 1996; Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997). Der Homöodomäne vorgelagert ist das Aminosegment: PFSIDGLLS, das von zwei alaninreichen Domänen eingerahmt ist (Abb. 8). Am C-Terminus ist ein weiteres Aminomotiv zu finden: PFSVESLLS, dem eine Prolin und Glycin reiche Domäne vorangeht (Abb. 8).



Abb. 8: Schematische Darstellung des Uncx4.1-Proteins und seiner Domänen. Rot: Zeigt den Bereich der Homöodomäne, grün: ist eine Prolin und Glycin reiche Domäne, 9AS sind zwei Bereiche in denen ein Aminosegment mit neun Aminosäuren zu finden ist. Links gelegen: PFSIDGLLS, rechts gelegen: PFSVESLLS. Orange: Alanin reiche Domäne. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Mansouri et al., 1997).

1.5.1 Das Expressionsmuster von *Uncx4.1* in Vertebraten

Eine Expressionsanalyse von *Uncx4.1* in Vertebraten erfolgte bisher nur in murinen und avianen Embryonen. Sowohl in der Maus, als auch im Huhn, ist *Uncx4.1* in den Somiten, dem ZNS und der Nierenanlage exprimiert, was auf eine konservierte Funktion hindeutet (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997; Schrägle et al., 2004).

Im Mausembryo ist die Expression von *Uncx4.1* bereits früh in der Entwicklung (ab E8.5) im ersten Branchialbogen und den Somiten zu verzeichnen (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997). Etwas später folgt die Expression in der Nierenanlage (E9.5), während *Uncx4.1* in den

Somiten nur noch im caudalen Teil detektierbar ist (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997). Die ersten Transkripte im ZNS sind an E9.5 im ventralen Mesencephalon detektierbar, während die Expression einen Tag später auch im dorsalen Mesencephalon verzeichnet werden kann. Aber nicht nur im Mittelhirn, sondern auch im Vorderhirn, dem Bulbus olfactorius und dem Rückenmark wird *Uncx4.1* an späteren Embryonalstadien exprimiert. So unter anderem im anterioren Teil des Hypothalamus, dem Telencephalon und den Eminentia Thalami (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997; Sammets et al., 2010). Die Expression beschränkt sich in allen Bereichen des ZNS weitestgehend auf die Mantelzone (Mansouri et al., 1997), wobei das *Uncx4.1*-Protein auch in proliferierenden Zellen des Bulbus olfactorius zu verzeichnen ist (Sammets et al., 2010).

1.5.2 Die Funktion von *Uncx4.1* während der Embryonalentwicklung

Da die Inaktivierung von *Uncx4.1* zu einem lethalen Phänotyp führt (Leitges et al., 2000; Mansouri et al., 2000), wurde seine Funktion bisher nur in embryonalen Stadien untersucht und eine Analyse adulter Mäuse blieb bisher aus.

Der wohl prägnanteste Phänotyp von *Uncx4.1*-defizienten Mäusen ist im Skelett zu finden. So führt der Verlust des *Uncx4.1*-Proteins zu einer starken Lordosis, missgebildeten, sowie fehlenden Rippen und Pedikeln (Leitges et al., 2000; Mansouri et al., 2000). Neben den Studien in Mausembryonen zeigen Schrägle et al. (2004), dass *Uncx4.1* ebenfalls für die korrekte Etablierung der Somiten in avianen Embryonen notwendig ist. Dies deutet darauf hin, dass *Uncx4.1* in allen Vertebraten eine ähnliche Funktion während der Somatogenese erfüllt.

Trotz weitreichender Expression von *Uncx4.1* im ZNS sind keine morphologischen Defekte im Gehirn *Uncx4.1*-defizienter Mausembryonen detektierbar (Leitges et al., 2000; Mansouri et al., 2000). Erst detaillierte, molekulare Analysen konnten einige Funktionen von *Uncx4.1* im ZNS entschlüsseln. So übt *Uncx4.1* eine selektive Funktion bei der Entwicklung der axonalen Verbindungen des Hypothalamus zur Hypophyse aus. Hierbei scheinen die Axone des Nucleus paraventricularis, ebenso wie die des hypothalamischen Nucleus supraopticus, in die Adenohypophysis einzuwachsen (Asbruek et al., 2006). Daneben konnte eine weitere Studie zeigen, dass *Uncx4.1* die Zellproliferation neuraler Vorläuferzellen im Bulbus olfactorius steuert (Sammets et al., 2010).

1.6 Das Cre-LoxP System

Unter einem klassischen oder auch globalen Knockout-Mausmodell wird die vollständige Inaktivierung eines Zielgens in allen Zellen des Organismus Maus verstanden, was durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erreicht wird (Mansouri, 2001b,a). Häufig führt die vollständige Inaktivierung eines Gens zu einem lethalen Phänotyp, so dass eine Analyse der Mausmutanten in späteren Embryonalstadien oder nach der Geburt nicht möglich ist (Mansouri et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2006; Cortázar et al., 2011). In anderen Fällen soll die Funktion des gewünschten Gens in einer bestimmten Gewebegruppe untersucht und somit nicht in allen Zellen inaktiviert werden. Zur zellspezifischen oder zeitlich veränderten Inaktivierung eines Gens kann das sogenannte Cre/LoxP-System zur Hilfe herangezogen werden (Mansouri, 2001a; Hayashi & McMahon, 2002). Hierbei werden in die DNA-Sequenz des zu inaktivierenden Gens sogenannte „*lox-P sites*“ (engl.) eingefügt. Dabei ist darauf zu achten, dass der spezifisch zu deletierende Bereich an beiden Seiten eine LoxP-Sequenz besitzt. Der nun von den LoxP-Sequenzen eingerahmte Bereich wird als gefloxt bezeichnet. Dies allein reicht jedoch nicht zur Inaktivierung des Gens. Um das Gen ausschalten zu können, ist eine zweite Mauslinie von Nöten: die sogenannte Cre-Linie. Hierbei wird die Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 spezifisch unter einem bestimmten Promotor (z.B. für Neuronen) exprimiert. Durch die Cre-Rekombinase wird die Rekombination der gefloxten Sequenz vermittelt und es kommt zu einem Ausschneiden des Zielabschnitts (Lewandoski, 2001). So wird die Inaktivierung in einem bestimmten Gewebe ermöglicht. Um auch die spezifische Inaktivierung zu einem gewünschten Zeitpunkt, z.B. nach der Geburt, zu erreichen, wird ein Fusionsgen bestehend aus Cre und einer mutierten Bindedomäne des Östrogenrezeptors verwendet (Hayashi & McMahon, 2002). Die Mutation verhindert eine Bindung des natürlichen Liganden Östrogen, wohingegen aber der synthetische Ligand 4-Hydroxytamoxifen binden kann. Durch Verabreichung von Tamoxifen kann das Protein in den Zellkern gelangen, wo es dann die Rekombination der „*loxP sites*“ vermittelt. Dies ist zu jedem beliebigen Zeitpunkt möglich (Danielian et al., 1998; Hayashi & McMahon, 2002). Um die Inaktivierung zu erreichen, müssen zunächst Tiere der Cre-Linie mit Tieren der gefloxten Linie verpaart werden. Als Nachkommen entstehen doppeltransgene Mäuse. Sie sind heterozygot für das Cre tragende, sowie für das gefloxt Allel. Durch weitere Verpaarungen dieser Tiere können Mäuse generiert werden, die für das gefloxt Allel homozygot und für das Cre Allel heterozygot sind. Dadurch erfolgt die Ablation des gewünschten

Zielgens in allen Zellen, in denen Cre exprimiert wird. Wurde ein induzierbares System verwendet, erfolgt die Ablation nach Zugabe von Tamoxifen. Ein Beispiel für die Verpaarung zur Generierung einer induzierbaren Knockoutlinie findet sich in Abbildung 41 in Kapitel 5.2.2 des Material und Methoden Teils dieser Arbeit.

1.7 Zielsetzung

Welche molekularen Mechanismen tragen zur Entwicklung des Gehirns bei? Welche Faktoren bestimmen die neuronale Identität einer Zelle? Obwohl in den letzten Jahren viele Transkriptionsfaktoren identifiziert und beschrieben wurden, die an der Entwicklung des Mittelhirns, sowie der transkriptionalen Kontrolle zur Festlegung der neuronalen Identität beteiligt sind, wurden noch immer nicht alle Faktoren und deren Funktion entschlüsselt. Wie bereits in Kapitel 1.5.1 erwähnt, liefert die frühe Expression von *Uncx4.1* im Mittelhirn muriner, ebenso wie avianer Embryonen Hinweise auf eine konservierte Funktion im embryonalen Mittelhirn von Vertebraten (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997; Schrägle et al., 2004). Dennoch wurde bis zum heutigen Zeitpunkt keine Funktionsstudie von *Uncx4.1* in diesem Gehirnareal durchgeführt.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass *Uncx4.1* in neuronalem Gewebe exprimiert wird. So zeigten schon Saito et al., dass die Expression von *Uncx4.1* in allen neuronalen Subgruppen des Bulbus olfactorius detektiert werden kann (Saito et al., 1996). Diese Ergebnisse konnten in einer neueren Studie bestätigt und spezifiziert werden (Sammeta et al., 2010). In dieser Arbeit sollte zunächst die Expression von *Uncx4.1* im Mittelhirn muriner Embryonen untersucht und charakterisiert werden. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalyse deuten, ebenso wie die Ergebnisse im Bulbus olfactorius darauf hin, dass *Uncx4.1* unabhängig von dem neuronalen Subtyp im Mittelhirn exprimiert wird.

Hieraus ergab sich die Fragestellung, welche Funktion *Uncx4.1* in den verschiedenen Neuronengruppen des Mittelhirns ausübt. Zur Klärung dieser Frage wurden Mittelhirne *Uncx4.1*-defizienter Mausembryonen (Kap. 5.2.1) untersucht. Die Krankheit Morbus Parkinson ist mit dem Verlust dopaminergener Neuronen der Substantia nigra assoziiert. Daher wurde in dieser Arbeit vornehmlich die Rolle von *Uncx4.1* während der dopaminergen Neurogenese analysiert. Um zu untersuchen, ob die Population der dopaminergen Neuronen in adulten Tieren bei Abwesenheit von *Uncx4.1* beeinträchtigt ist, wurde neben der globalen *Uncx4.1*-Knockoutlinie noch eine konditionale *Uncx4.1*-Knockoutlinie in die Betrachtung mit einbezogen. Zur besseren Einsicht der Rolle von *Uncx4.1* bei der Entwicklung dopaminergener Neuronen, wurden auch embryonale Mittelhirne *Lmx1a*- und *Ngn2*-defizienter Tiere (Kap. 5.2.1) hinsichtlich der Expression von *Uncx4.1* untersucht, da *Ngn2* und *Lmx1a* wichtige Funktionen während der dopaminergen Neurogenese zukommen.

Um Aufschluss darüber zu erlangen, welche Rolle *Uncx4.1* während der GABAergen, sowie glutamatergen Neurogenese spielt, sollten zudem die Konsequenzen des *Uncx4.1* Verlustes hinsichtlich dieser neuronalen Subgruppen analysiert werden. Aufgrund der Expression von *Pax6* in einer Subgruppe der glutamatergen Neuronen und den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, wurde zusätzlich eine *Pax6*-Knockoutlinie (Kap. 5.2.1) analysiert.

Der Verlust des *Unc-4* Gens in *C. elegans* führt zu Defekten bei der Innervierung der Axone zu den Motorneuronen. Außerdem konnten Asbruek et al. (2006) zeigen, dass die Deletion von *Uncx4.1* im murinen Vorderhirn ebenfalls zu axonalen Defekten führt. Daher war die Analyse *Uncx4.1*-defizienter Mausembryonen hinsichtlich axonaler Defekte im Mittelhirn ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

2 Ergebnisse

2.1 Expressionsanalyse von *Uncx4.1* im embryonalen Mittelhirn der Maus

2.1.1 *Uncx4.1* ist in der Mantelzone des Mittelhirns exprimiert

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1* in den Somiten, der Niere sowie dem Nervensystem von Säugetieren exprimiert ist (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997). Die ersten niedrigen Expressionslevel von *Uncx4.1* im Mesencephalon, können bereits ab E9.5 detektiert werden (Mansouri et al., 1997). Um weitere Kenntnisse über die Expression von *Uncx4.1* im Mittelhirn der Maus zu gewinnen, wurde eine detaillierte Expressionsstudie durchgeführt. Die Detektion des *Uncx4.1*-Proteins erfolgte mittels Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten von WT-Embryonen oder mittels X-Gal Färbung heterozygoter *Uncx4.1^{lacZ/+}* Embryonen. Die Expressionsanalyse zeigt, dass *Uncx4.1* bereits ab E10.5 im ventralen, sowie dorsalen Mittelhirn exprimiert ist (Abb. 9, A-B). Zu diesem Zeitpunkt ist die Expression auf die Mantelzone der Basal- und Alarplatte (BP, AP) beschränkt, während keine Transkripte in der Boden- (GP) oder Deckplatte (DP) detektiert werden können (Abb. 9, A-B). Am Embryonaltag 11.5 ist *Uncx4.1* auch in der Bodenplatte detektierbar und somit fast in der gesamten Mantelzone des Mittelhirns exprimiert (Abb. 9, D). In der späteren Embryonalentwicklung können Transkripte von *Uncx4.1* weiterhin nur noch in Teilbereichen der Mantelzone detektiert werden (Abb. 9, E-F). An E13.5 und E17.5 liegen *Uncx4.1* positive und *Uncx4.1*-negative Zellen in einem Salz-und-Pfeffer (engl. „*salt-and-pepper*“) Muster in der Mantelzone vor (Abb. 9, E und G). Die Abwesenheit von *Uncx4.1*-Transkripten in der proliferativen Zone führte zu der Annahme, dass *Uncx4.1* nur in postmitotischen Zellen exprimiert ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Antikörperfärbung von *Uncx4.1* zusammen mit β -Tubulin III (Tuj1), einem Marker postmitotischer Neuronen, durchgeführt (Ferreira & Caceres, 1992). Die Analyse zeigt, dass *Uncx4.1* an E11.5 nahezu in allen Zellen mit Tuj1 co-lokalisiert ist (Abb. 9, F, H und I). Im dorsalen Mittelhirn können allerdings einige wenige Zellen detektiert werden, die zwar *Uncx4.1*, nicht jedoch Tuj1 exprimieren (Pfeile in Abb. 9, H). Zusammengefasst zeigt die Expressionsanalyse, dass *Uncx4.1* nicht von neuronalen Vorläufern, sondern von postmitotischen Neuronen in der Mantelzone des Mittelhirns exprimiert wird.

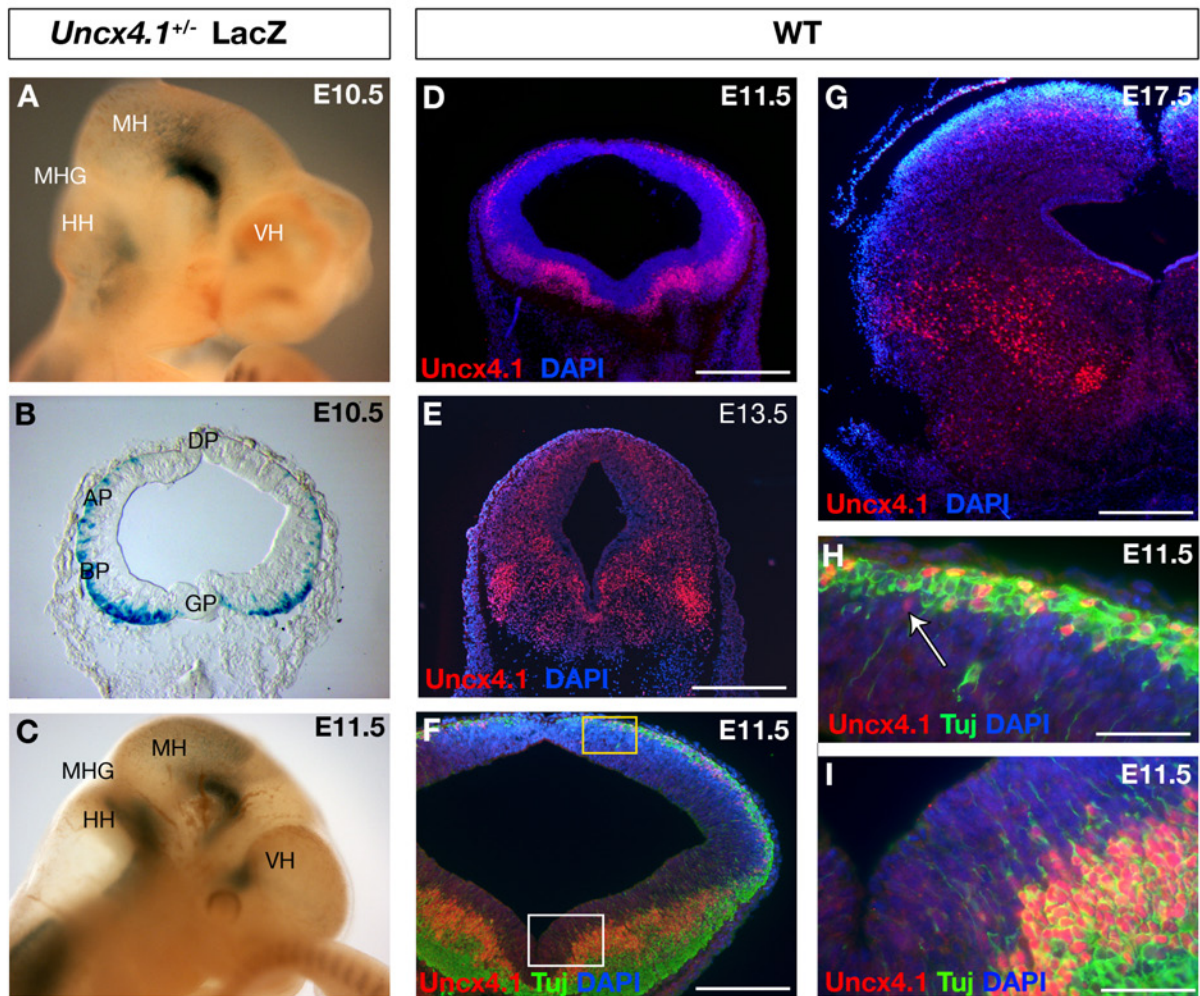


Abb. 9: Expression von *Uncx4.1* im Mittelhirn der Maus. (A-C) LacZ-Färbung *Uncx4.1* heterozygoter Mausembrantanten an E10.5 (A, B) und E11.5 (C). (B) LacZ-Färbung von coronalen Gewebeschnitten des embryonalen Stadiums 10.5. (D-G) IHC von coronalen Gewebeschnitten von Wildtyp-Embryonen mit anti-*Uncx4.1* (rot) der Stadien E11.5 (D) E13.5 (E) und E17.5 (G). (F, H, I) Immunfluoreszenzfärbung von coronalen Gewebeschnitten des Stadiums E11.5. mit anti-*Uncx4.1* (rot) und Tuj1 (grün). (H) stärkere Vergrößerung des gelben Ausschnitts. (I) Vergrößerung des weißen Ausschnitts. Der Pfeil deutet auf *Uncx4.1*-positive und Tuj1-negative Zellen. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI. Maßstabsbalken = 500 μm (D, E, F, G). Maßstabsbalken = 100 μm (H, I). VH: Vorderhirn, MH: Mittelhirn, HH: Hinterhirn, MHG: Mittel-Hinterhirn-Grenze, AP: Alarplatte, DP: Deckplatte, BP: Basalplatte, GP: Bodenplatte.

2.1.2 *Uncx4.1* ist in allen neuronalen Subtypen des embryonalen Mittelhirns exprimiert

Im embryonalen Mittelhirn der Maus gibt es verschiedene Regionen in denen neuronale Vorläuferzellen auftreten. Von ihnen wird angenommen, dass sie in unterschiedliche neuronale Subtypen differenzieren (Nakatani et al., 2007; Ono et al., 2007; Prakash et al., 2009). Da *Uncx4.1* an E11.5 in der Mantelzone des gesamten Mittelhirns exprimiert ist (Abb. 9, D), liegt die Vermutung nahe, dass dessen Expression nicht auf einen neuronalen Subtypen begrenzt ist. Zudem

weisen die meisten Tuj1-positiven Zellen an E11.5 auch eine Co-Lokalisation mit *Uncx4.1* auf (Abb. 9, F, H und I).

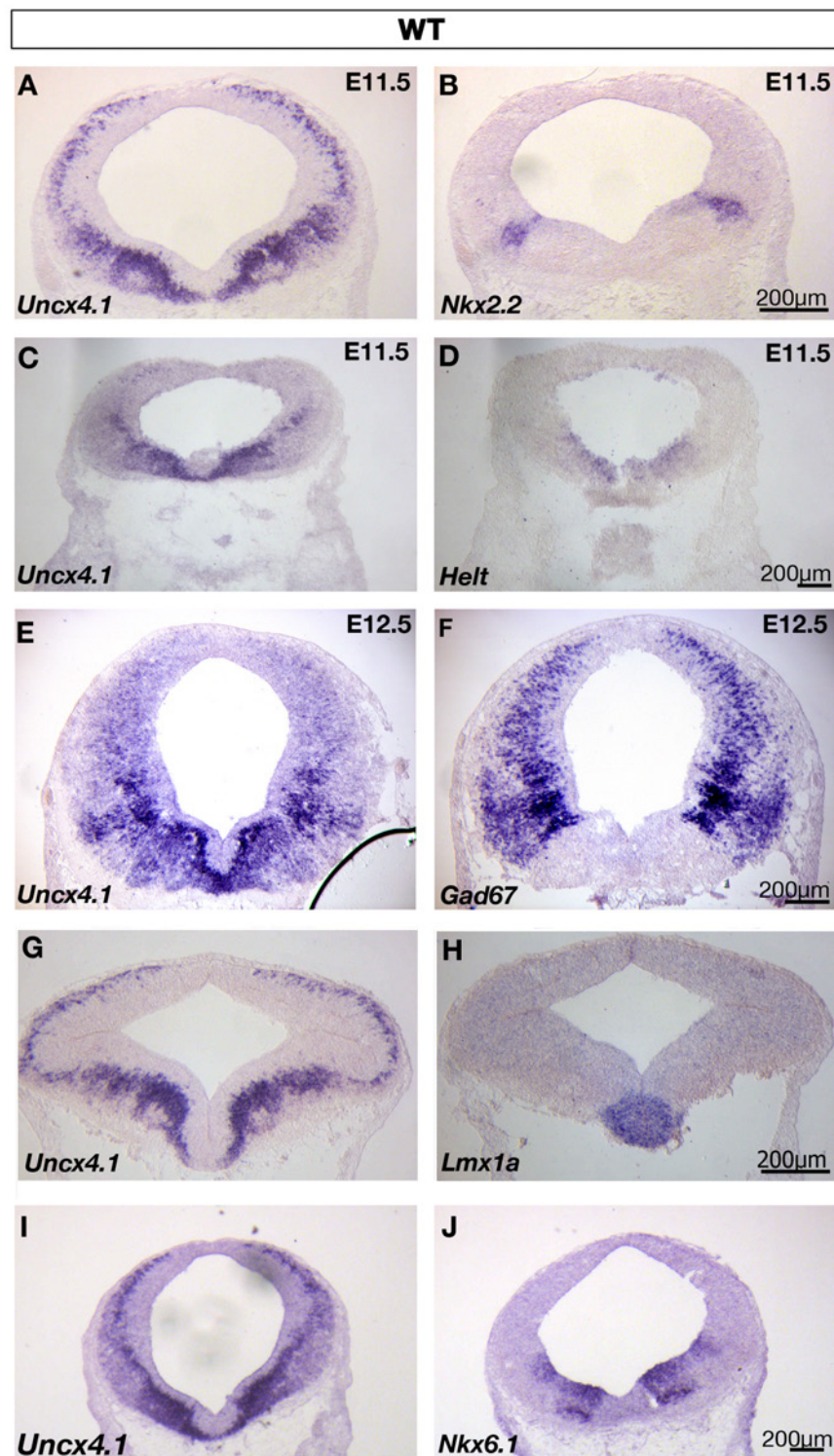


Abb. 10: ISH von *Uncx4.1*-mRNA und verschiedener neuronaler Marker in E11.5 und E12.5 Wildtyp-Gehirnen. (A-J) Expression von *Uncx4.1* (A, C, E, G und I) und *Nkx2.2* (B), *Helt* (D), *Gad67* (F), *Lmx1a* (H) und *Nkx6.1* (J) auf alternierenden Schnitten. Die Bilder E-H wurden von Dr. G. Griesel zur Verfügung gestellt.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Expression von *Uncx4.1* mit spezifischen Mar-

kern neuronaler Subtypen auf alternierenden Gewebeschnitten verglichen. Als genereller Marker GABAerger Neuronen diente *Gad67* (Glutamat-Decarboxylase 1, Isoform mit 67kD), ein Enzym dass in der Biosynthese des Transmitters GABA involviert ist (Erlander et al., 1991). *Gad67* zeigt ein vollständig überlappendes Expressionsmuster mit *Uncx4.1* an E12.5 (Abb. 10, E-F), was darauf hindeutet, dass *Uncx4.1* zu diesem Zeitpunkt in GABAergen Neuronen exprimiert wird. Bestätigt wird dies durch die überlappende Expression von *Nkx2.2* mit *Uncx4.1* in Zellen der Mantelzone an E11.5 (Abb. 10, A-B). *Nkx2.2* ist an E11.5 in einer Untergruppe GABAerger Neuronen, sowie in Pax6-positiven glutamatergen Neuronen exprimiert (Kala et al., 2009). Der Marker *Helt*, der ausschließlich in proliferierenden GABAergen Neuronen des Mittelhirns an E11.5 exprimiert ist (Nakatani et al., 2007), zeigt keine Überlappung der Expressionsdomänen von *Uncx4.1*. Die Ergebnisse weisen zusammenfassend auf eine Expression von *Uncx4.1* in GABAergen Neuronen des Mittelhirns hin.

Zur Analyse glutamaterger Neuronen wurde die Expression von *Nkx6.1* mit der von *Uncx4.1* verglichen. *Nkx6.1* ist in glutamatergen Neuronen der Basalplatte exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle während der Entwicklung Brn3a-positiver Neuronen des Nucleus ruber (Prakash et al., 2009). Der Expressionsvergleich zeigt eine vollständige Überlappung von *Nkx6.1* und *Uncx4.1* in der Mantelzone der Basalplatte (Abb. 10, I-J), was den Schluss zulässt, dass *Uncx4.1* neben GABAergen Neuronen auch in glutamatergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert ist. Die dopaminergen Neuronen des Mittelhirns sind im ventralen Teil, der Bodenplatte, sowie in Teilen der angrenzenden Basalplatte lokalisiert. Als Marker dopaminergener Neuronen wurde *Lmx1a* verwendet. Auch hier ließ sich eine Überlappung von *Uncx4.1* und *Lmx1a* in der Mantelzone des ventralen Mittelhirns feststellen (Abb. 10, G-H).

Aus der Analyse dieser Expressionsmuster lässt sich folgern, dass *Uncx4.1* in allen neuronalen Subtypen des Mittelhirns exprimiert wird. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden Doppel-färbungen von *Uncx4.1* und spezifischen Markern durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass *Uncx4.1* in einigen Zellen mit *Ngn2* co-lokalisiert. Doppelpositive Zellen finden sich sowohl im dorsalen (Abb. 11, A und C), als auch im ventralen Mittelhirn (Abb. 11, B und D) und deuten auf eine Expression von *Uncx4.1* in dopaminergen und glutamatergen Neuronen hin. Die Co-Lokalisation von *Uncx4.1* mit TH, einem Marker reifer dopaminergener Neuronen, und *Foxa2* (Abb. 11, E), bestätigt, dass *Uncx4.1* in dopaminergen, glutamatergen und GABAergen Neuronen exprimiert wird (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Ferri et al., 2007). Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Expression von *Uncx4.1* nicht auf einen neuronalen Subtyp

begrenzt ist, sondern in nahezu allen Neuronengruppen des Mittelhirns exprimiert wird.

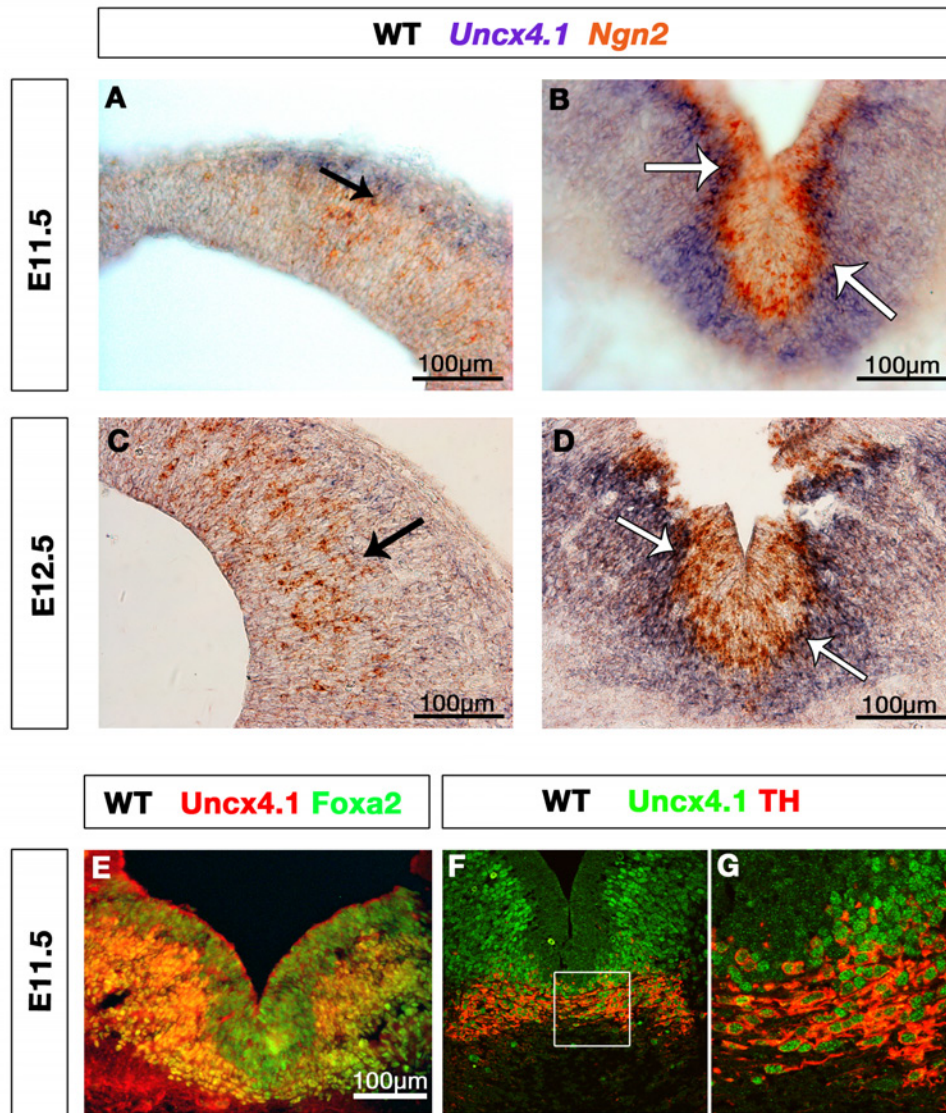


Abb. 11: *Uncx4.1* ist in dopaminergen, glutamatergen und GABAergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert. (A-D) Doppel-ISH von *Ngn2* (orange) und *Uncx4.1* (violett) auf coronalen Gefrierschnitten von Mausembryonen an E11.5 (A-B) und E12.5 (C-D). (A, C) Zeigt einen Ausschnitt des dorsalen Mittelhirns. (B, D) Zeigt einen Ausschnitt des ventralen Mittelhirns. Die schwarzen Pfeile deuten auf *Uncx4.1* und *Ngn2* doppelpositive Zellen im dorsalen Mittelhirn (A, C). Die weißen Pfeile deuten auf *Uncx4.1* und *Ngn2* co-positive Zellen im ventralen Mittelhirn. (E) zeigt eine IHC an E11.5 gegen anti-*Uncx4.1* (rot) und anti-*Foxa2* (grün). Gelbe Zellen sind co-positiv für *Uncx4.1* und *Foxa2*. (F, G) Konfokale Aufnahmen einer IHC auf Gewebeschnitten von Wildtypembryonen an E11.5 mit anti-*Uncx4.1* (grün) und anti-*TH* (rot). *Uncx4.1* und *TH* zeigen eine Co-Lokalisation im ventralen Mittelhirn. (G) Vergrößerung des Ausschnitts in (F).

2.2 Untersuchungen zur Funktion von *Uncx4.1* während der Entwicklung dopaminergener Neuronen im Mittelhirn

Die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* zeigt, dass *Uncx4.1* an E11.5 mit TH co-lokalisiert ist (Abb. 11, F). Zusätzlich konnten *Uncx4.1/Ngn2*, sowie *Uncx4.1/Foxa2* doppelpositive Zellen im ventralen Mittelhirn detektiert werden (Abb. 11, B, D und E). Diese Ergebnisse suggerieren, dass *Uncx4.1* eine Rolle während der Entwicklung dopaminergener Neuronen des Mittelhirns spielt. Um dies zu untersuchen, wurden die dopaminergen Neuronen des Mittelhirns *Uncx4.1*-defiziente Tiere analysiert. Zudem wurden *Lmx1a*^{-/-}- und *Ngn2*^{-/-}- Mausembryonen mit in die Betrachtung einbezogen um weitere Erkenntnisse über die Rolle von *Uncx4.1* während der dopaminergen Neurogenese zu erlangen.

2.2.1 Der Verlust von *Uncx4.1* führt zu einer Reduzierung dopaminergener Neuronen im ventralen Mittelhirn

Zunächst wurde eine IHC mit anti-TH der Stadien E11.5 und E17.5 durchgeführt (Abb. 12, A-F). Die Domäne der TH-Expression ist in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen nicht verändert. So können TH-positive Neuronen in der VTA, sowie SN detektiert werden (Abb. 12, A-F). Dennoch ist die Anzahl der TH-positiven Zellen an E11.5 und E17.5 um ca. 26 % reduziert (Abb. 12, G).

Um aufzuklären, ob die Inaktivierung von *Uncx4.1* sich nur auf die Expression von TH auswirkt, oder ob die Anzahl dopaminergener Neuronen im Allgemeinen verringert ist, wurde die Expression weiterer dopaminergener Marker an E16.5 oder E17.5 analysiert. Neben TH ist auch die Expression des Dopamintransporters (DAT) in der VTA und SN in Abwesenheit von *Uncx4.1* vermindert (Abb. 13, A-B). Weiterhin konnte der Verlust der dopaminergen Neuronen mit Antikörperfärbungen gegen Pitx3, Nurr1, Calbindin und Calretinin nachgewiesen werden. Pitx3 ist spezifisch in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert (Smidt et al., 1997, 2004; Maxwell et al., 2005). Die Reduzierung Pitx3- und Nurr1-positiver Zellen ähnelt der TH-positiver Zellen (-31 % bei Pitx3 und - 24 % bei Nurr1, Abb. 13, C-D, E-F und K). Anders verhält es sich mit der Anzahl Calbindin- und Calretinin-positiver Zellen in der Abwesenheit von *Uncx4.1*. So liegt bei Calbindin eine Reduzierung von 43 % vor (Abb. 13, G-H, K), während die Anzahl Calretinin-positiver Zellen um 58 % vermindert ist (Abb. 13, I-J, K).

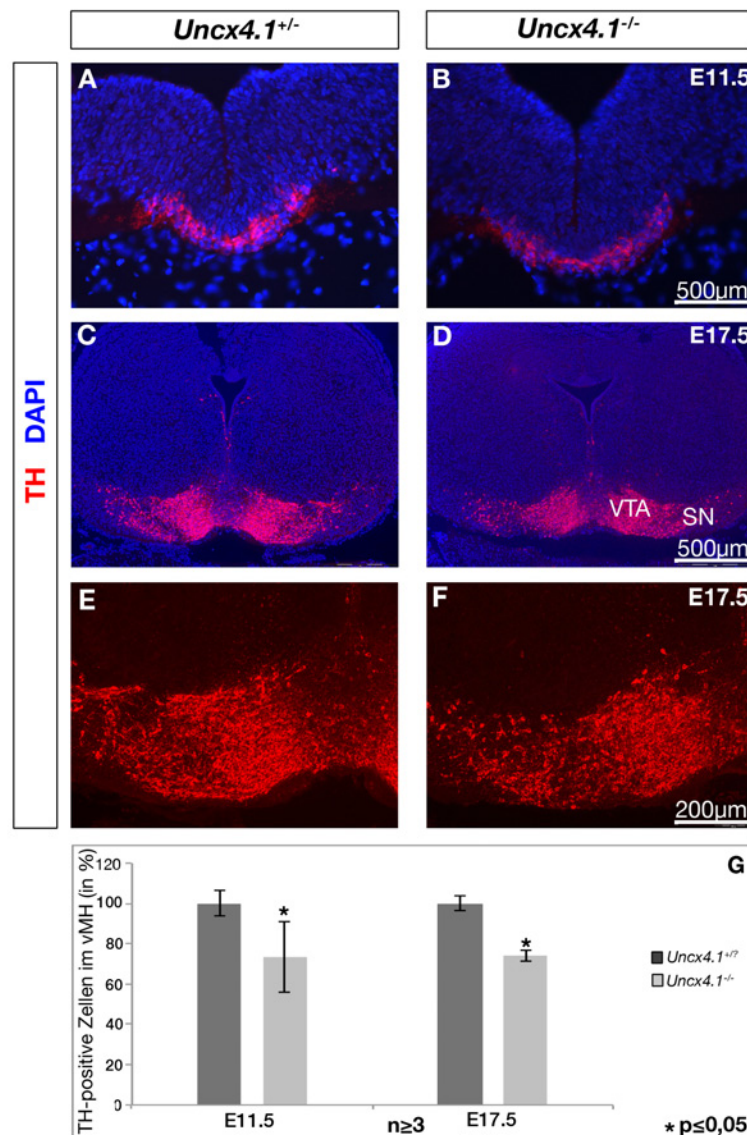


Abb. 12: Die Expression von TH ist in *Uncx4.1* homozygoten Embryonen reduziert. (A-F) IHC von *Uncx4.1*^{-/-} und Kontrollembryonen an E11.5 (A-B) und E17.5 (C-F). (G) Statistische Auswertung der TH-positiven Zellen in Kontrolltieren und *Uncx4.1*-Mutanten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Für die Ermittlung des p-Wertes wurde der „Student's t-test“ angewendet. SN: Substantia nigra, vMH: ventrales Mittelhirn, VTA: Ventrales tegmentales Areal.

Calbindin und Calretinin sind unter anderem in spezifischen Subgruppen von mDA Neuronen, welche hauptsächlich in der VTA lokalisiert sind, detektierbar (Liang et al., 1996; Nemoto et al., 1999). Die starke Reduzierung Calbindin- und Calretinin-positiver Zellen deutet darauf hin, dass die Neuronen der VTA stärker betroffen sind als die der SN. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Inaktivierung von *Uncx4.1* in einem Verlust der mDA Neuronen resultiert.

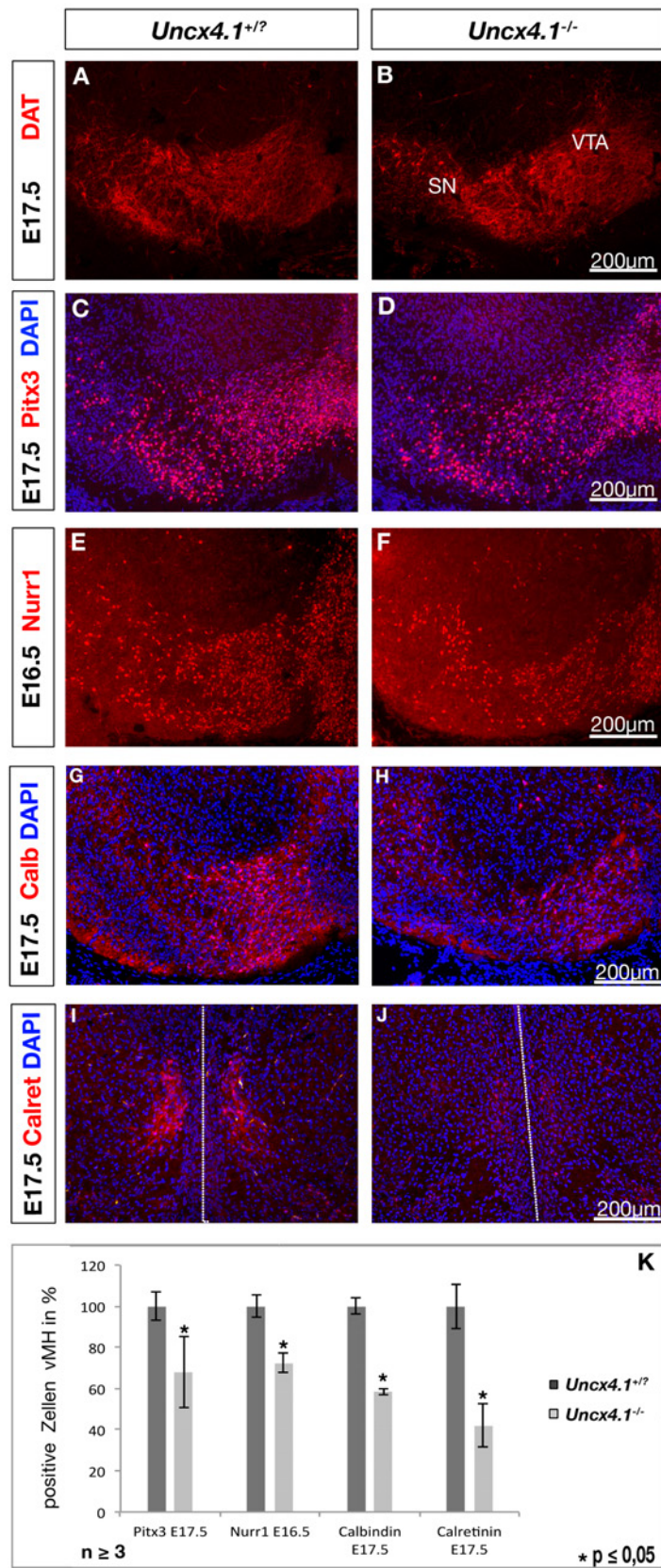


Abb. 13: Die Anzahl dopaminergener Neuronen des ventralen Mittelhirns ist in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen reduziert. IHC coronale Gewebeschnitte von Mausembryonen an E17.5 mit anti-DAT (A-B), anti-Pitx3 (C-D), anti-Calbindin (G-H) und anti-Calretinin (I-J). (E-F) IHC mit anti-Nurr1 an E16.5 auf coronalen Gewebeschnitten. (K) Quantifizierung der verwendeten Marker. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit dem „student's t-test“ ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert die Mittellinie des MH. VTA: Ventrales tegmentales Areal, SN: Substantia nigra, vMH: ventrales Mittelhirn.

2.2.2 In Abwesenheit von *Uncx4.1* ist keine vermehrte Apoptose im Mittelhirn detektierbar

Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *Uncx4.1* zu einer vermehrten Apoptose bei den Zellen des Bulbus olfactorius führt (Sammeta et al., 2010). Um zu ermitteln, ob ebenfalls eine erhöhte apoptotische Aktivität in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen der Reduzierung der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns zu Grunde liegt, wurde der sogenannte TUNEL-Test durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, apoptotische Zellen zu detektieren (Gavrieli et al., 1992). Die Analyse von E11.5 (Abb. 14) und E17.5 (Daten nicht gezeigt) alter Embryonen zeigt jedoch weder im ventralen noch im dorsalen Mittelhirn eine Veränderung in der Anzahl apoptotischer Zellen verglichen mit WT-Embryonen. Eine Inaktivierung von *Uncx4.1* führt somit nicht zu einer vermehrten Apoptose im Mittelhirn, so dass die Reduzierung der dopaminergen Neuronen nicht durch verstärkte Apoptose erklärbar ist. Der Verlust könnte daher entweder auf Störungen in der Differenzierung der mDA Neuronen zurückzuführen sein, oder auf eine Veränderung des Zellschicksals in einen anderen Neuronen- oder Zelltyp.

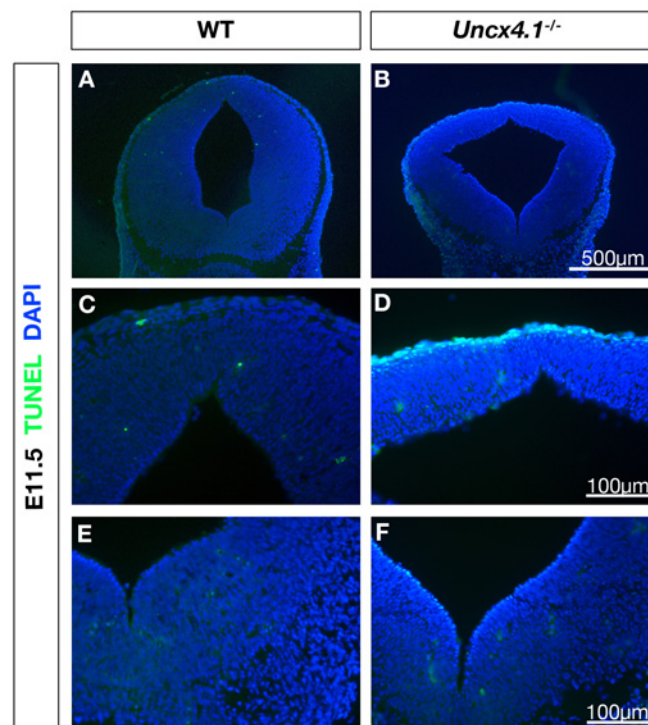


Abb. 14: Der Funktionsverlust von *Uncx4.1* hat keinen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Zellen im ventralen Mittelhirn. TUNEL-Test zum Nachweis apoptotischer Zellen auf Gewebeschnitten von WT und *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen des Embryonalstadiums 11.5. (A-B) zeigt eine coronale Ansicht des Mittelhirns. (C) und (D) zeigen eine Vergrößerung des dorsalen Mittelhirns, während (E) und (F) eine Vergrößerung des ventralen Mittelhirns zeigen. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

2.2.3 Die Proliferation und Differenzierung des neuronalen Gewebes ist im Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Mausembryonen nicht gestört

BrdU ist ein Thymidinanalogon, das Zellen in der Replikations-Phase detektiert. Daher wurde die Proliferation *Uncx4.1*-defizienter Embryonen mittels BrdU-Färbung analysiert. Sowohl in *Uncx4.1*-Mutanten, als auch in Kontrolltieren können BrdU-positive Zellen entlang der ventrikulären Zone des Mittelhirns nachgewiesen werden (Abb. 15, A-B). Des Weiteren konnte kein Unterschied in der Anzahl der BrdU-positiven Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

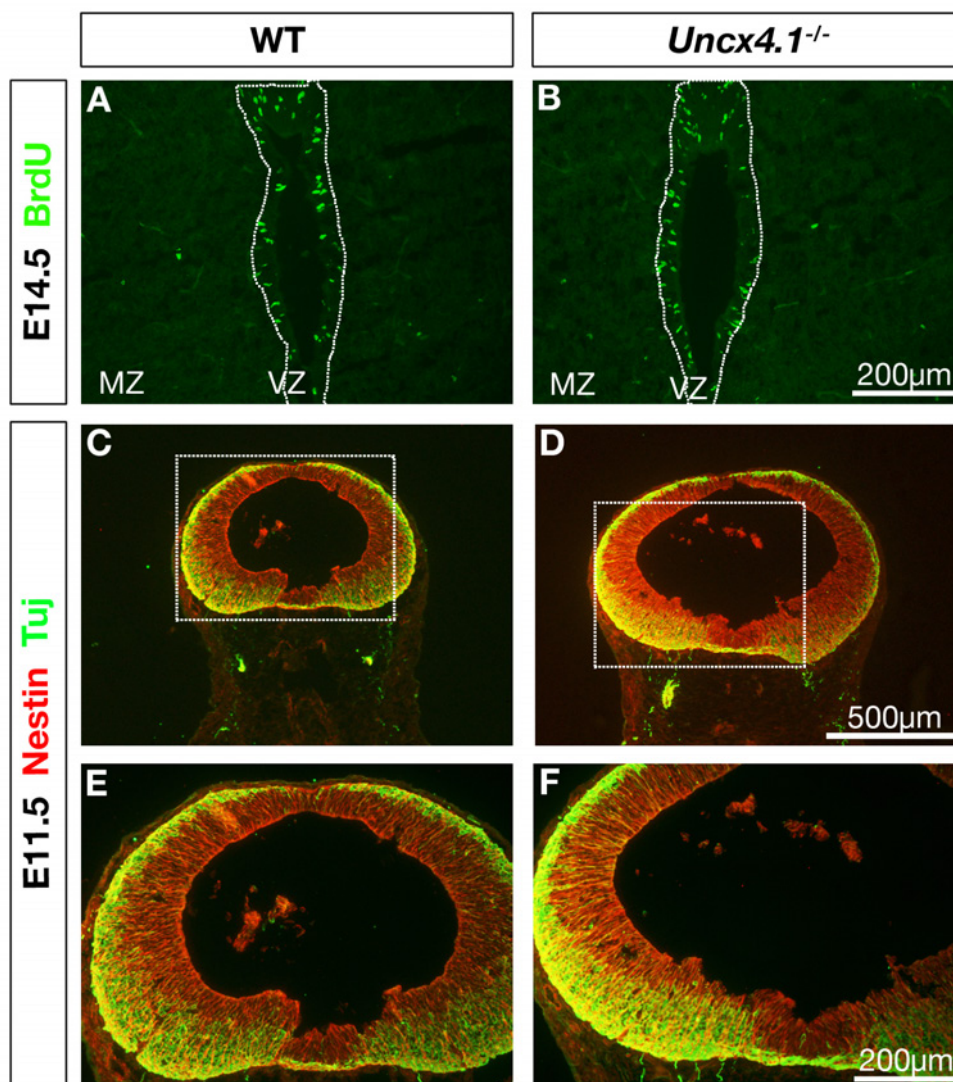


Abb. 15: Weder die Proliferation noch die Differenzierung der Neuronen im Mittelhirn ist in der Abwesenheit von *Uncx4.1* beeinflusst. (A-B) Nachweis proliferierender Zellen mittels BrdU-Färbung auf coronalen Kryoschnitten von WT und *Uncx4.1*^{-/-} Mausembryonen des Embryonalstadiums 14.5. (C-F) IHC mittels anti-Nestin (rot) und anti-Tuj1 (grün). Nestin und Tuj1 doppelpositive Zellen sind gelb angefärbt. (E-F) zeigen Vergrößerungen des Ausschnitts in (C-D). Die weiße Linie in (A) und (B) grenzt die ventrikuläre Zone von der Mantelzone ab. VZ: ventrikuläre Zone, MZ: Mantelzone.

Um sicherzustellen, dass der Funktionsverlust von *Uncx4.1* nicht in einer verzögerten Differenzierung neuronaler Zellen resultiert und dies zum Verlust der dopaminergen Neuronen führt, wurde eine Doppelfärbung gegen Nestin und Tuj1 durchgeführt. Nestin ist ein Marker neuronaler Vorläuferzellen (Lendahl et al., 1990), während Tuj1, wie bereits in Kapitel 2.1.1 erwähnt, als Marker postmitotischer Neuronen verwendet werden kann. Die Analyse coronaler Gewebeschnitte *Uncx4.1*-defizienter Embryonen des Embryonalstadiums 11.5 ergab keine Unterschiede in den beiden Färbungen verglichen mit Kontrollembryonen. Daraus lässt sich schließen, dass keine verzögerte Differenzierung in der Abwesenheit von *Uncx4.1* vorliegt. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Inaktivierung von *Uncx4.1* keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation oder die neuronale Differenzierung im Mittelhirn hat.

2.2.4 Die Positionierung dopaminergener und serotonergener Neuronen an der MHG ist in Abwesenheit von *Uncx4.1* nicht beeinträchtigt

Die Expressionsdomänen der dopaminergen und serotonergen Neuronen an der MHG grenzen sich deutlich voneinander ab und zeigen keine Überlappung (Ye et al., 1998). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Inaktivierung verschiedener Gene in einer Verschiebung der Expressionsgrenze in Richtung der Domäne der jeweils anderen Neuronenpopulation resultiert (Blaess et al., 2006; Griesel et al., 2006). Da die dopaminergen Neuronen des ventralen Mittelhirns in Abwesenheit von *Uncx4.1* reduziert sind und dieser Verlust nicht auf vermehrte Apoptose oder Proliferationsdefekte zurückzuführen ist, wurde überprüft ob eine ektopische Expression serotonergener Neuronen in der Domäne der dopaminergen Neuronen vorliegt. Die Ergebnisse der Doppelimmunfärbung gegen TH (dopaminerge Neuronen) und 5-HT (serotonerge Neuronen) zeigen, dass die Grenzen der Expressionsdomänen dopaminergener und serotonergener Neuronen normal etabliert sind und keine ektopische Expression von 5-HT im Mittelhirn vorliegt. Hingegen kann eine leichte Erhöhung 5-HT-positiver, serotonergener Neuronen im Hinterhirn verzeichnet werden (Abb. 16, C-E) und es liegt eine dorsale Expansion der serotonergenen Neuronen im caudalen Hinterhirn vor (Abb. 16, Pfeile in C und D). Die statistische Auswertung ergab jedoch, dass die beobachtete Erhöhung nicht signifikant ist. Eine Tendenz ist aber dennoch erkennbar und lässt auf eine Beteiligung von *Uncx4.1* während der Entwicklung serotonergener Neuronen des Hinterhirns schließen.

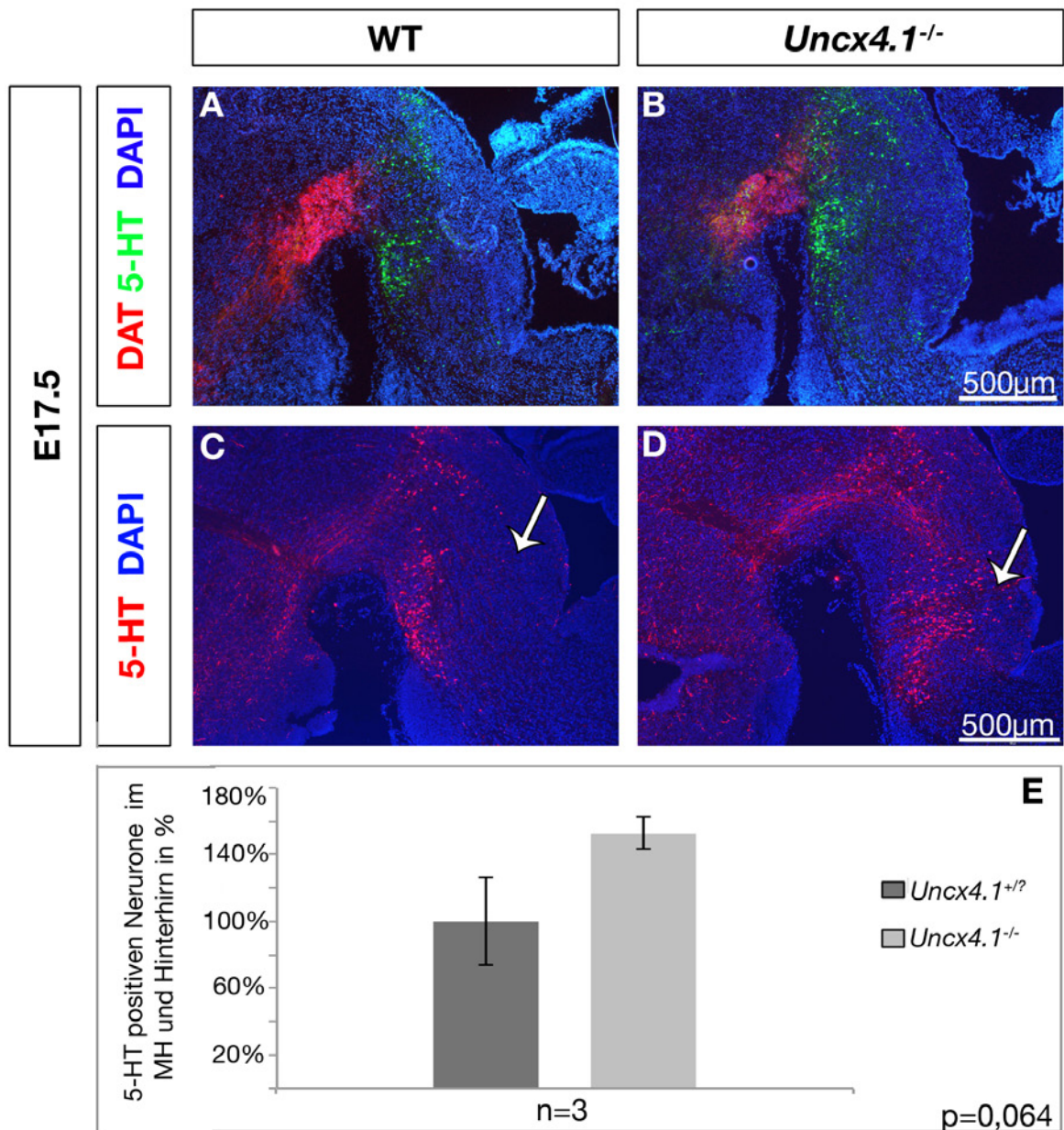


Abb. 16: Dopaminerge und serotonerge Neuronen weisen in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen unveränderte Expressionsdomänen an der MHG auf. (A-B) Doppel-IHC gegen DAT (rot) und 5-HT (grün) auf sagittalen Gewebeschnitten von Mausembryonen an E17.5. (C-D) IHC gegen 5-HT auf sagittalen Gewebeschnitten E17.5 alter *Uncx4.1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren. (E) Statistische Analyse der Anzahl 5-HT positive Neuronen. Die Fehlerbalken in (E) zeigen die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mittels „student's t-test“ ermittelt. Die Pfeile deuten auf den Bereich, in dem die dorsale Expansion 5-HT positiver Neuronen detektierbar ist. MH: Mittelhirn.

2.2.5 Expressionsanalyse von *Lmx1a*, *Foxa2*, *Ngn2*, *Nurr1* und *Mash1* im ventralen Mittelhirn von *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der dopaminergen Neuronen im ventralen Mittelhirn nicht auf Proliferationsdefekte, eine vermehrte Apoptose oder eine Verschiebung der serotonergen Neuronen zurückzuführen ist. Um zu untersuchen, was die Reduzierung der dopaminergen Neuronen im Mittelhirn verursacht, wurden verschiedene neuronale Marker analysiert, die bereits in der frühen Entwicklung der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns eine entscheidende Rolle spielen. Der Transkriptionsfaktor *Lmx1a* ist bereits in den Vorläufern dieser Neuronen an E9.5 exprimiert (Andersson et al., 2006b) und eine spontane Mutation führt zu dem Verlust der caudalen Deckplatte (Millonig et al., 2000). Andersson et al. (2006) zeigten, dass *Lmx1a* eine entscheidende Funktion als Schicksalsdeterminante während der Entwicklung der dopaminergen Neuronen zukommt.

Eine Expressionsanalyse von *Lmx1a* in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen zeigt keinen Unterschied im Vergleich zu WT Embryonen, weder an E11.0 noch an E12.5 (Abb. 17, A-D). Auch die Expression des Transkriptionsfaktors *Foxa2*, welcher für die korrekte Etablierung von mDA Neuronen notwendig ist (Lin et al., 2009; Mavromatakis et al., 2011; Nakatani et al., 2010), ist in Abwesenheit von *Uncx4.1* nicht beeinflusst. Das proneurale Gen *Ngn2* ist essenziell für die Differenzierung (Fode et al., 1998) und Spezifizierung (Parras et al., 2002; Ma et al., 1999; Scardigli et al., 2001) neuronaler Subpopulationen in verschiedenen Regionen des Nervensystems. Im Mittelhirn ist *Ngn2* notwendig für die Bildung der dopaminergen Neuronen und wird von den Vorläufern und unreifen dopaminergen Neuronen exprimiert (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006). In *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen ist eine deutliche Reduzierung der *Ngn2*-mRNA im ventralen (Abb. 17, G-H) und dorsalen (Abb. 28, I-J) Mittelhirn zu verzeichnen. Zudem ist der Verlust der Expression im ventralen Mittelhirn gleichmäßig, was bedeutet, dass die Zellen der ventrikulären Zone ebenso betroffen sind wie die der Mantelzone.

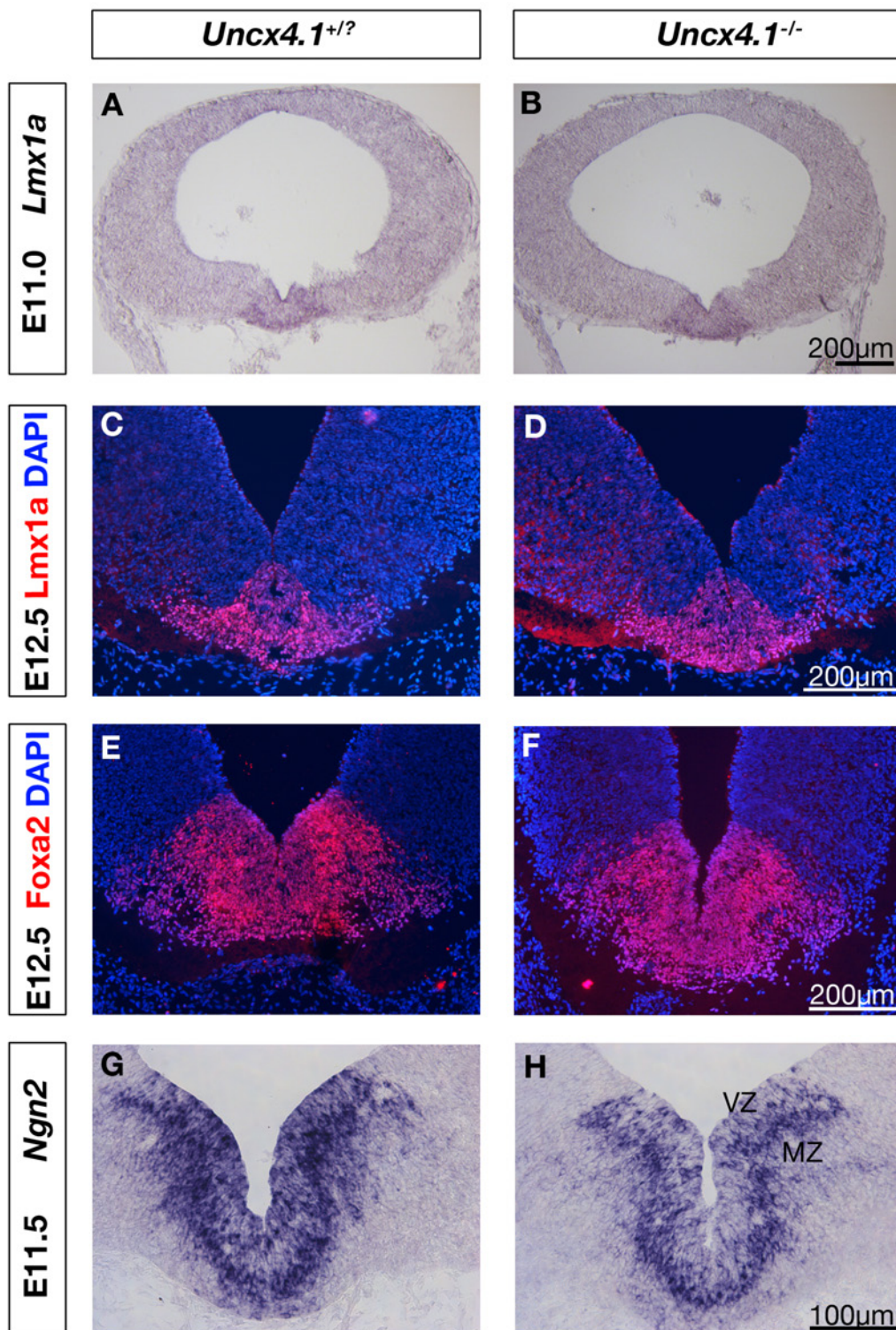


Abb. 17: Analyse spezifischer Marker, die während der Bildung der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns beteiligt sind. (A-D) Sowohl eine ISH gegen *Lmx1a* an E11.5 (A-B), als auch eine IHC mit anti-*Lmx1a* an E12.5 (C-D) auf coronalen Gewebeschnitten zeigen keine Veränderung in der Anzahl *Lmx1a*-positiver Neuronen in *Uncx4.1* defizienten Mäusen. (E-F) zeigen eine IHC mit anti-*Foxa2* an E12.5 auf coronalen Kryoschnitten. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI. (G-H) ISH von coronalen Gewebeschnitten des Embryonalstadiums 11.5 mit einer gegen *Ngn2* gerichteten Sonde.

In *Ngn2*^{-/-} Embryonen ist nahezu keine Expression von Nurr1 an E11.5 zu verzeichnen, allerdings kann an E13.5 eine Wiederherstellung Nurr1-positiver Zellen beobachtet werden (Kele et al., 2006). Dies deutet auf eine progressive Erneuerung dieser Zellen hin. Aufgrund der starken Reduzierung der *Ngn2*-mRNA wurde dieser Umstand auch in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen untersucht. Mittels IHC wird deutlich, dass die Anzahl Nurr1-positiver Zellen sowohl an E11.5 (Abb. 18, C-D) als auch an E16.5 (Abb. 18, E-F) reduziert ist. Eine statistische Analyse (Abb. 18, G) ergibt, dass der Verlust Nurr1-positiver Zellen an E11.5 ca. 28 % und an E16.5 ca. 23 % beträgt. Anders als in *Ngn2*-defizienten Mäusen ist keine Regeneration Nurr1-positiver Zellen in Abwesenheit von *Uncx4.1* detektierbar. Die Wiederherstellung Nurr1-positiver Zellen in *Ngn2*^{-/-} Embryonen kann durch die teilweise Regeneration des proneuralen Gens *Mash1* erklärt werden. So fehlt *Mash1* an E11.5 an der ventralen Mittellinie des Mittelhirns fast vollständig, während an E13.5 wieder Transkripte von *Mash1* detektierbar sind (Kele et al., 2006). In Abwesenheit von *Uncx4.1* sind keine Unterschiede in der Expression von *Mash1* festzustellen (Abb. 18, A-B).

Zusammenfassend weisen *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen keine veränderte *Lmx1a*, *Foxa2* oder *Mash1* Expression auf. Hingegen ist die Expression von *Ngn2* im ventralen Mittelhirn reduziert, während der Verlust der Nurr1-positiven Zellen in den untersuchten Entwicklungsstadien konstant bleibt.

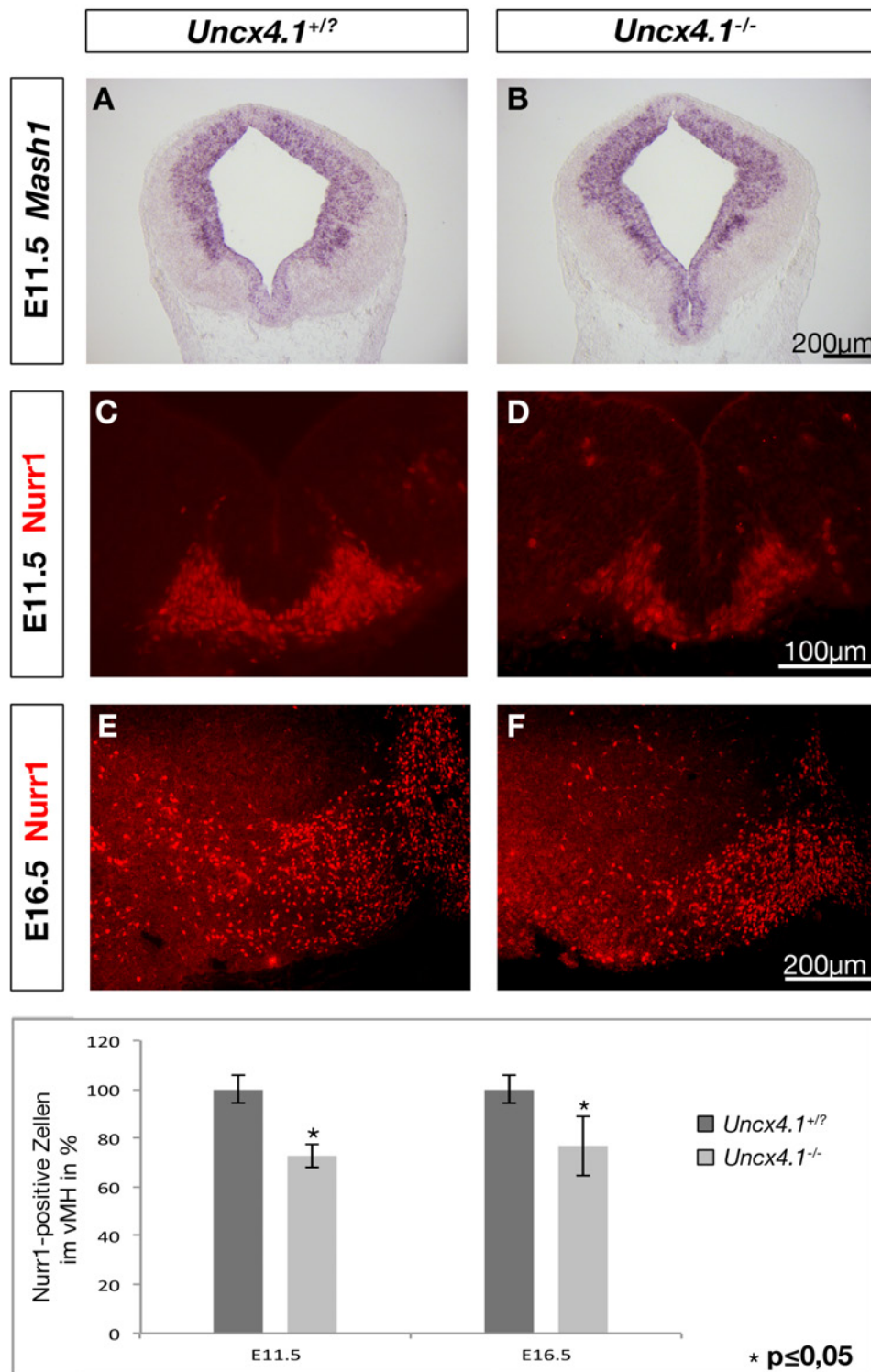


Abb. 18: Die Anzahl Nurr1-positiver Neuronen ist während der Entwicklung in Abwesenheit von *Uncx4.1* gleichbleibend. (A-B) ISH auf coronalen Gewebeschnitten des Embryonalstadiums 11.5 mit einer gegen *Mash1* gerichteten RNA-Sonde. (C-F) Antikörperfärbung mit anti-Nurr1 auf coronalen Gewebeschnitten von Mausembryonen des Stadiums E11.5 (C-D) und E16.5 (E-F). (G) Statistische Auswertung der Nurr1-positiven Zellen im ventralen Mittelhirn. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mit dem „student's t-test“ ermittelt, n=3. vMH: ventrales Mittelhirn.

2.2.6 Die Expression von *Uncx4.1* im Mittelhirn *Lmx1a*-defizienter Embryonen

Ein Verlust der *Uncx4.1*-Expression in *Lmx1a*-defizienten Embryonen könnte Hinweise darauf liefern, dass *Uncx4.1* in der Kaskade der Transkriptionsfaktoren, die während der Bildung der mDA Neuronen reguliert werden, abwärts von *Lmx1a* liegt. Eine IHC auf coronalen Gewebeschnitten *Lmx1a*-defizienter Embryonen gegen *Uncx4.1* zeigt, dass die Expression von *Uncx4.1* in Abwesenheit von *Lmx1a* nicht beeinflusst ist (Abb. 19, A-B). Da es sich um eine Knockin-Linie handelt, bei der anstelle von *Lmx1a* GFP exprimiert wird, zeigt die Expression von GFP an, wo normalerweise *Lmx1a*-Transkripte detektierbar sind.

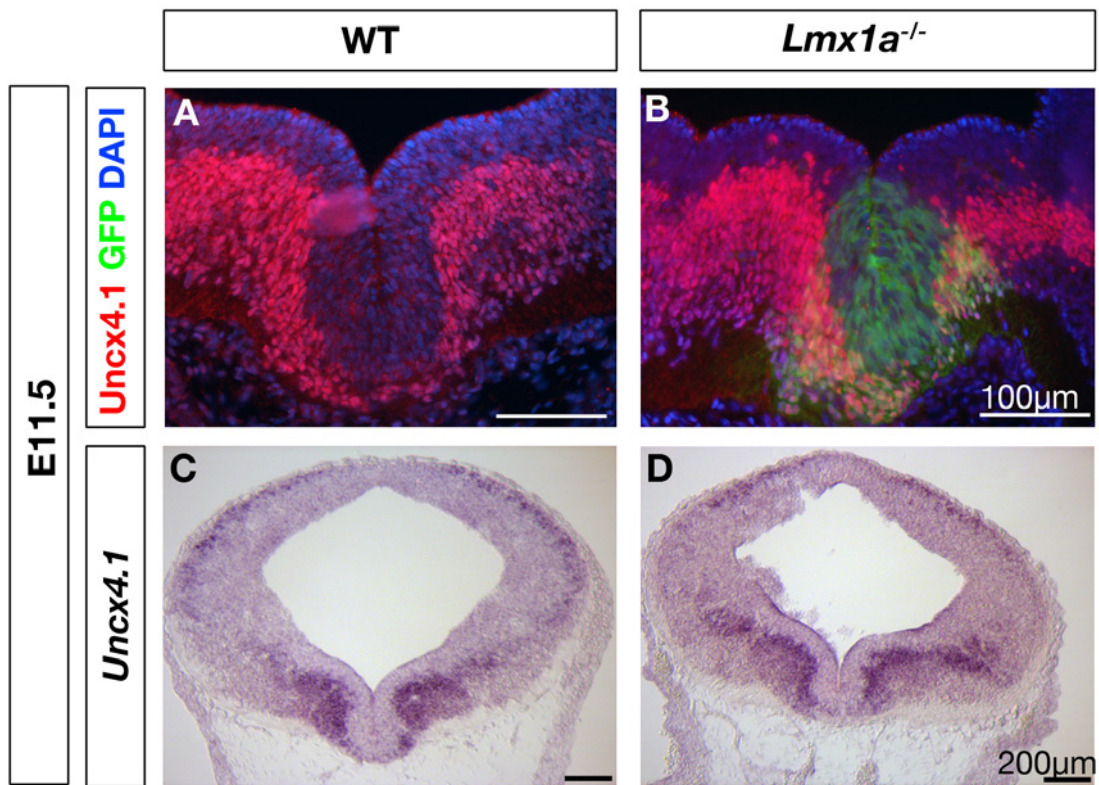


Abb. 19: *Uncx4.1*-positive Zellen in *Lmx1a*-defizienten Mäusen. (A-B) IHC gegen *Uncx4.1* (rot) und GFP (grün) auf coronalen Gewebeschnitten des Stadiums 11.5. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI. (C) und (D) zeigen eine ISH mit einer gegen *Uncx4.1* gerichteten RNA-Sonde von WT (C) und *Lmx1a*^{-/-} (D) Embryonen an E11.5.

Es konnten sowohl in *Lmx1a* homozygoten, als auch in heterozygoten Embryonen GFP und *Uncx4.1* co-positive Zellen detektiert werden (Abb. 19, B. Daten heterozygoter Tiere nicht gezeigt). Eine ISH mit einer gegen *Uncx4.1* gerichteten RNA-Sonde bestätigt, dass der Verlust von *Lmx1a* keinen Einfluss auf die Expression von *Uncx4.1* ausübt (Abb. 19, C-D).

2.2.7 Die Expression von *Uncx4.1* im Mittelhirn *Ngn2*-defizienter Embryonen

Kele et al. (2006) zeigten, dass ein Funktionsverlust von *Ngn2* zu einer Reduzierung der Neuronen in der ventromedialen Mantelzone führt. Dies geht mit einer Rückhaltung der Zellen in der ventrikulären Zone einher. Ebenso konnten Kele et al. zeigen, dass die meisten Vorläuferzellen der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns nicht ausdifferenzieren, sondern arretiert werden, bevor sie den vollständigen neuronalen Phänotyp annehmen konnten (Kele et al., 2006). Die Analyse der *Uncx4.1*-Expression in *Ngn2*-defizienten Embryonen der Embryonalstadien 11.5 und 13.5 zeigt, dass eine Inaktivierung von *Ngn2* zu einem Verlust *Uncx4.1*-positiver Zellen in der Mantelzone des ventralen Mittelhirns führt. So können an E11.5 (Abb. 20, A-B) und an E13.5 (Abb. 20, C-D) keine *Uncx4.1*-positiven Zellen an der ventralen Mittellinie von *Ngn2*-defizienten Embryonen detektiert werden. Auch bei der hier verwendeten Mauslinie handelt es sich um eine Knockin-Linie. Hierbei wird GFP anstelle von *Ngn2* unter dem *Ngn2*-Promotor exprimiert.

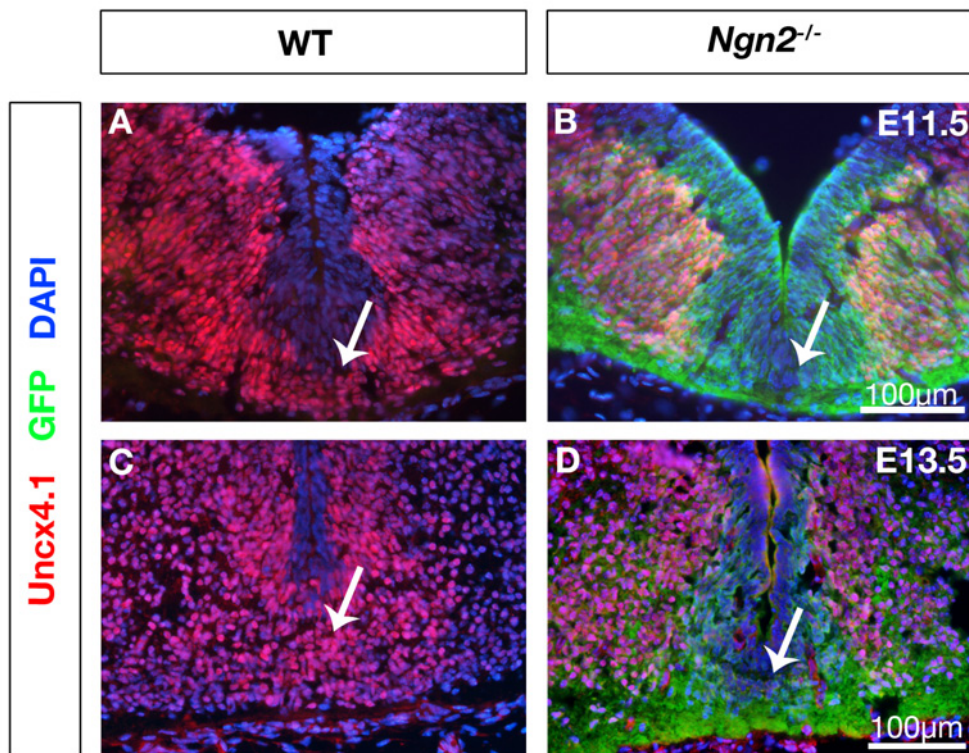


Abb. 20: *Ngn2*-defiziente Neuronen der ventralen Mittellinie weisen keine *Uncx4.1*-Expression auf. (A-D) IHC gegen *Uncx4.1* (rot) und GFP (grün) auf coronalen Gewebeschnitten von WT- und *Ngn2*^{-/-} Embryonen der Stadien 11.5 (A-B) und 13.5 (C-D). Die Pfeile deuten auf den Bereich des ventralen Mittelhirns, indem die Domäne der mDA Neuronen zu finden ist. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

2.2.8 Analyse der β -Catenin Expression im ventralen Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Embryonen

β -Catenin ist eine wichtige Komponente des kanonischen Wnt-Signalweges (Akiyama, 2000; Mosimann et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von β -Catenin in der Shh- oder TH-Domäne zu einem Verlust dopaminerger Neuronen im Mittelhirn führt (Tang et al., 2009) und β -Catenin eine wichtige Rolle bei der Neurogenese der dopaminergen Neuronen zukommt (Tang et al., 2010). Um zu überprüfen, ob der Funktionsverlust von *Uncx4.1* zu einer Veränderung der β -Catenin Expression führt und somit in den β -Catenin/Wnt-Signalweg involviert ist, wurde eine Immunfärbung auf coronalen Gewebeschnitten mit anti- β -Catenin durchgeführt. Es kann beobachtet werden, dass die Inaktivierung von *Uncx4.1* an E12.5 keinen Unterschied in der β -Catenin Expression hervor ruft (Abb. 21, A-B). An E13.5 ist jedoch festzustellen, dass die Expression von β -Catenin im ventralen Mittelhirn, in dem Bereich, in dem sich die dopaminergen Neuronen befinden, deutlich reduziert ist (Pfeile in Abb. 21, C-D).

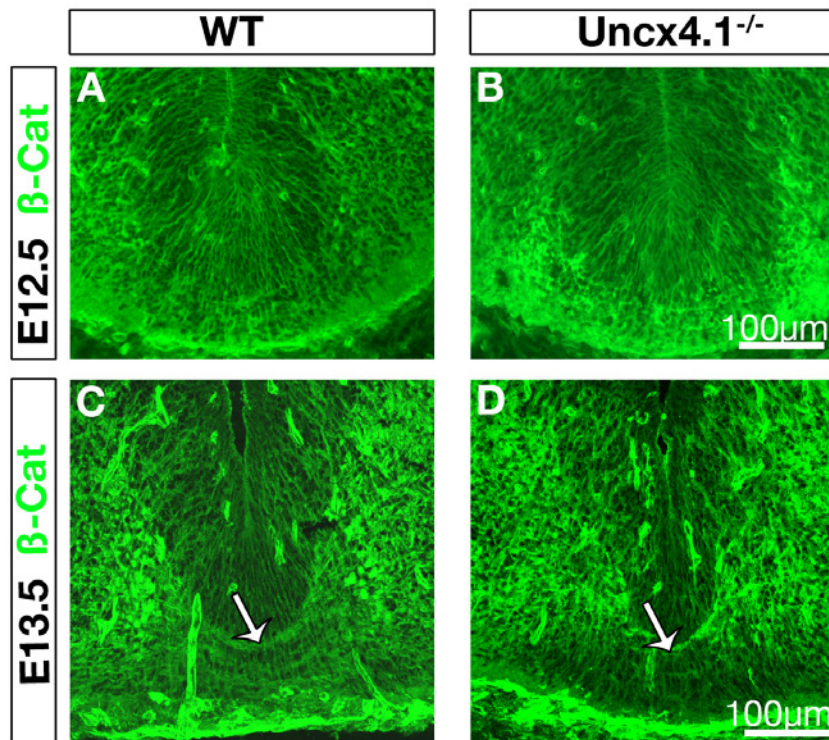


Abb. 21: Analyse der β -Catenin Expression in Abwesenheit von *Uncx4.1*. IHC von β -Catenin auf coronalen Gewebeschnitten *Uncx4.1*^{-/-}- und Kontrollembryonen der Stadien E12.5 (A-B) und E13.5 (C-D). Bei (C-D) handelt es sich um konfokale Aufnahmen. Die Pfeile deuten auf den Bereich des ventralen Mittelhirns, indem eine Veränderung detektiert werden konnte.

2.2.9 Die Analyse dopaminergener Neuronen in Abwesenheit von *Uncx4.1* mit Hilfe einer konditionalen Knockoutlinie

Da die Nachkommen des globalen *Uncx4.1*-Knockouts am ersten Tag nach der Geburt sterben, wurde für die Analyse adulter Stadien eine konditionale Knockoutlinie verwendet. Die Verpaarung der Tiere und die Tamoxifeninjektion erfolgte wie in den Kapiteln 5.2.2 und 5.2.3 beschrieben. Um allerdings zu überprüfen, ob die geflochtenen Bereiche bei der Verpaarung mit einer Cre-Linie tatsächlich entfernt werden und die geflochte Linie effizient ist, wurde der konditionale Knockout zunächst mit Tieren der CMV-Cre Linie (Schwenk et al., 1995) verpaart. Bei dieser Linie ist Cre ubiquitär exprimiert, so dass bei einer Verpaarung derselbe Phänotyp wie der des globalen Knockouts erwartet wird. Die Analyse der Rippen zeigte, dass der Phänotyp dem des klassischen *Uncx4.1*-Knockouts entspricht (Daten nicht gezeigt). Eine Immunfärbung mit anti-*Uncx4.1* zeigt den totalen Verlust von *Uncx4.1* im Mittelhirn der Maus (Abb. 22). Somit kann die konditionale Knockoutlinie für die Analyse adulter Stadien verwendet werden.

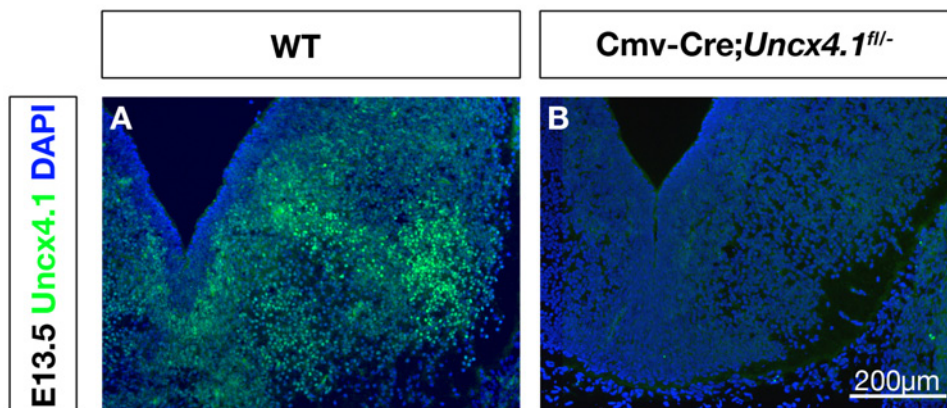


Abb. 22: *Cmv-Cre;Uncx4.1^{fl/fl}* Embryonen exprimieren kein *Uncx4.1* im Mittelhirn der Maus. (A-B) IHC mit anti-*Uncx4.1* auf coronalen Gewebeschnitten an E13.5 von Wildtypen (A) und Mutanten (B). In den Mutanten ist kein *Uncx4.1*-Protein mehr detektierbar (B). Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

***Cre-ER;Uncx4.1^{fl/fl}* Mausmutanten zeigen morphologische Defekte in der Domäne der mDA Neuronen**

Für die Analyse adulter Tiere wurde zunächst die Cre-ER Linie (Hayashi & McMahon, 2002) verwendet. Bei dieser Linie ist Cre wie bei der CMV-Cre Linie ubiquitär exprimiert. Allerdings bindet der natürliche Ligand nicht an den mutierten Östrogenrezeptor, sondern es bindet nur der synthetische Ligand 4-Hydroxytamoxifen. Dies erlaubt die Expression von Cre in Abhängigkeit von Tamoxifen. Als Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion wurde zunächst E12.5 gewählt,

da *Uncx4.1* zu diesem Zeitpunkt noch stark im Mittelhirn exprimiert und die Skelettbildung weitestgehend abgeschlossen ist. Bei einer Tamoxifenverabreichung zu früheren Zeitpunkten besteht die Gefahr der Malformierung des Skeletts, was wiederum den Tod der Neugeborenen zur Folge haben könnte. Die Embryonen wurden zwischen E17.5 und E20, je nach Kondition der Mutter, entnommen und Ammen zur Aufzucht überlassen. Der Tag der Entnahme ist im Folgenden als P0 bezeichnet.

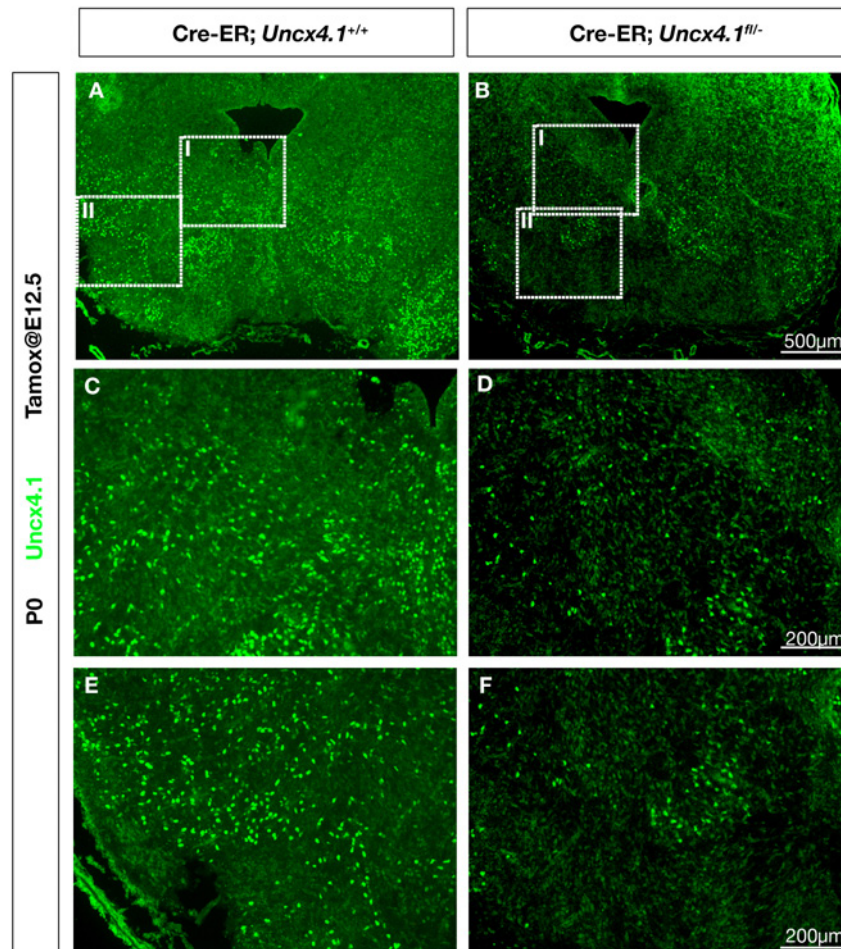


Abb. 23: Cre-ER;*Uncx4.1*^{fl/-} Embryonen zeigen einen deutlichen Verlust von *Uncx4.1* im Mittelhirn der Maus. (A-F) IHC mit anti-*Uncx4.1* auf coronalen Gewebeschnitten des Mittelhirns von Mäusen an P0. (C, D) Vergrößerungen des Ausschnitts I in (A) und (B). (E, F) Vergrößerung des Ausschnitts II in (A) und (B). Den Müttern wurde Tamoxifen an E12.5 intraperitoneal verabreicht.

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von *Uncx4.1* erfolgreich war, wurden Neugeborene Tiere an P0, deren Müttern an E12.5 Tamoxifen verabreicht wurde, analysiert. Eine Immunfärbung gegen *Uncx4.1* auf coronalen Gewebeschnitten zeigt, dass ein Großteil der *Uncx4.1*-positiven Zellen nicht mehr detektierbar ist (Abb. 23). Daraus lässt sich ableiten, dass die Inaktivierung von *Uncx4.1* mit der durchgeführten Vorgehensweise erfolgreich ist.

Anschließend wurde die Entwicklung der mDA Neuronen in Cre-ER;*Uncx4.1*^{fl/-} analysiert. Be-

reits an P0 zeigt sich, dass die Expression von TH verändert ist (Abb. 24, E-F). So kann festgestellt werden, dass der Abstand zwischen der VTA und SN in den konditionalen Mausmutanten vergrößert ist (Abb. 24, gelbe Pfeile in E-F). Es ist allerdings zu erwähnen, dass die Analyse an P0 bei nur einem Tier erfolgte und diese Ergebnisse damit als vorläufig anzusehen sind. Allerdings ist dieser Defekt auch auf Gewebeschnitten adulter Tiere bei einer Immunfärbung gegen TH zu verzeichnen (Abb. 24, weiße Pfeile in A-B). Des Weiteren ist ein Verlust TH-positiver Neuronen in dem lateralen Bereich der SN adulter Tiere festzustellen (Abb. 24, graue Pfeile in A-B). Dieselben Beobachtungen können bei einer IHC mit anti-DAT gemacht werden (Abb. 24, C-D).

Um zu ermitteln, ob eine spätere Inaktivierung von *Uncx4.1* ebenfalls Einfluss auf die Entwicklung der dopaminergen Neuronen im Mittelhirn nimmt, wurde das Tamoxifen den Jungtieren vier Wochen nach der Geburt verabreicht. Hierbei lässt sich feststellen, dass der Funktionsverlust von *Uncx4.1* zu einem so späten Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Expression von TH (Abb. 24, G-H) und DAT (Daten nicht gezeigt) im Vergleich zu den Kontrolltieren nimmt.

Die Deletion von *Uncx4.1* führt während der späteren Embryonalentwicklung zu einem Verlust dopaminergener Neuronen in den lateralen Bereichen der SN und zu einem veränderten Expressionsmuster in der VTA, wohingegen die Deletion vier Wochen nach der Geburt keine Auswirkung auf die Expression von TH und DAT hat.

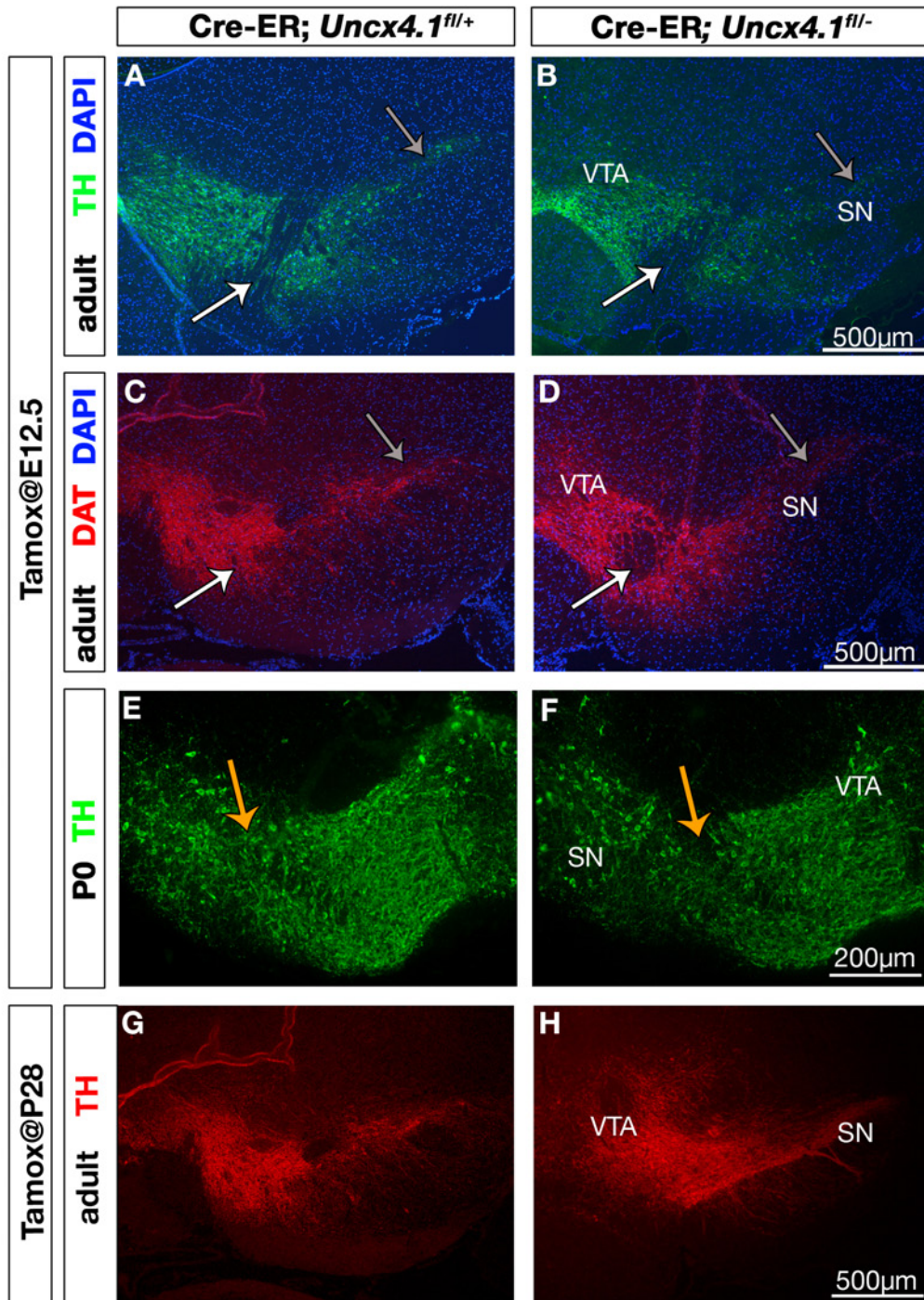


Abb. 24: Analyse von Markern dopaminergener Neuronen des Mittelhirns auf coronalen Gewebeschnitten adulter *Cre-ER;Uncx4.1^{fl/-}* Mäuse. (A-D) IHC coronaler Gewebeschnitte adulter Mäuse mit anti-TH (A-B) und anti-DAT (C-D). (E-F) Anti-TH auf coronalen Gewebeschnitten von Tieren an P0. Den Müttern wurde Tamoxifen an E12.5 intraperitoneal verabreicht. Die weißen Pfeile deuten auf den Bereich der VTA, in dem weniger dopaminerge Neuronen verzeichnet werden können, wohingegen die grauen Pfeile auf den Verlust in der SN hindeuten. Die orangenen Pfeile zeigen den vergrößerten Abstand zwischen VTA und SN an. (G-H) IHC coronaler Gewebeschnitte adulter Mäuse mit anti-TH, die erst vier Wochen nach der Geburt mit Tamoxifen behandelt wurden.

Analyse der dopaminergen Neuronen in *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}* Mutanten

Für die Inaktivierung von *Uncx4.1* zu einem früheren Zeitpunkt als E12.5 wurde die *Foxa2-Cre* Linie (Park et al., 2008) verwendet. Wie bereits vorher erwähnt, ist *Foxa2* ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung der dopaminergen Neuronen und wird bereits früh im ventralen Mittelhirn exprimiert (Ferri et al., 2007; Kittapa et al., 2007; Lin et al., 2009). Die Verpaarung der Mäuse wurde wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Tamoxifenverabreichung erfolgte an E10.5 durch orale Applikation. Die Embryonen wurden je nach Kondition der Mutter zwischen E17.5 und E20 entnommen und Ammen zur Aufzucht überlassen. Die Analyse der Nachkommen erfolgte drei bis sechs Monate nach der Geburt.

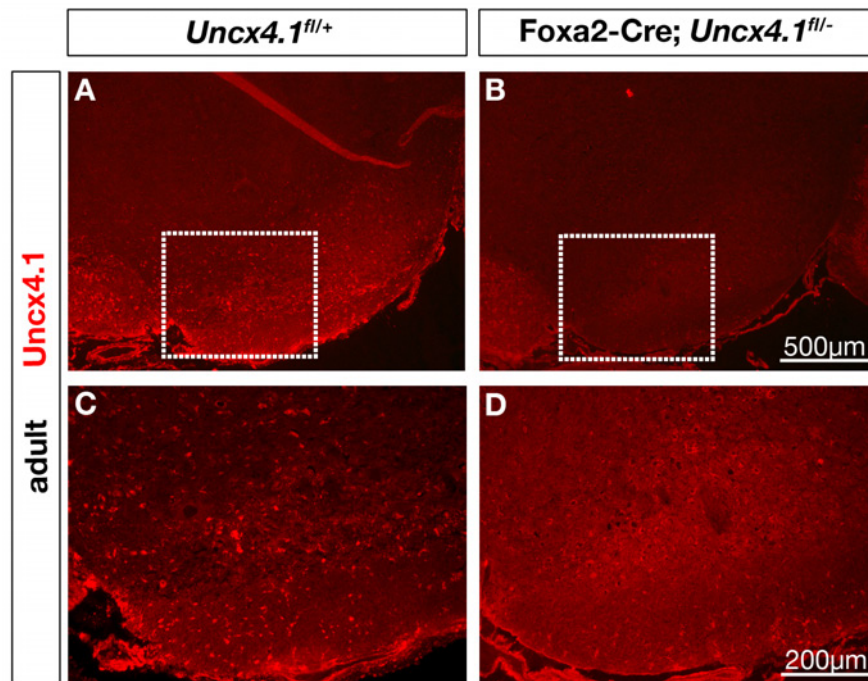


Abb. 25: *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}* Mausmutanten zeigen einen Verlust der *Uncx4.1*-Expression im ventralen Mittelhirn. (A-D) IHC mit anti-*Uncx4.1* auf coronalen Gewebeschnitten adulter Mausgehirne von Kontrolltieren und Mutanten. (C) und (D) zeigen die Vergrößerungen der Ausschnitte in (A) und (B).

Die erfolgreiche Inaktivierung von *Uncx4.1* wurde mittels IHC von adultem Gewebe überprüft. Im ventralen Mittelhirn ist deutlich ein Verlust des *Uncx4.1*-Proteins erkennbar (Abb. 25).

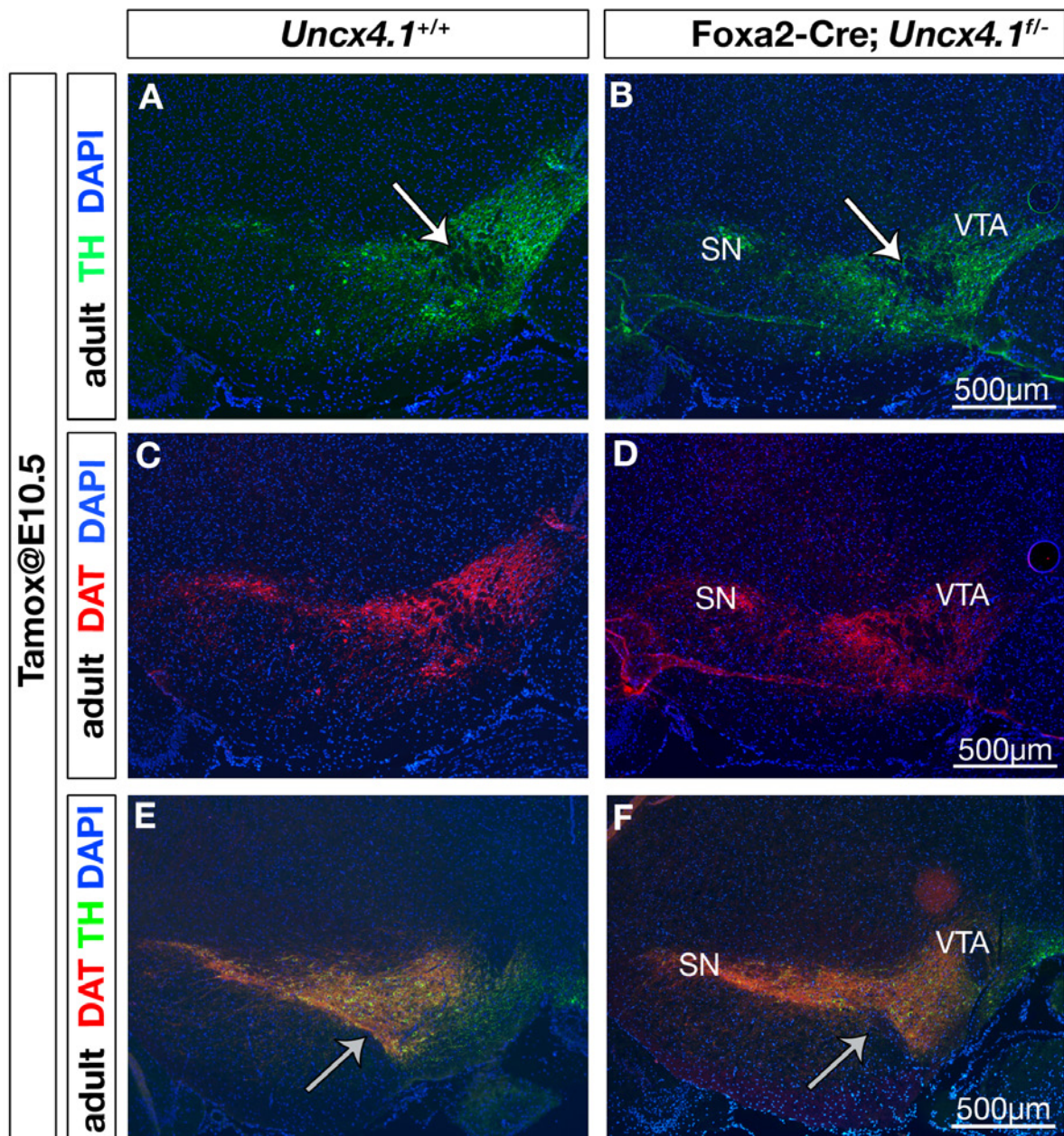


Abb. 26: Analyse von Markern dopaminergener Neuronen des Mittelhirns auf coronalen Gewebeschnitten adulter *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}* Mäuse. (A-D) IHC gegen TH (A-B) und DAT (C-D) auf coronalen Gewebeschnitten adulter Mausgehirne. (E-F) Doppelimmunfärbung mit anti-TH (grün) und anti-DAT (rot) auf Gewebeschnitten adulter *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}* und Kontrollgehirnen. Die weißen Pfeile deuten auf den TH-negativen Bereich in der VTA. Die grauen Pfeile zeigen den Verlust der TH- und DAT-Expression. VTA: Ventrales tegmentales Areal, SN: Substantia nigra. Die Verabreichung von Tamoxifen erfolgte an E10.5 mittels oraler Applikation. Gegenfärbung mit DAPI.

Bei der Analyse der dopaminergen Neuronen in den *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}* Mutanten ist zu beobachten, dass die Expression von TH und DAT im lateralen Bereich der SN nicht beeinträchtigt ist (Abb. 26). Allerdings scheint der Bereich der TH-Expression kleiner als in den Kontrolltieren und es kann ein vergrößerter TH-negativer Bereich in der VTA detektiert werden (Abb. 26,

A-B, E und F). Selbiges ist bei der Expressionsanalyse von DAT festzustellen (Abb. 26, C-F). Neben diesen Ergebnissen zeigt die Analyse der konditionalen *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}*-Mutanten im rostral gelegenen Mittelhirn ein Verlust der TH- und DAT-Expression in der VTA (Abb. 26, graue Pfeile in E und F).

Zusammengenommen kann festgehalten werden, dass die Expression von *Uncx4.1* in der *Foxa2*-Domäne wichtig für die korrekte Etablierung der dopaminergen Neuronen im ventralen Mittelhirn ist. Die Expression von TH und DAT scheint in der lateral gelegenen Substantia nigra in den *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}* Mutanten nicht beeinträchtigt zu sein. Dies lässt vermuten, dass der Ursprung dieser Neuronen nicht in der *Foxa2*-Domäne zu finden ist, oder dass die konditionelle Inaktivierung nicht alle Bereiche der Domäne erfasst.

2.3 Untersuchungen zur Funktion von *Uncx4.1* während der Entwicklung GABAerger Neuronen im embryonalen Mittelhirn

Die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse von *Uncx4.1* zeigt, dass *Uncx4.1* in GABAergen Neuronen exprimiert wird (Abb. 11). Daneben konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der mDA Neuronen in Abwesenheit von *Uncx4.1* deutlich verringert ist. Um zu untersuchen, ob *Uncx4.1* an der Entwicklung der GABAergen Neuronen im Mittelhirn beteiligt ist und ob die dopaminergen Neuronen ihre Identität in ein GABAerges Zellschicksal ändern, wurde die Expression verschiedener Marker GABAerger Neuronen im Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Mausembryonen untersucht.

Die Inaktivierung von *Uncx4.1* zeigt keinen Einfluss in der Entwicklung GABAerger Neuronen des Mittelhirns

Die Transkriptionsfaktoren *Helt*, *Mash1* und *Gata2* sind notwendig für die korrekte Entwicklung GABAerger Neuronen im Mittelhirn (Nakatani et al., 2007; Miyoshi & Bessho, 2004; Peltopuro & Kala, 2010; Kala et al., 2009). Die unveränderte Expression von *Helt* und *Mash1* in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen (Abb. 27, A-B und Abb. 18, A-B) erklärt sich durch die ausschließlich ventrikuläre Expression dieser Marker. Die GABAergen Marker *Gad67*, *Nkx2.2* und *Olig2* sind in *Uncx4.1*-Nullmutanten an E11.5 (Abb. 27, C, D, I und J)), E12.5 (Abb. 27, G,H) und E16.5 (Abb. 27, E, F, K und L) ebenfalls normal exprimiert.

Insgesamt zeigt die Inaktivierung von *Uncx4.1* keine Veränderung des GABAergen Phänotyps im ventralen Mittelhirn der Mausmutanten und eine normale Expressionsdomäne der GABAergen Neuronen. Eine Umschaltung des dopaminergen Zellschicksals zu einem GABAergen Zellschicksal kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

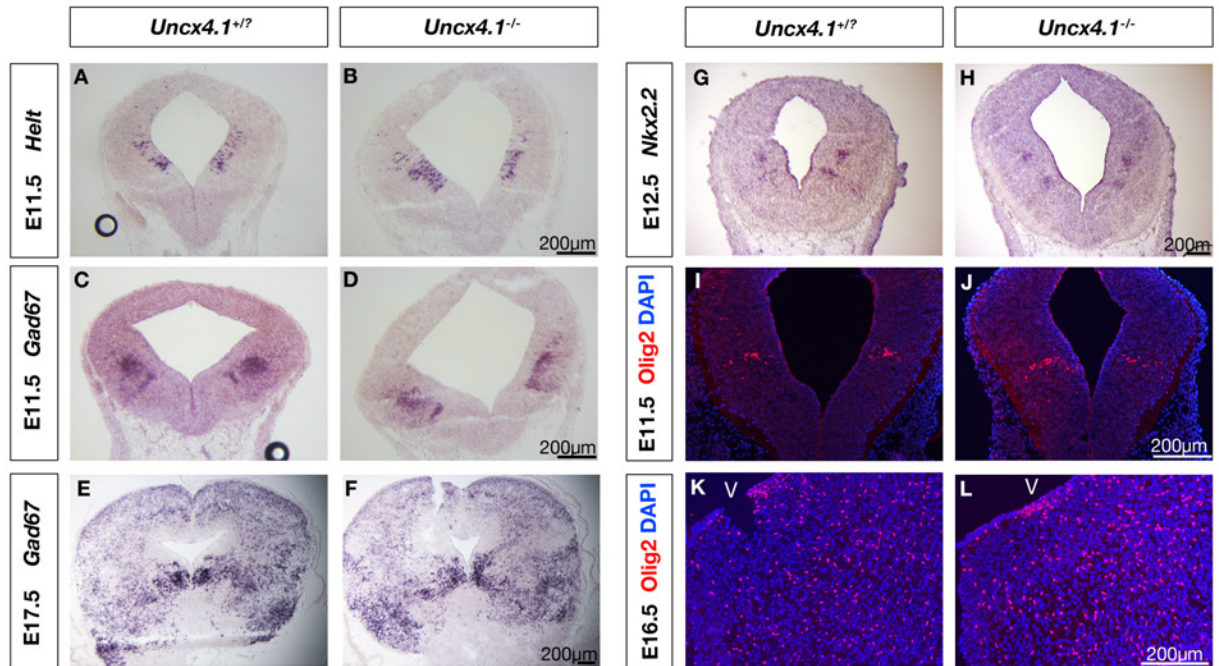


Abb. 27: GABAerge Neuronen sind in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen normal entwickelt. (A-H) ISH coronaler Gewebeschnitte von *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen und Kontrolltieren mit RNA-Sonden gegen *Helt* (A-B), *Gad67* (C-F) und *Nkx2.2* (G-H). (I-L) Immunfärbung coronaler Gewebeschnitte gegen Olig2 (rot) der Stadien E11.5 (I-J) und E16.5 (K-L). V markiert den III. Ventrikel.

2.4 Untersuchungen zur Funktion von *Uncx4.1* während der Entwicklung glutamaterger Neuronen im embryonalen Mittelhirn

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Uncx4.1* neben dopaminergen und GABAergen Neuronen, auch in glutamatergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert ist (vgl. Kapitel 2.1.2, sowie Abb. 10 und Abb. 11). Daher wurde untersucht, ob die Inaktivierung von *Uncx4.1* eine Bedeutung für die Entwicklung von glutamatergen Neuronen des ventralen Mittelhirns hat. Zudem sollte untersucht werden, ob der Verlust der mDA Neuronen in *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen mit einer Erhöhung glutamaterger Neuronen einhergeht und sich somit ihr Zellschicksal ändert.

2.4.1 Die Inaktivierung von *Uncx4.1* hat Einfluss auf bestimmte Subtypen der glutamatergen Neuronen im Mittelhirn

Der Transkriptionsfaktor *Brn3a* ist u.a. im Ganglion trigeminale, den Spinalganglien und dem Nucleus ruber exprimiert (Xiang et al., 1996; Eng et al., 2001; Agarwala & Ragsdale, 2002). Daneben ist die Expression von *Brn3a* auch im dorsalen Mittelhirn detektierbar (Agarwala & Ragsdale, 2002; Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Prakash et al., 2009). Da *Brn3a* im Mittelhirn von glutamatergen Neuronen exprimiert wird (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Prakash et al., 2009), wurde der Transkriptionsfaktor als Marker glutamaterger Neuronen verwendet.

Uncx4.1^{-/-} Mausembryonen zeigen, im Vergleich zu den Kontrollembryonen, im ventralen Mittelhirn ein erhöhtes Level an *Brn3a*-mRNA. Dies ist sowohl an E11.5 (Daten nicht gezeigt), E12.5 (Abb. 28, A-B) und an E13.5 (Daten nicht gezeigt) detektierbar. Im dorsalen Mittelhirn ist allerdings keine Veränderung in der Expression von *Brn3a* zu verzeichnen (Abb. 28, A-B und Daten nicht gezeigt). *Sim1* ist ebenfalls in frühen Entwicklungsstadien in den glutamatergen Neuronen des Nucleus ruber detektierbar (Nakatani et al., 2007). Es zeigt sich, dass das Signal der *Sim1* Expression an E12.5 in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (Abb. 28, G-H). Dies konnte interessanterweise nicht an E11.5 (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden.

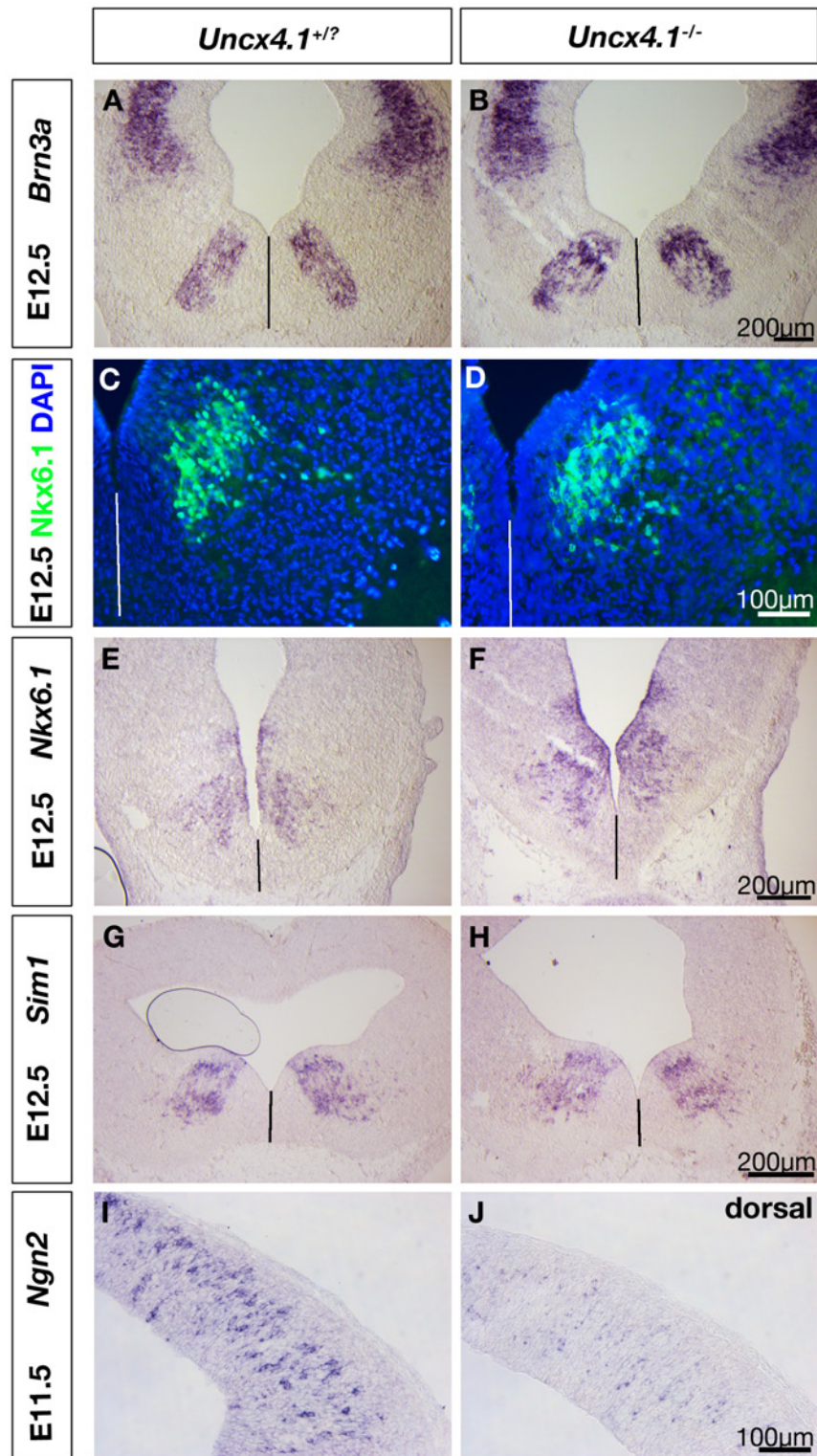


Abb. 28: Analyse glutamaterger Marker in *Uncx4.1*-defizienten und Kontrollembryonen. (A-H) ISH-Analysen von *Brn3a*-mRNA (A-B), *Nkx6.1*-mRNA (E-F) und *Sim1*-mRNA (G-H) auf coronalen Gewebeschnitten des Stadiums E12.5. (C-D) Zeigt eine Immunfärbung gegen *Nkx6.1* (grün) an E12.5 von Kontroll- und *Uncx4.1*-defizienten Embryonen. (I-J) Detektion von *Ngn2*-mRNA mittels ISH auf coronalen Gewebeschnitten im dorsalen Mittelhirn von Mausembryonen an E11.5. Die schwarzen und weißen Linien markieren die Mittellinie des ventralen Mittelhirns.

Der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 ist notwendig für die korrekte Bildung Brn3a-positiver Neuronen des Nucleus ruber (Prakash et al., 2009). Das Level an *Nkx6.1*-mRNA ist an E12.5 in Abwesenheit von *Uncx4.1* erhöht, wohingegen die Anzahl Nkx6.1-positiver Zellen unverändert bleibt (Abb. 28).

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 erwähnt, ist *Ngn2* in glutamatergen Neuronen des dorsalen Mittelhirns exprimiert. Eine ISH zeigt, dass *Ngn2* im dorsalen Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Embryonen stark reduziert ist, wohingegen die Expression von *Brn3a* in diesem Bereich unverändert bleibt. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass *Uncx4.1* eine Rolle während der glutamatergen Neurogenese zukommt.

Isl1 ist ein Marker der glutamatergen Oculomotorneuronen (Fogel et al., 2008; Waite et al., 2011). Die Anzahl Isl1-positiver Zellen ist weder an E11.5 (Abb. 29, A-B) noch an E17.5 (Abb. 29, C-D) verändert.

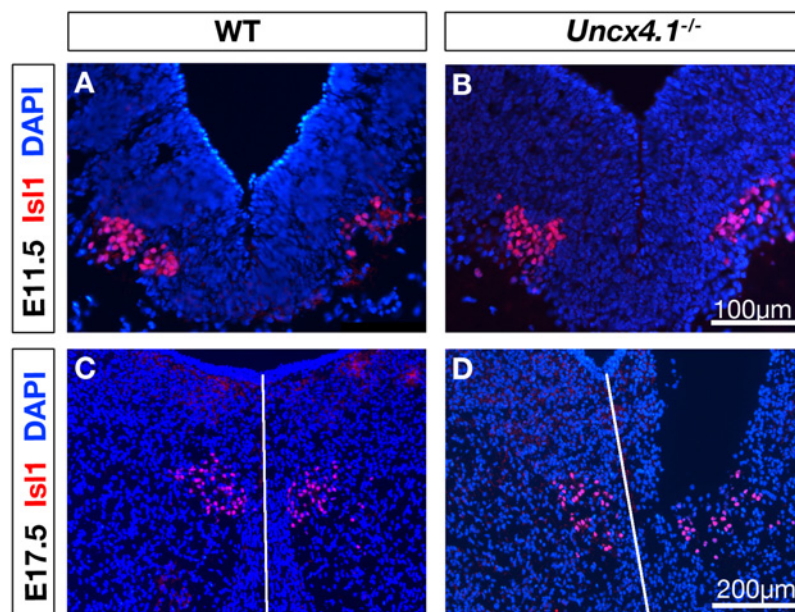


Abb. 29: Die Anzahl der Isl1-positiven Oculomotorneuronen ist in Abwesenheit von *Uncx4.1* unverändert. IHC mit anti-Isl1 (rot) auf coronalen Gewebeschnitten der Stadien 11.5 (A-B) und E17.5 (C-D). Die weiße Linie in C-D markiert die ventrale Mittellinie.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von *Uncx4.1* zu einem erhöhten mRNA Level einiger Marker des Nucleus ruber im ventralen Mittelhirn führt, wohingegen der Funktionsverlust im dorsalen Mittelhirn die Expression von *Ngn2* reduziert.

2.4.2 Die Anzahl Pax6-positiver Zellen des ventralen Mittelhirns ist in Abwesenheit von *Uncx4.1* ab E13.5 erhöht

Im murinen Vorderhirn ist der Transkriptionsfaktor Pax6 im dorsalen Telencephalon in einem gegenläufigen Gradienten mit *Emx1* exprimiert. Aus dieser Region gehen hauptsächlich glutamaterge Neuronen hervor (Schuurmans et al., 2004; Kroll & O'Leary, 2005). Im Mittelhirn ist Pax6 ebenfalls in einer Subgruppe glutamaterger Neuronen in der Basalplatte detektierbar (Kala et al., 2009). Es zeigt sich, dass die Inaktivierung von *Uncx4.1* keinen Einfluss auf die Anzahl Pax6-positiver Neuronen im ventralen Mittelhirn an E11.5 und E12.5 ausübt (Abb. 30, A-B, G-H und K). Allerdings ist eine erhöhte Anzahl Pax6-positiver Zellen ab E13.5 im Vergleich zu den Kontrollembryonen zu verzeichnen (Abb. 31, C-D und K). Die Erhöhung beträgt 54,9 %. An E17.5 ist die Anzahl Pax6-positiver Neuronen noch immer um 26,43 % höher als in den Kontrollembryonen (Abb. 30, E-F und K). Um festzustellen, ob mehr Pax6-positive Zellen im ventralen Bereich detektiert werden können, wurde eine Doppelimmunfärbung mit anti-Pax6 und anti-Foxa2 durchgeführt (Abb. 30, G-J). Die Expressionsdomäne von Foxa2 zeigt an E12.5 und E13.5 einen sehr schmalen Bereich, der frei ist von Foxa2-positiven Zellen (gestrichelte weiße Linie in Abb. 31, G-J). Es zeigt sich, dass bei einer Inaktivierung von *Uncx4.1* auf coronalen Gewebeschnitten des ventralen Mittelhirns mehr Pax6-positive Zellen jenseits der Linie detektiert werden können (Abb. 30, I-J). An E12.5 ist aber keine deutliche Expansion der Pax6-positiven Neuronen im Vergleich zu den Kontrollembryonen zu verzeichnen (Abb. 30, G-H). Dies geht mit der Beobachtung einher, dass die Anzahl Pax6-positiver Neuronen erst ab dem Embryonalstadium 13.5 signifikant erhöht ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Funktionsverlust von *Uncx4.1* ab E13.5 erhöhte Zellzahlen Pax6-positiver Neuronen hervor ruft, was auch in der weiteren Entwicklung an E17.5 festgestellt werden kann.

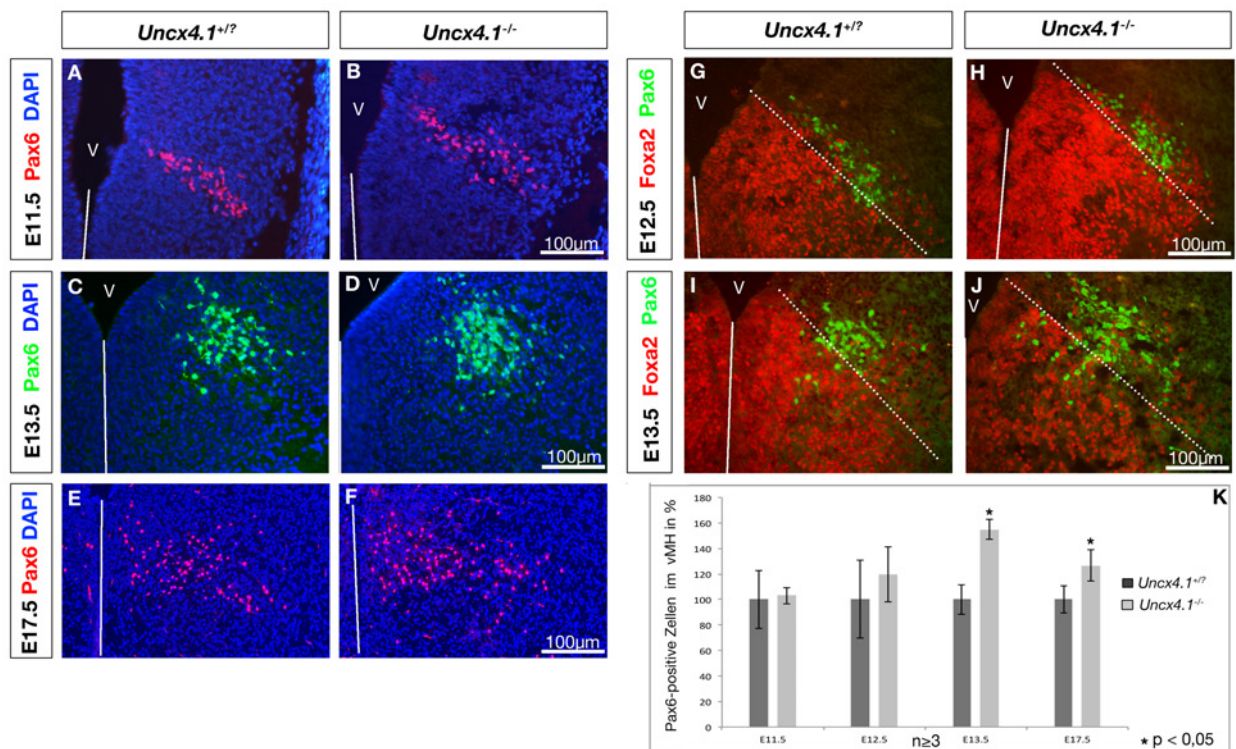


Abb. 30: Die Anzahl Pax6-positiver Zellen ist in Abwesenheit von *Uncx4.1* ab E13.5 erhöht. (A-F) IHC mit anti-Pax6 auf coronalen Gewebeschnitten des ventralen Mittelhirns von Kontroll- und *Uncx4.1*^{-/-}-Embryonen der Stadien E11.5 (A-B), E13.5 (C-D), E17.5 (E-F). (G-J) zeigen eine Doppelimmunfärbung gegen Pax6 (grün) und Foxa2 (rot) an E12.5 (G-H) und E13.5 (I-J). (K) Statistische Analyse der Pax6-positiven Zellzahlen im ventralen Mittelhirn von Kontrolltieren im Vergleich zu *Uncx4.1*-Nullembryonen. Die weiße gestrichelte Linie in (G-J) zeigt die Lücke in der Expression von Foxa2. Die weißen durchgezogenen Linien markieren die Mittellinie des ventralen Mittelhirns. v markiert den III. Ventrikel.

2.4.3 *Uncx4.1* und *Ngn2* sind in *Pax6*-defizienten Mäusen normal exprimiert

Da die Expression von Pax6 in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen ab E12.5 hochreguliert ist (Abb. 31), wurde untersucht ob die Expression von *Uncx4.1* in Abwesenheit von *Pax6* ebenfalls beeinträchtigt ist. Eine IHC und ISH zeigen, dass die Expression von *Uncx4.1* weder an E11.5 (Abb. 31, A-B) noch an E16.5 (Abb. 31, C-F) in *Pax6*^{-/-} Mausembryonen verändert ist. Da in *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen ein Verlust von *Ngn2*-mRNA (Abb. 17, G-H), ebenso wie eine erhöhte Anzahl Pax6-positiver Zellen detektierbar war (Abb. 31), wurde die Expression von *Ngn2* auf coronalen Gewebeschnitten von Gehirnen der *Pax6*-Nullembryonen untersucht. Die Analyse zeigt, dass keine Veränderung in der *Ngn2*-mRNA detektierbar ist.

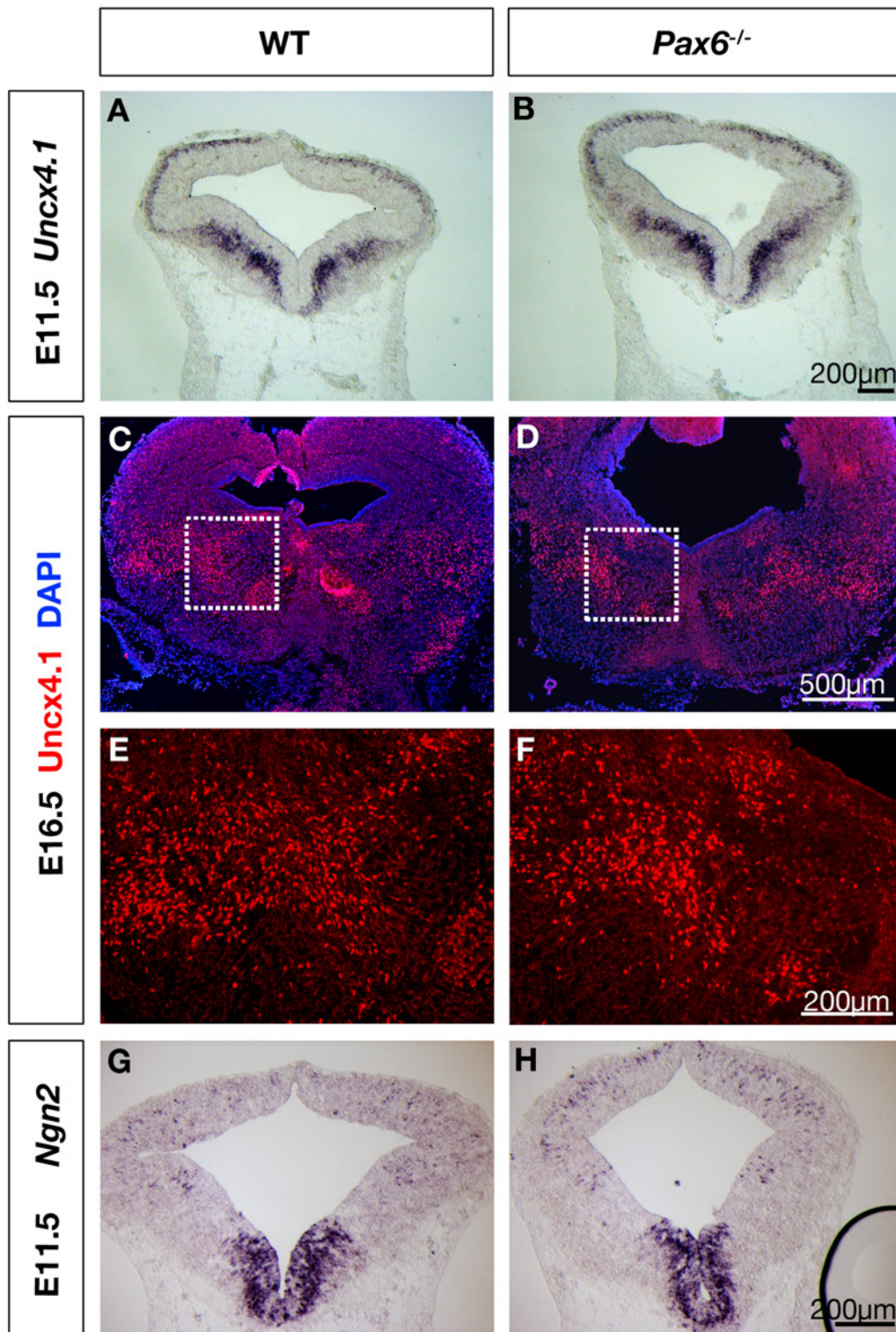


Abb. 31: Die Expression von *Uncx4.1* und *Ngn2* ist in Abwesenheit von *Pax6* unverändert. (A-B) ISH mit einer gegen *Uncx4.1* gerichteten RNA-Sonde auf coronalen Gewebeschnitten des Stadiums E11.5 von WT und *Pax6*-defizienten Embryonen. (C-F) IHC mit anti-*Uncx4.1* auf coronalen Gewebeschnitten des Stadiums E16.5. (E-F) zeigt die Vergrößerung des Ausschnitts in (C) und (D). (G-H) zeigt eine ISH mit einer gegen *Ngn2* gerichteten RNA-Sonde des Stadiums E11.5 auf coronalen Gewebeschnitten des Mittelhirns.

2.5 Protein-Interaktionsstudien von *Uncx4.1* mit *Ngn2* und *Pax6*

Kele et al. (2006) berichteten eine vermehrte Expression von *Pax6* in Abwesenheit von *Ngn2*. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen dass die Expression von *Ngn2* in Abwesenheit von *Uncx4.1* reduziert ist, wohingegen mehr *Pax6*-positive Zellen im ventralen Mittelhirn detektiert werden können, liegt die Vermutung nahe, dass *Uncx4.1* mit *Ngn2* und *Pax6* auf Proteinebene interagiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchgeführt.

2.5.1 *In-vitro* Analyse der potentiellen Interaktion von *Uncx4.1*, *Ngn2* und *Pax6* in HeLa und Hek293T Zellen

Die zu testenden Proteine (*Uncx4.1*, *Ngn2* und *Pax6*) wurden zunächst per Transfektion in HeLa und Hek293T Zellen zur Expression gebracht, ehe zwei Stunden nach der Transfektion eine Immunfärbung der Zellen vorgenommen wurde. Zur Detektion von *Uncx4.1* wurde anti-c-Myc verwendet, da *Uncx4.1* mit einem c-Myc-Tag vorliegt (genaueres ist in den Kapiteln 5.4.2 und 5.4.3 im Material und Methodenteil der Arbeit beschrieben). Zur Detektion von *Ngn2* wurde ein HA Antikörper verwendet, da für die Immunocytochemische Färbung (ICC) nur *Ngn2* mit einem HA-Tag transfiziert wurde. *Pax6* wurde mit einem anti-*Pax6* Antikörper angefärbt. Die Analyse der transienten Transfektion mit anschließender ICC zeigt, dass sowohl *Uncx4.1*, als auch *Ngn2* und *Pax6* im Zellkern exprimiert und somit co-lokalisiert sind (Abb. 32). Zu beobachten ist weiterhin, dass bei einer Expression in HeLa Zellen alle c-Myc-positiven Zellen ebenfalls HA positiv sind (Abb. 32, D), was in Hek293T Zellen nicht der Fall ist (Abb. 32, H). Allerdings ist im Allgemeinen festzustellen, dass in Hek293T Zellen wesentlich mehr c-Myc-positive Zellen detektiert werden können, als in HeLa Zellen (Abb. 32). Es ist ebenso zu beobachten, dass bei einer Transfektion von HeLa Zellen alle *Pax6*-positiven Zellen ebenfalls HA exprimieren (Abb. 32, C), wohingegen die Expression von *Pax6* in Hek293T Zellen weniger effizient ist. Dies hat zur Folge, dass nur ein Bruchteil der HA-positiven Zellen eine Co-Lokalisation mit *Pax6* aufweisen (Abb. 32, G). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Co-Immunopräzipitation mit *Uncx4.1* und *Ngn2* Hek293T Zellen und für die mit *Ngn2* und *Pax6* HeLa Zellen verwendet.

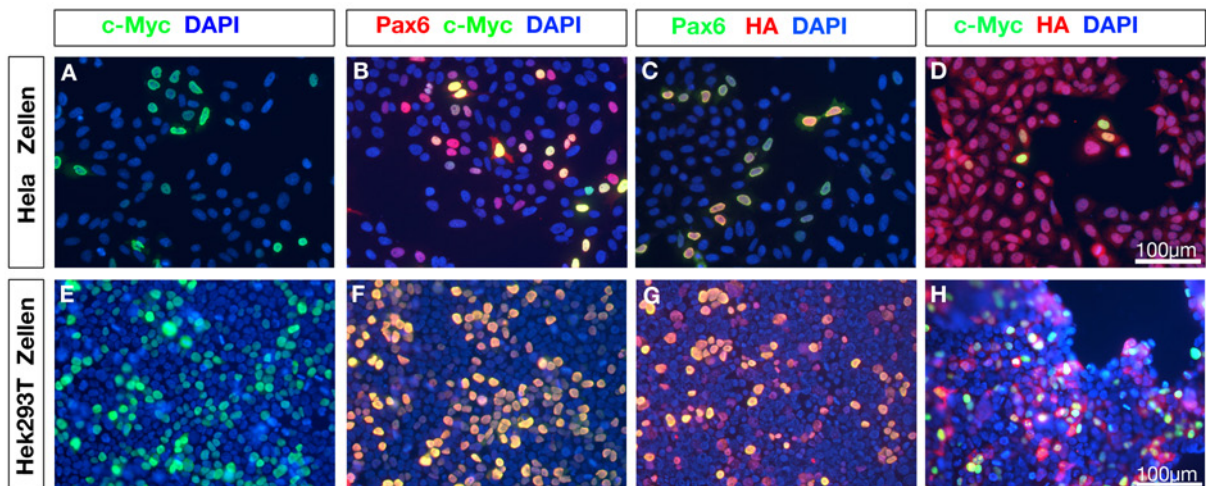


Abb. 32: Immunfärbung der transfizierten Zellen (A, E) Zu sehen ist eine Antikörperfärbung gegen c-Myc auf HeLa (A) und Hek293T (E) Zellen. (B, F) ICC gegen c-myc auf HeLa (B) und Hek293T (F) Zellen, 24 Stunden nach der Transfektion. (C) und (G) zeigen eine ICC gegen Pax6 und HA auf HeLa (C) und Hek293T (G) Zellen. In (D) und (H) ist eine Immunfärbung gegen c-Myc und HA zu sehen, wobei (D) HeLa Zellen und (H) Hek293T Zellen zeigt. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

2.5.2 Ngn2 und Pax6 interagieren auf Protein-Protein Ebene miteinander

Um die Interaktion von Uncx4.1, Ngn2 und Pax6 zu überprüfen, wurde eine Co-IP von Uncx4.1 mit Pax6, Uncx4.1 mit Ngn2 und Ngn2 mit Pax6 durchgeführt (die Transfektion und die Co-IP sind in den Kapiteln 5.5.4 und 5.4.2 beschrieben). Die Western Blot Analyse zeigte jedoch, dass nur Ngn2 und Pax6 eine Protein-Protein Interaktion eingehen (Abb. 33, C). Uncx4.1 und Ngn2, sowie Uncx4.1 und Pax6 zeigen keine Protein-Protein Interaktion (Abb. 33, A und B).

Zusammenfassend lässt sich jedoch festhalten, dass zwar Ngn2 und Pax6 *in-vitro* in direkter Interaktion miteinander stehen, die Bildung eines Proteinkomplexes aus Ngn2, Pax6 und Uncx4.1 jedoch ausgeschlossen werden kann, da Uncx4.1 keine Protein-Protein Interaktion mit Ngn2 zeigt (Abb. 33, C).

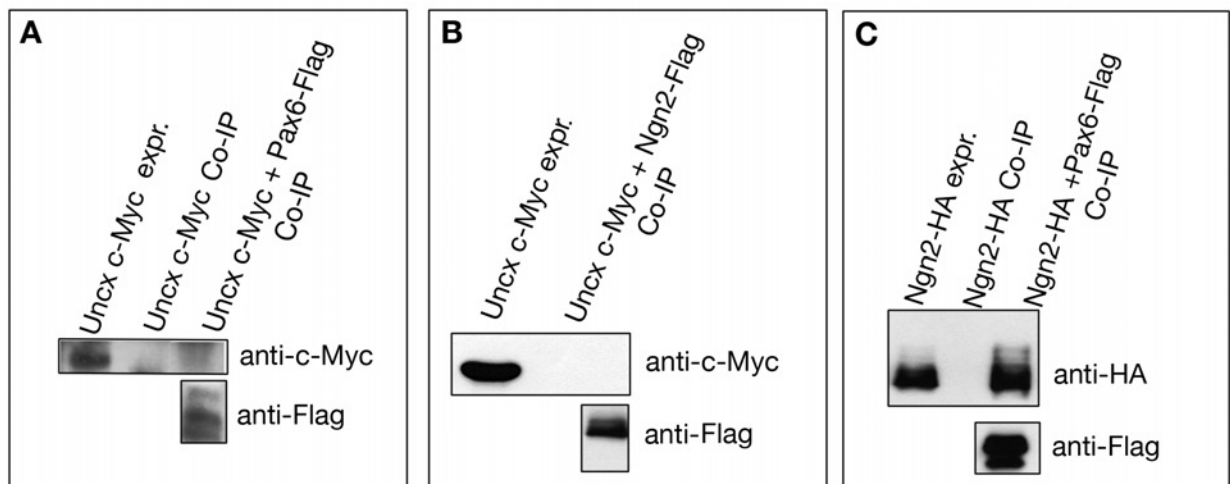


Abb. 33: Ngn2 und Pax6 zeigen Protein-Protein Interaktion. (A-C) Western Blot Analyse der Co-Immunopräzipitation von Uncx4.1 mit Pax6 (A), Uncx4.1 mit Ngn2 (B) und Ngn2 mit Pax6 (C). Der Input der Expression betrug 10%.

2.6 Analyse der Pax6-positiven Zellen in *Ngn2*-defizienten Mäusen

Da die Anzahl Pax6-positiver Zellen in Abwesenheit von *Uncx4.1* beginnend mit E13.5 erhöht ist (Kap. 2.4.2) und gezeigt werden konnte, dass Pax6 und Ngn2 auf Protein-Protein Ebene miteinander interagieren (Kap. 2.5.2), liegt die Vermutung nahe, dass die Hochregulation der *Pax6*-Expression auf die Reduzierung von Ngn2 in Abwesenheit von *Uncx4.1* zurückzuführen ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Beobachtung von Kele et al. (2006) wonach die Expression von *Pax6* an E11.5 in *Ngn2*-defizienten Mäusen ebenfalls erhöht sein soll. Kele et al. berichten allerdings nur von vorläufigen Ergebnissen. Eine Antikörperfärbung gegen Pax6 und GFP zeigt, dass die Anzahl Pax6-positiver Zellen an E11.5 bei einer Inaktivierung von *Ngn2* nicht verändert ist (Abb. 34, A-B und E). Da bei einem Funktionsverlust von *Uncx4.1* erst ab dem Embryonalstadium 13.5 eine erhöhte Anzahl Pax6-positiver Zellen im ventralen Mittelhirn zu verzeichnen ist, wurden ebenfalls coronale Gewebeschnitte *Ngn2*-defizienter Embryonen an E13.5 untersucht. Aber auch hier ist kein Unterschied in der Anzahl Pax6-positiver Neuronen festzustellen (Abb. 34, C-E).

Die Expression von Pax6 weist in *Ngn2*-defizienten Mausembryonen keinen Unterschied im Vergleich zum WT auf.

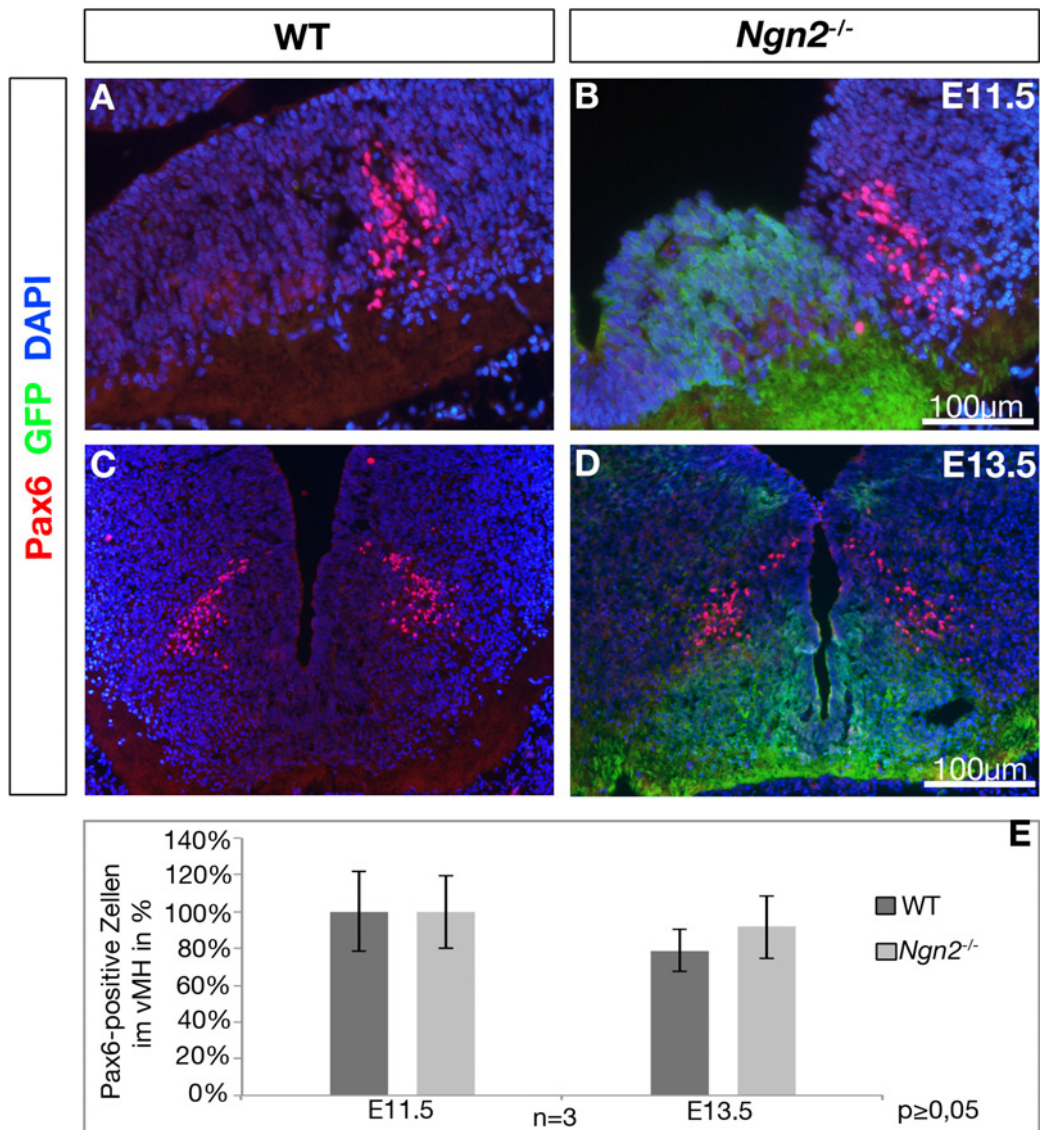


Abb. 34: Die Anzahl Pax6-positiver Zellen ist in *Ngn2*-defizienten Mausembryonen im Vergleich zum WT nicht verändert. (A-D) IHC gegen Pax6 (rot) und GFP (grün) in *Ngn2*^{-/-} und WT Embryonen an E11.5 (A-B) und E13.5 (C-D). (E) zeigt die statistische Auswertung der gezählten Pax6-positiven Zellen im ventralen Mittelhirn in Prozent. Die Anzahl Pax6-positiver Zellen ist in *Ngn2*^{-/-}-Mausembryonen im Vergleich zum WT nicht signifikant verändert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mittels „*student's t-test*“ ermittelt. vMH: ventrales Mittelhirn.

2.7 Analyse der Oligodendrozyten in Abwesenheit von *Uncx4.1*

Um zu analysieren ob die Inaktivierung von *Uncx4.1* Auswirkungen auf das gliogene Zellschicksal hat, wurde die Expression von GFAP auf coronalen Gewebeschnitten durchgeführt. Da an E17.5 nur sehr wenige Zellen des Mittelhirns GFAP-positiv sind (Daten nicht gezeigt), wurden adulte Gehirne der konditionalen Cre-ER;*Uncx4.1*^{fl/fl} Mausmutanten für die Analyse herangezogen.

Die Expression des Oligodendrozytenmarkers GFAP ist im Mittelhirn von Cre-ER;*Uncx4.1*^{fl/-} Mäusen verändert

Bei der Expressionsanalyse von GFAP zeigt sich, dass im Vergleich mit den Kontrollen mehr GFAP-positive Zellen im ventralen Mittelhirn der Cre-ER;*Uncx4.1*^{fl/-} Mausmutanten detektierbar sind (Abb. 35). Die Analyse verschiedener Gehirne jedoch zeigte, dass die erhöhte GFAP Expression nicht immer einheitlich war. So waren stärker, als auch eine leichtere Erhöhung als der in Abb. 35 dargestellten Ergebnisse, detektierbar. Dieser Umstand ist durch den verwendeten experimentellen Ansatz erklärbar. So ist es möglich, dass in den Fällen der stärkeren GFAP Expression die Effizienz der Cre-Linie höher war als in den Fällen mit einer schwächeren Erhöhung.

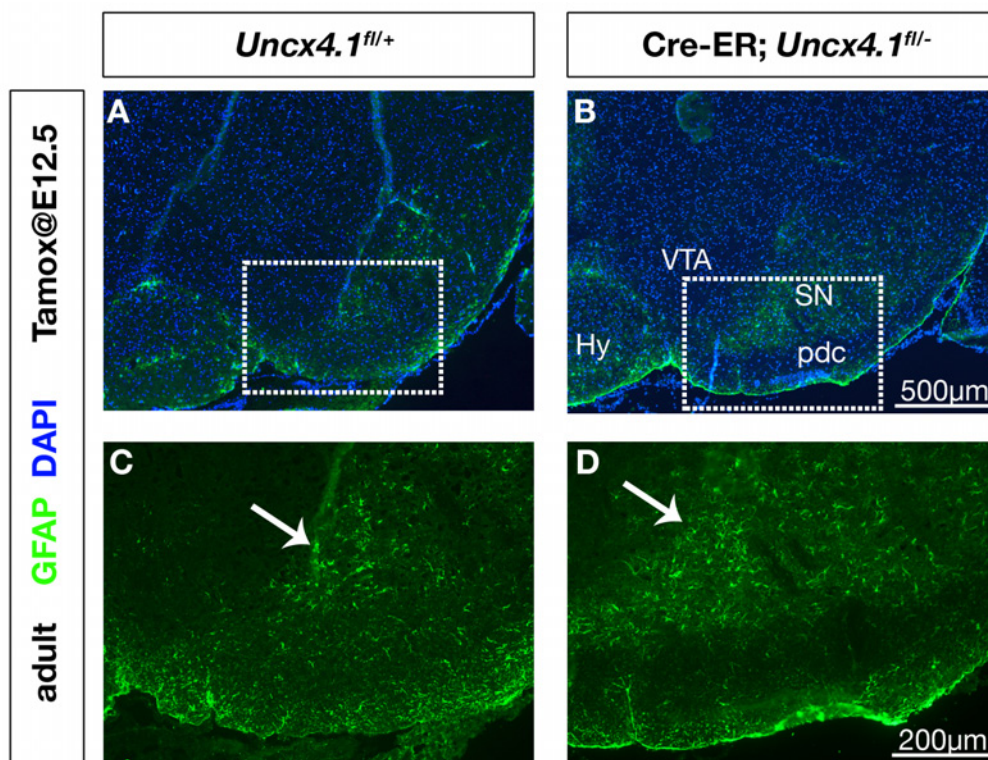


Abb. 35: Die Expression von GFAP im Mittelhirn adulter Cre-ER;*Uncx4.1*^{fl/-} Mäuse. (A-D) IHC gegen GFAP auf coronalen Gewebeschnitten adulter Mausgehirne. (C) zeigt die Vergrößerung des Ausschnitts in (A) und (D) des Ausschnitts in (B). Die Pfeile markieren die Veränderte GFAP Expression. Hy: Hypophyse, pdc: Pedunculus cerebri, SN: Substantia nigra, VTA: ventrales tegmentales Areal

2.8 Untersuchungen der Axone in *Uncx4.1*^{-/-}-Mausembryonen

Das *Unc-4* Gen von *Caenorhabditis elegans* ist ein Homolog von *Uncx4.1* mit einer 88%igen Übereinstimmung (Rovescalli et al., 1996; Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997). Die Expression von *Unc-4* in *C. elegans* ist in VA- aber nicht in VB-Motorneuronen detektierbar (Miller et al., 1992; Miller & Niemeyer, 1995). Gemeinsam mit seinem Co-Repressor *Unc-37* kontrolliert *Unc-4* die Repression spezifischer neuronaler Gene und bestimmt so den synaptischen Eingang der Motorneuronen (Winnier et al., 1999; Von Stetina et al., 2007). Eine weitere Funktion von *Unc-4* ist die Regulation des Expressionslevels verschiedener vesikulärer Proteine (Lickteig et al., 2001). Aufgrund der Homologie von *Uncx4.1* mit dem *Unc-4* Gen liegt die Vermutung nahe, dass auch der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1* eine Rolle bei der axonalen Entwicklung und der Regulation der vesikulären Proteinebenen spielt. Diese Hypothese wurde mittels verschiedener experimenteller Ansätze untersucht und die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

2.8.1 Die Level der synaptischen Proteine sind nicht in Abwesenheit von *Uncx4.1* unverändert

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass das Gen *Unc-4* das Proteinlevel der synaptischen Vesikel in *C. elegans* reguliert (Lickteig et al., 2001). So zeigen einige vesikuläre Proteine in Abwesenheit von *Unc-4* eine veränderte Expression. Zu diesen Proteinen gehören der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACht), Synaptogamin, Synaptobrevin und Rab3a („*ras-related*“ Protein 3a) (Lickteig et al., 2001). Nicht vesikuläre Proteine wie z.B. Syntaxin zeigen keine veränderte Expression (Lickteig et al., 2001). Um zu überprüfen ob die Inaktivierung von *Uncx4.1* Einfluss auf die Expression vesikulärer und nicht-vesikulärer Proteine nimmt, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Proteinextrakt ganzer Gehirne des Embryonalstadiums 18.5 hergestellt und anschließend mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Western Blot Analyse wurde gemeinsam mit Dr. Frederique Varoqueaux am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (Göttingen) durchgeführt.

Das Proteinlevel des vesikulären Acetylcholintransporters (VACht), welcher bis zur Ausschüttung in den Synapsen gespeichert bleibt (Usdin et al., 1995; Arvidsson et al., 1997), ist in *Uncx4.1* Mausmutanten des Stadiums E18.5 nicht verändert (Abb. 36). Ebenso wenig ist ein

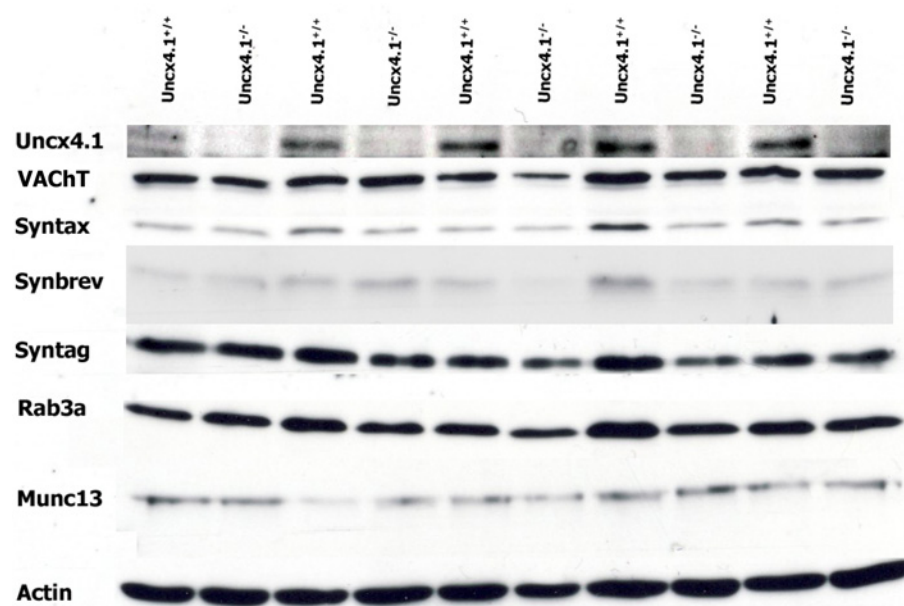


Abb. 36: Die Level verschiedener vesikulärer und nicht vesikulärer postsynaptischer Proteine sind in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen unverändert. Western Blot Analyse von fünf *Uncx4.1*-defizienten und fünf WT Embryonen des Stadiums E18.5. VAcHT: vesikulärer Acetylcholintransporter, Syntax: Syntaxin, Synbrev: Synaptobrevin, Syntag: Syntagmin, Rab3a: „*ras-related*“-Protein 3a.

Unterschied in den Leveln der Proteine Synaptogamin, Synaptobrevin oder Rab3a detektierbar (Abb. 36). Der Funktionsverlust von *Uncx4.1* hat auch keinen Einfluss auf die nicht-vesikulären Proteine wie Syntaxin oder Munc13, das Säugetierhomolog von *Unc-13* aus *C. elegans* (Brose et al., 1995).

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass ein Verlust der *Uncx4.1* Aktivität in Mäusen keinen Einfluss auf das Proteinlevel vesikulärer oder nicht-vesikulärer, synaptischer Proteine ausübt.

2.8.2 Die Axone der Colliculi superiores sind in *Uncx4.1*-Nullmutanten verändert

Neben der Bedeutung für das Proteinlevel vesikulärer Synapsen spielt *Unc-4* in *C. elegans* auch eine Rolle bei der Spezifikation der Axone. So konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass ein Verlust von *Unc-4* in den Nematoden zu strukturellen Defekten in der Morphologie der Motorneuronen führt (Miller et al., 1992; White et al., 1992). Gemeinsam mit seinem Co-Repressor hält *Unc-4* den axonalen Eingang der VA Motorneuronen aufrecht, indem spezifische Gene für VB Motorneuronen reprimiert werden (Pflugrad et al., 1995; Winnier et al., 1999; Von Stetina et al., 2007).

Synapsine sind neuro-spezifische Phosphoproteine, welche mit kleinen synaptischen Vesikeln assoziiert sind, die in sensorischen Nerven und terminalen Nervenenden zu finden sind. Hier sind sie hauptsächlich mit der Membran der synaptischen Vesikel verbunden (Camilli et al., 1983; Greengard et al., 1993) und können zur Analyse von axonalen Defiziten herangezogen werden. Die konfokale Analyse der IHC mit anti-Synapsin I+II zeigt, dass in Abwesenheit von *Uncx4.1* die Axone der Kommissur der Colliculi superiores im dorsalen Mittelhirn an E16.5 (Abb. 37) und E17.5 (Daten nicht gezeigt) verändert sind. So scheint es, dass bei einem Funktionsverlust von *Uncx4.1* eine Kompensation der Axone stattfindet (Abb. 37, Pfeile in C und D). Im ventralen Mittelhirn konnte keine Veränderung der Expression verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

Neben Synapsin wurde auch Calbindin für die Detektion axonaler Defekte im dorsalen Mittelhirn der Maus herangezogen. Calbindin ist ein intrazelluläres Protein, das Kalzium bindet und somit die kalziumabhängigen Signalwege in Neuronen während der Entwicklung reguliert (Wasserman & Fullmer, 1989; Nemere et al., 1991). Aufgrund dieser Tatsache eignet es sich als neuronaler Marker (Baimbridge et al., 1992). Besonders häufig wird Calbindin herangezogen um Purkinjezellen im Cerebellum nachzuweisen (Iacopino et al., 1990; Ishikawa et al., 1995; Sudarov & Joyner, 2007). Calbindin wurde verwendet um axonale Defekte in den *Uncx4.1*^{-/-}-Mausembryonen aufzuzeigen. In *Uncx4.1*-defizienten Mittelhirnen lassen sich bereits an E13.5 Unterschiede feststellen.

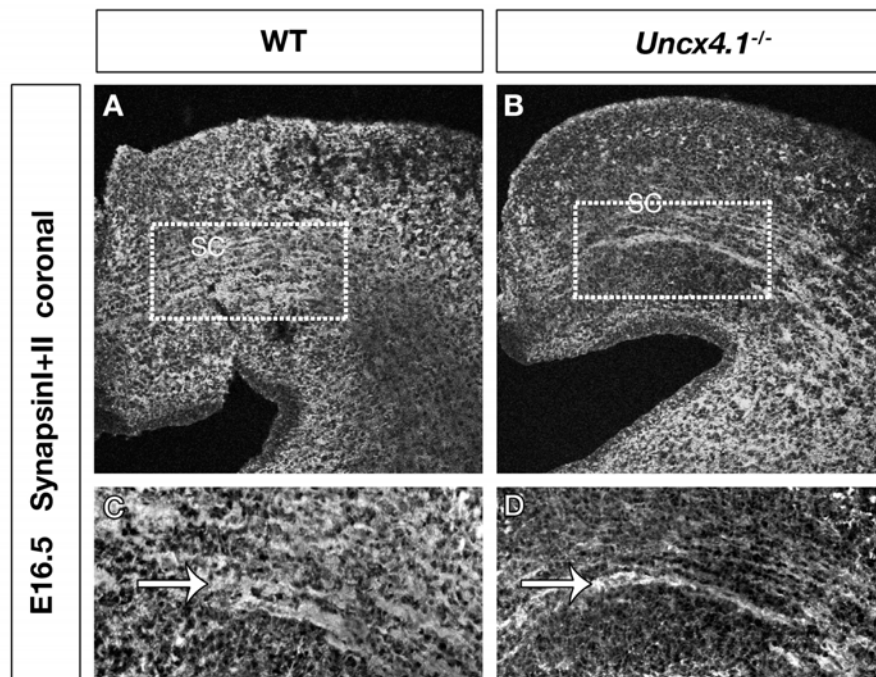


Abb. 37: Die Inaktivierung von *Uncx4.1* führt zu einer Kompensation der Synapsin I+II Expression in den Colliculi superiores. Konfokale Aufnahmen einer IHC coronaler Gewebeschnitte an E16.5 mit anti-Synapsin I+II (A-D). (C) und (D) zeigen die Vergrößerungen des Ausschnitts in (A) und (B). Die Pfeile in (C) und (D) deuten auf die Kompensation der Axone der Colliculi superiores. SC: Colliculi superiores.

In den Kontrollen ist die Expression von Calbindin im dorsalen Mittelhirn in zwei klar voneinander abgrenzbaren Domänen erkennbar (Abb. 38, A-D). In den Mutanten zeigt sich jedoch, dass sich diese Domänen in Abwesenheit von *Uncx4.1* vermischen (Abb. 38, weiße Pfeile in C-D). Auf sagittalen Gewebeschnitten an E18.5 sind mehr Calbindin-positive Neuronen im dorsalen Teil der Colliculi superiores der *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen detektierbar, als in den Kontrolltieren (Abb. 38, weiße Pfeile in G-H). Im ventralen Teil der Colliculi superiores allerdings sind weniger Calbindin-positive Neuronen zu verzeichnen (Abb. 38, G-H).

Zusammenfassen lässt sich feststellen, dass der Funktionsverlust von *Uncx4.1* Unterschiede in der Expression von Synapsin I+II sowie Calbindin in dem Bereich des Colliculus superiores im dorsalen Mittelhirn hervor ruft. Anscheinend führt der Verlust der *Uncx4.1* Aktivität zu einer Kompensation oder möglicherweise einer Verdickung der Axone in den Colliculi superiores im Vergleich zum Wildtyp.

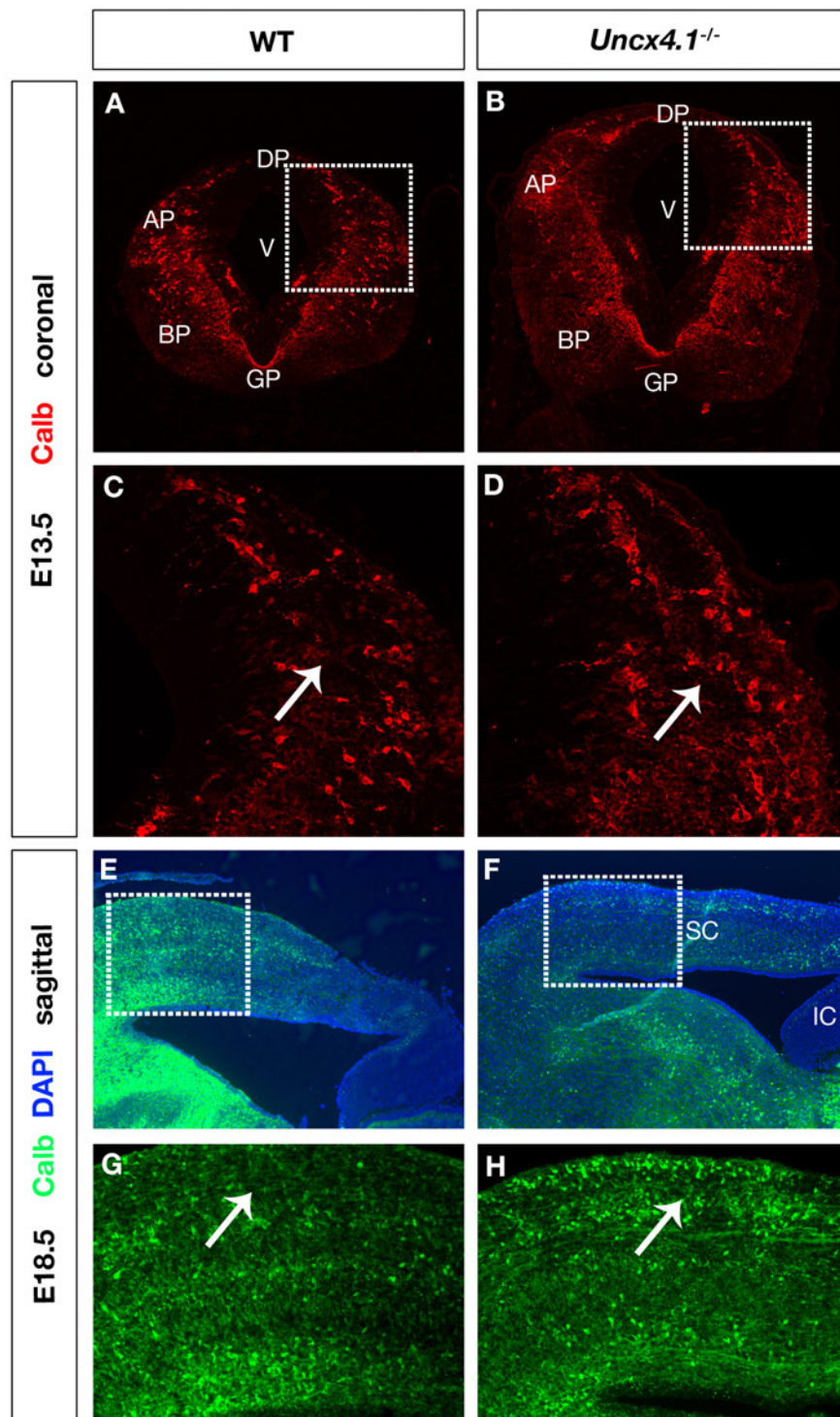


Abb. 38: Die Inaktivierung von *Uncx4.1* führt zu einer Veränderung der Calbindin Expression in den Colliculi superiores. (A-D) Konfokale Aufnahmen einer IHC auf coronalen Gewebeschnitten von Mausembryonen an E13.5 mit anti-Calbindin (rot). (C) Vergrößerung des Ausschnitts in (A). (D) Vergrößerung des Ausschnitts in (B). (E-H) IHC gegen Calbindin (grün) auf sagittalen Gewebeschnitten des Embryonalstadiums 18.5. Die Pfeile in (C-D) und (G-H) deuten auf den Bereich der veränderten Calbindin-Expression im dorsalen Mittelhirn. AP: Alarplatte, BP: Basalplatte, DP: Deckplatte, GP: Bodenplatte IC: Colliculi inferiores, SC: Colliculi superiores, V: III. Ventrikel.

2.8.3 Die Inaktivierung von *Uncx4.1* führt zu verkürzten Axonen und einer verringerten Anzahl axonaler Auswüchse

Die Ergebnisse der Calbindin- und Synapsin I+II Färbung aus Kapitel 2.8.2 deuten darauf hin, dass die Axone der Colliculi superiores in Abwesenheit von *Uncx4.1* beeinträchtigt sind. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Morphologie dieser Axone mittels einer retrograden Axonfärbung unter Verwendung von DiI sichtbar zu machen (Tardif, 2002; Chebat et al., 2006). Daher wurde eine DiI Färbung durchgeführt. Hierzu wurde eine konstante Menge der gelösten DiI Kristalle mit Hilfe einer Injektionspumpe in das dorsale Mittelhirn appliziert. Es wurde immer dieselbe Menge an DiI verabreicht. Ein Beispiel für die Injektionsstelle findet sich in Abbildung 39 (A-B, die weißen Kreise markieren den Bereich der Injektionsstelle), welche ein WT und ein *Uncx4.1*-defizientes Gehirn nach der Injektion zeigt. Die Analyse der Gehirne folgte nach 7 (Daten nicht gezeigt), 8 oder 10 Tagen (Daten nicht gezeigt), wobei sich gezeigt hat, dass die Ergebnisse acht Tage nach der Injektion am deutlichsten sind.

Die Ergebnisse der DiI Injektion bestätigen die Vermutung, dass in *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen axonale Defekte im Bereich der Colliculi superiores vorliegen. So ist erkennbar, dass an E18.5 (Abb. 39, C-D) eine geringere Anzahl axonaler Auswüchse nach lateral zu verzeichnen ist (Abb. 39, weiße Pfeile in C-D). Zusätzlich sind die detektierten Axone in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen kürzer als in den Kontrolltieren (Abb. 39, C-D). Dies ist auch im Embryonalstadium 16.5 zu beobachten (Abb. 39, E-F). Es ist allerdings zu erwähnen, dass jeweils nur drei Tiere pro Genotyp untersucht wurden und die Technik der DiI Injektion nicht immer zu 100% identisch durchführbar ist. Um statistisch signifikante und abgesicherte Ergebnisse zu erhalten, müssten noch weitere Tiere untersucht werden.

Um Einblicke darüber zu erhalten, in wie weit die Morphologie der Axone in *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen verändert ist, wurden weitere morphologische Studien durchgeführt. Hierbei wurde auf die von Camillio Golgi entwickelte Golgi Färbung zurückgegriffen. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich zehn Prozent aller Neuronen anzufärben und so deren Morphologie sichtbar zu machen (Pannese, 1999; Pilati et al., 2008). Dadurch, dass nicht alle Neuronen angefärbt werden, ist es möglich detaillierte Einblicke über die Struktur der gefärbten Neuronen zu erhalten. Die Analyse der Golgi Färbung bestätigt die Ergebnisse der DiI Färbung. Auch die mittels Golgi angefärbten Neuronen der *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen weisen an E18.5 weni-

ger axonale Auswüchse in rostraler oder caudaler Richtung im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 40) auf.

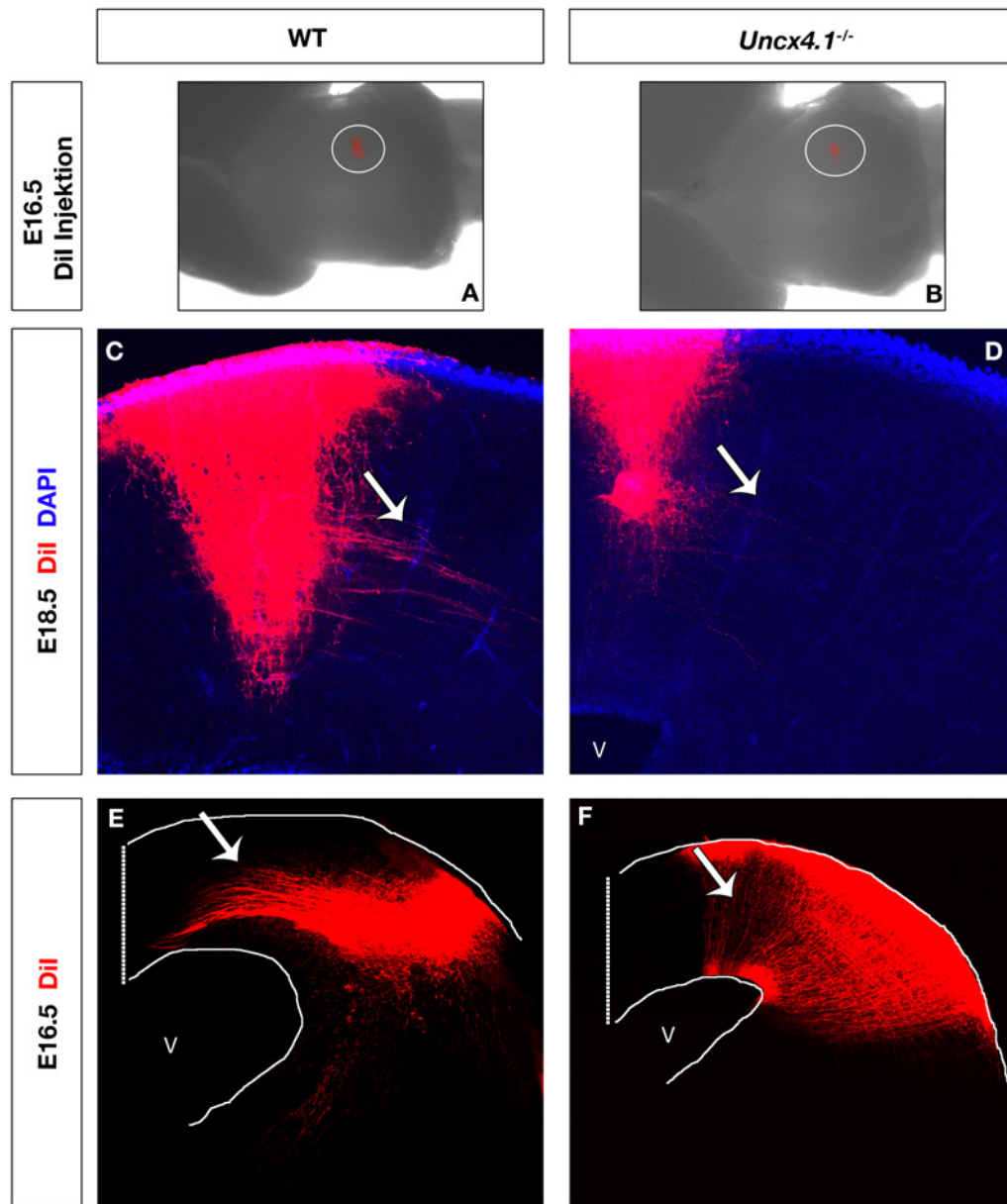


Abb. 39: DiI Färbung der Neuronen im dorsalen Mittelhirn an E16.5 und E18.5. (A-B) Beispielhafter Vergleich der Injektionsstelle von WT (A) und *Uncx4.1*-defizienten (B) Gehirnen von Mausembryonen, wobei der weiße Kreis den Bereich der DiI-Injektionsstele markiert. Der rote Punkt zeigt das injizierte DiI. (C-F) Konfokale Aufnahmen der DiI Färbung (rot) auf Vibratomschnitten an E18.5 (C-D) und E16.5 (E-F). Nach Injektion wurden die Gehirne 8 Tage bei 4 °C in 4 %PFA gelassen, ehe sie geschnitten und analysiert wurden. Die Pfeile zeigen auf die lateral verlaufenden Axone in den Colliculi superiores. V: III. Ventrikel.

Anscheinend ist die Anzahl der Axone pro Neuron in den *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen im Allgemeinen verringert, was die Ergebnisse der DiI Färbung unterstützt (Abb. 40, C und D). Zusätzlich dazu sind die meisten axonalen Auswüchse in Abwesenheit von *Uncx4.1* kürzer als in den Kontrolltieren. Um diese Ergebnisse zu unterstützen ist es allerdings notwendig weitere

Studien, z.B. mittels Zellkulturexplanten der Axone, durchzuführen.

Diese Ergebnissen lassen vermuten, dass der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1* eine Rolle während der axonalen Entwicklung oder ihrer Ausrichtung spielt.

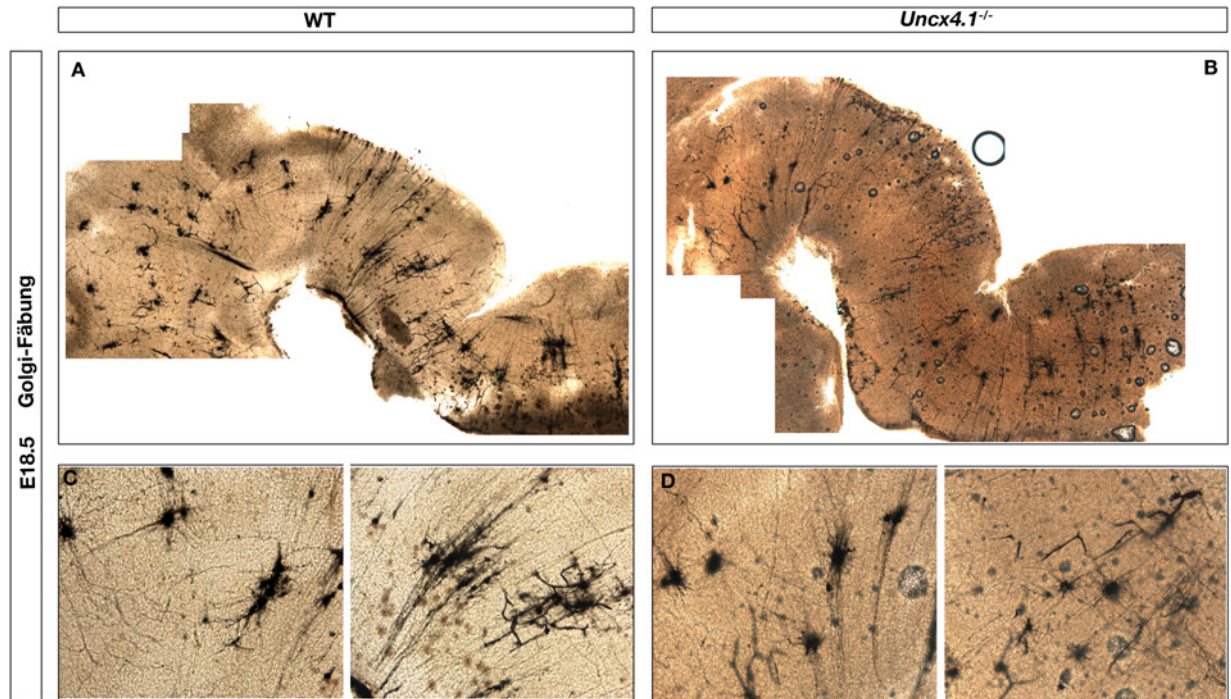


Abb. 40: *Uncx4.1*-Nullembryonen zeigen morphologische Veränderungen der Neuronen im Mittelhirn. (A-D) Golgi Färbung von sagittalen Gewebeschnitten des Stadiums E18.5 von WT (A, C) und *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen (B, D). (C) zeigt einige Neuronen aus (A) in der Vergrößerung, (D) zeigt einige Neuronen aus (B) in der Vergrößerung.

3 Diskussion

Die Rolle der Homöobox enthaltenden Transkriptionsfaktoren bei der Koordination der Expression, sowie Interaktion während der Entwicklung der Vertebraten ist ein weites, noch nicht vollkommen erforschtes Feld der Biologie. Daher bleiben bis heute viele Transkriptionsfaktoren und ihre Funktion unbeschrieben. Das Gen *Uncx4.1* gehört ebenfalls zu den Transkriptionsfaktoren, die eine Homöodomäne enthalten und dessen Funktionen im Gehirn weitestgehend ungeklärt sind. Obwohl die ersten Transkripte von *Uncx4.1* bereits an E9.5 im Mesencephalon detektiert werden können (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997), wurde bisher keine Funktionsanalyse von *Uncx4.1* im Mittelhirn durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Expression von *Uncx4.1* während der Embryonalentwicklung des Mittelhirns untersucht. Da die Ergebnisse darauf hindeuteten, dass *Uncx4.1* in nahezu allen postmitotischen Zellen der unterschiedlichen Neuronengruppen (dopaminergen, GABAergen und glutamatergen) des Mittelhirns exprimiert ist, wurde anschließend untersucht, welche Rolle *Uncx4.1* bei der Entwicklung der einzelnen Neuronenpopulationen spielt. Ein besonderer Fokus lag hier auf der Entwicklung der dopaminergen Neuronen, da die Expression von *Uncx4.1* an E11.5 in nahezu allen TH-positiven Neuronen verzeichnet werden konnte. Zudem sind dopaminerge Neuronen von besonderer Bedeutung, da Teile dieser Neuronenpopulation bei Patienten mit Morbus Parkinson degenerieren (Fahn, 2003). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass *Uncx4.1* ein neuer Faktor im regulatorischen Netzwerk dopaminergener Neuronen im Mittelhirn ist und seine regulatorische Funktion möglicherweise über das proneurale Gen *Ngn2* ausübt. Daneben deutet eine erhöhte Zellzahl glutamaterger Pax6-positiver Zellen, ebenso wie der Verlust der *Ngn2*-mRNA im dorsalen Mittelhirn, darauf hin, dass *Uncx4.1* auch an der glutamatergen Neurogenese beteiligt ist. Im Gegensatz dazu scheint eine Funktion während der GABAergen Neurogenese nahezu ausgeschlossen zu sein, da die Expression verschiedener Marker GABAerger Neuronen nicht beeinflusst ist. Neben den neuronalen Subpopulationen wurden auch die Axone im dorsalen Mittelhirn untersucht. Diese Arbeit liefert erste Anhaltspunkte, dass *Uncx4.1* eine Rolle bei der korrekten Bildung der Axone in den Colliculi superiores zukommt.

3.1 *Uncx4.1* ist in postmitotischen Neuronen des Mittelhirns exprimiert

Die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse von *Uncx4.1* im embryonalen Mittelhirn der Maus offenbart, dass *Uncx4.1* an E11.5 in der gesamten Mantelzone des Mittelhirns exprimiert ist und in späteren Entwicklungsstadien (E13.5 und E17.5) in einem Salz-und-Pfeffer Muster mit *Uncx4.1*-negativen Zellen in der Mantelzone vorliegt. Dies deutet auf eine postmitotische Expression von *Uncx4.1* hin und konnte durch eine Co-Detektion von *Uncx4.1* und *Tuj1* bestätigt werden. Im ventralen Mittelhirn exprimieren nahezu alle *Uncx4.1*-positiven Zellen an E11.5 auch *Tuj1*, während im dorsalen Mittelhirn sowohl *Uncx4.1*-positive/*Tuj1*-negative, als auch *Uncx4.1*-negative/*Tuj1*-positive Zellen detektiert werden können. Die Existenz von *Uncx4.1*-positiven, aber *Tuj1*-negativen Zellen im dorsalen Mesencephalon deutet darauf hin, dass die Expression von *Uncx4.1* wahrscheinlich während der letzten mitotischen Phase beginnt, kurz bevor die Vorläuferzellen den Zellzyklus verlassen und postmitotisch werden.

Die Co-Lokalisation von *Uncx4.1* und TH zeigt, dass *Uncx4.1* von reifen dopaminergen Neuronen exprimiert wird. Daneben ist *Uncx4.1* aber auch in unreifen dopaminergen Neuronen exprimiert, was durch die Co-Lokalisation mit *Ngn2* deutlich wird (Kele et al., 2006). Der Fund *Ngn2* und *Uncx4.1* co-positiver Zellen in den lateralen Bereichen der Basalplatte und dem dorsalen Mittelhirn zeigt auf, dass *Uncx4.1* auch von glutamatergen Neuronen exprimiert wird (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009). Dies wird durch die Co-Detektion von *Uncx4.1* und *Foxa2* in der gesamten Mantelzone des ventralen Mittelhirns bestätigt. Ebenso zeigt die Co-Lokalisation mit *Foxa2*, dass *Uncx4.1* von dopaminergen und GABAergen Neuronen exprimiert wird (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Waite et al., 2011).

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass *Uncx4.1* in dopaminergen, GABAergen und glutamatergen Neuronenpopulationen des Mittelhirns exprimiert ist und seine Expression nicht auf eine bestimmte neuronale Abstammung zurückzuführen ist. Sammeta et al. (2010) schlussfolgerten, dass die Expression von *Uncx4.1* einsetzt, sobald die Vorläufer ein neuronales Schicksal annehmen. Es wurde auch berichtet, dass *Uncx4.1* ebenfalls in basalen Vorläuferzellen des Bulbus olfactorius exprimiert ist. Im Gegensatz dazu, ist keine *Uncx4.1* Expression in neuronalen Progenitoren des Mittelhirns detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass die Expression im Mittelhirn später, und nicht direkt mit der Adaption eines neuronalen Zellschicksals, einsetzt. Dennoch ist anzunehmen, dass sie unabhängig von dem neuronalen

Subtyp ist. Die Vermutung von Sammeta et al. (2010), dass die Induktion der *Uncx4.1* Expression durch das proneurale Gen *Mash1* in den proneuralen Vorläuferzellen ausgelöst werden könnte, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. So ist *Mash1* an E11.5 nahezu in allen neuronalen Progenitoren des Mittelhirns exprimiert (Kala et al., 2009; Peltopuro & Kala, 2010), während *Uncx4.1* zu diesem Zeitpunkt in allen Bereichen der Mantelzone detektiert werden kann. Zudem können, einhergehend mit der fehlenden Expression von *Mash1* (Peltopuro & Kala, 2010), an E10.5 keine *Uncx4.1* Transkripte in der Bodenplatte beobachtet werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Analyse *Mash1*-defizienter Mittelhirne, hinsichtlich eines möglichen Expressionsverlustes von *Uncx4.1*, wie im Bulbus olfactorius beschrieben (Sammeta et al., 2010).

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1*, unabhängig von der neuronalen Abstammung, in postmitotischen Neuronen des Mittelhirns exprimiert ist. Weiterhin liefert die Expressionsanalyse von *Uncx4.1* Hinweise darauf, dass die Expression von *Uncx4.1* nach der von *Mash1* folgt.

3.2 Die Funktion von *Uncx4.1* während der Entwicklung dopaminerger Neuronen im Mittelhirn

Der Verlust dopaminerger Neuronen in der SN des ventralen Mittelhirns ist mit einer der bis heute bekanntesten, neurologischen Krankheiten assoziiert: Morbus Parkinson (Lang & Lozano, 1998a,b; Fahn, 2003). Aufgrund der klinischen Relevanz der Parkinsonschen Krankheit, hat die Entschlüsselung des regulatorischen Netzwerkes dieser Neuronen in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Denn nur bei genauer Kenntnis aller beteiligten Faktoren können erfolgreiche Strategien zur Generierung dopaminerger Neuronen für z.B. Zelltransplantationstherapien entwickelt und umgesetzt werden (Winkler & Kirik, 2005). So gelang es in den letzten Jahren verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie *Otx2*, *Msx1*, *Foxa2*, *Lmx1a*, *Lmx1b*, *Ngn2*, *Nurr1* und *Pitx3* als Regulatoren des Netzwerkes zu identifizieren und zu charakterisieren (Saucedo-Cardenas et al., 1998; Wallen et al., 1999; Smidt et al., 2004; Maxwell et al., 2005; Andersson et al., 2006b,a; Blaess et al., 2006; Kele et al., 2006; Prakash et al., 2006; Ferri et al., 2007; Ono et al., 2007; Chung et al., 2009; Lin et al., 2009; Nakatani et al., 2010; Mavromatakis et al., 2011). Trotz des mittlerweile umfangreichen Wissens über die Initiierung, Spezifikation und Differenzierung der mDA Neuronen sind noch immer nicht alle beteiligten Faktoren bekannt

oder blieben bislang unerforscht.

Die nahezu vollständige Co-Detektion von *Uncx4.1* mit TH in den frühen Embryonalstadien (E11.5) führte zu der Annahme, dass *Uncx4.1* möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung der dopaminergen Neuronen spielt. Die daraufhin durchgeführte Expressionsanalyse verschiedener Marker von mDA Neuronen in *Uncx4.1^{-/-}* Embryonen zeigt, dass alle untersuchten Marker im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert sind. Eine quantitative Analyse bestätigte dies (eine Zusammenfassung der Marker findet sich in Tab. 1). Diese Ergebnisse deuten auf einen allgemeinen partiellen Verlust dopaminergener Neuronen im Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Embryonen hin. Interessanterweise allerdings ist an E17.5 ein deutlich größerer Verlust von Calbindin- und Calretinin-positiven Zellen in *Uncx4.1*-defizienten Tieren, im Vergleich mit anderen mDA Markern, zu verzeichnen. Da Calbindin und Calretinin vorzugsweise in den dopaminergen Neuronen der VTA exprimiert sind (Liang et al., 1996; Nemoto et al., 1999), und frühere Studien Calbindin bereits als Marker der mDA Neuronen in der VTA verwendet haben (Andersson et al., 2006a), deutet der erhöhte Verlust dieser Zellen darauf hin, dass *Uncx4.1* eine wichtigere Bedeutung in den mDA Neuronen der VTA, als in denen der SN, zukommt.

Gen/Protein	Untersuchtes Stadium	Marker für:	Effekt
TH	E11.5	mDA Neuronen	26%iger Verlust
TH	E17.5	mDA Neuronen	26%iger Verlust
DAT	E17.5	mDA Neuronen	Reduzierung der Expression
Pitx3	E17.5	mDA Neuronen	31%iger Verlust
Nurr1	E11.5	mDA Neuronen	28%iger Verlust
Nurr1	E16.5	mDA Neuronen	24%iger Verlust
Calbindin	E17.5	mDA Neuronen der VTA	43%iger Verlust
Calretinin	E17.5	mDA Neuronen der VTA	58%iger Verlust
Foxa2	E11.5	mDA Neuronen, GABAerge und glutamaterge Neuronen	unverändert
Foxa2	E12.5	mDA Neuronen, GABAerge und glutamaterge Neuronen	unverändert
Lmx1a	E11.0	mDA Neuronen	unverändert
Lmx1a	E12.5	mDA Neuronen	unverändert
Ngn2	E11.5	mDA Neuronen und glutamaterge Neuronen	Reduzierung der Expression

Tab. 1: Zusammenfassung der Veränderung dopaminergener Neuronen im ventralen Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Embryonen. Es wurden mindestens n=3 Embryonen pro Marker und Stadium untersucht.

Eine verminderte Proliferation oder erhöhte Apoptose sind nicht für den Verlust der mDA Neuronen in *Uncx4.1*-defizienten Tieren verantwortlich, da sowohl die Anzahl der proliferierenden Zellen, als auch die Anzahl apoptotischer Zellen in Abwesenheit von *Uncx4.1* unverändert ist. Dies ist gegensätzlich zu den Untersuchungen im Bulbus olfactorius, denn dort konnte bei einem Aktivitätsverlust von *Uncx4.1* eine verminderte Proliferations-, sowie eine deutlich erhöhte Apoptoserate festgestellt werden (Sammata et al., 2010). Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass *Uncx4.1* im Mittelhirn nicht in Vorläuferzellen, wie im Bulbus olfactorius (Saito et al., 1996; Sammata et al., 2010), sondern nur in postmitotischen Neuronen, expri-

miert wird. Neben Proliferationsdefekten und einer vermehrten Apoptose kann auch eine zeitliche Verzögerung der Differenzierung als Ursache für die Reduzierung der mDA Neuronen in *Uncx4.1*-Mausmutanten ausgeschlossen werden, denn die Expression von *Tuj1* war im Vergleich zu Kontrolltieren nicht verändert. Aufgrund dieser Ergebnisse, kann ausgeschlossen werden, dass *Uncx4.1* eine Rolle während der Initiation der dopaminergen Neurogenese zukommt. Da *Uncx4.1* hauptsächlich von reifen mDA Neuronen (markiert durch TH und *Uncx4.1* Co-Expression) exprimiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass *Uncx4.1* für Differenzierung der mDA Neuronen von Bedeutung ist. Hingegen ist *Uncx4.1* nicht für den Erhalt der mDA Neuronen notwendig, da es an E11.5 in nahezu allen TH-positiven Neuronen co-exprimiert ist, was an E17.5 nicht mehr der Fall ist (Daten nicht gezeigt). Diese Vermutung wird durch die Analysen der konditionalen Knockoutlinie *Cre-ER;Uncx4.1^{fl/fl}* unterstützt, da in diesen Mutanten kein allgemeiner Verlust der mDA Neuronen verzeichnet werden kann. Die Inaktivierung von *Uncx4.1* durch Tamoxifen erfolgte bei diesen Tieren erst an E12.5. Zu diesem Zeitpunkt ist die Generierung der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns bereits weitestgehend abgeschlossen. Somit wäre ein Verlust der mDA Neuronen in diesen Mausmutanten nur dadurch zu erklären, dass *Uncx4.1* eine Rolle während der Erhaltung der dopaminergen Neuronen zukommt.

Das proneurale Gen *Ngn2* ist notwendig für die Differenzierung der mDA Neuronen und seine Expression beginnt nach der von *Uncx4.1*. In Abwesenheit von *Ngn2* ist die Anzahl dopaminergener Neuronen drastisch reduziert (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006). Da der Funktionsverlust von *Uncx4.1* eine Reduzierung der *Ngn2*-mRNA bewirkt, ist es möglich, dass der Verlust der mDA Neuronen das Resultat der verminderten *Ngn2* Expression ist. In *Ngn2*-Mausmutanten sind an E11.5 kaum *Nurr1*-positive Zellen zu verzeichnen, wohingegen an E13.5 deutlich mehr *Nurr1*-positive Neuronen vorhanden sind (Andersson et al., 2006a; Kele et al., 2006). Kele et al. (2006) vermuten, dass die Regeneration *Nurr1*-positiver Zellen in *Ngn2^{-/-}* Embryonen auf eine Kompensation durch *Mash1* zurückzuführen ist, da die Expression von *Mash1* an der ventralen Mittellinie ab E13.5 wieder detektierbar ist, wohingegen sie an E11.5 nicht zu verzeichnen ist. Trotz der verminderten Expression von *Ngn2* in *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen kann keine Regeneration *Nurr1*-positiver Zellen verzeichnet werden. Dies kann durch die normale Expression von *Mash1* in Abwesenheit von *Uncx4.1*, im Vergleich zu den Kontrolltieren, erklärt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie von Kele et al. (2006), dass *Mash1* wesentlich an der Regeneration *Nurr1*-positiver Zellen beteiligt ist. Der Verlust der *Uncx4.1* Expression im Bereich reifer mDA Neuronen *Ngn2*-defizienter Mausembryonen mag schlicht

auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass ihre Generierung in Abwesenheit von *Ngn2* verzögert ist, denn in den Embryonalstadien E11.5 und E13.5 sind in *Ngn2*^{-/-} keine bzw. kaum reife mDA Neuronen detektierbar.

Durch die gewonnenen Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation, kann ausgeschlossen werden, dass *Ngn2* und *Uncx4.1* eine Protein-Protein-Interaktion eingehen. Möglicherweise findet eine direkte Regulation von *Ngn2* durch *Uncx4.1* statt, wahrscheinlicher ist jedoch, dass *Uncx4.1* zunächst weitere Gene in der Kaskade reprimiert oder aktiviert, die dann ihrerseits die Expression von *Ngn2* regulieren. Es ist möglich, dass *Uncx4.1* gemeinsam mit einem Co-Repressor agiert und eine reprimierende Funktion hat, wie es beim Homolog *Unc4* in *C.elegans* der Fall ist (Miller et al., 1993; Winnier et al., 1999; Lickteig et al., 2001; Von Stetina et al., 2007; Jafari et al., 2011). Da einige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Oct4 (Pan et al., 2002), sowohl inhibitorische als auch aktivierende Funktionen besitzen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Uncx4.1* als Aktivator fungiert.

Nakatani et al. (2010) konnten zeigen, dass das Protein *Sim1* in der Lage ist die Differenzierung der mDA Neuronen zu reprimieren, weshalb die erhöhte Expression von *Sim1* an E12.5 in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen ebenfalls dazu beitragen könnte, dass in Abwesenheit von *Uncx4.1* weniger mDA Neuronen gebildet werden. Dies ist jedoch recht unwahrscheinlich, da an E11.5 keine erhöhte *Sim1* Expression beobachtet werden kann, obwohl die Anzahl der TH- und Nurr1-positiven Neuronen bereits reduziert ist.

Die Expression von *Lmx1a* ist in Abwesenheit von *Uncx4.1* nicht verändert, genauso wenig wie die Expression von *Uncx4.1* in Abwesenheit von *Lmx1a*. Somit kann eine Interaktion dieser beiden Faktoren nahezu ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse deuten auf die Existenz zweier Signalwege hin, die an der Entwicklung der mDA Neuronen beteiligt sind.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von β -Catenin in *Uncx4.1*^{-/-} Embryonen ab E13.5 im ventralen Mittelhirn herunter reguliert ist, an E12.5 aber noch normal exprimiert wird. β -Catenin kommt in der Entwicklung der mDA Neuronen verschiedene Aufgaben zu. So beeinflusst β -Catenin unter anderem die Neurogenese der mDA Neuronen und wurde als wichtiger Co-Faktor der Genregulation in diesem Bereich beschrieben (Tang et al., 2009; Chilov et al., 2010). Dass der Verlust der mDA Neuronen in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen auf die Reduzierung der β -Catenin Expression im ventralen Mittelhirn zurückzuführen ist, ist unwahrscheinlich, da die mDA Neuronen bereits an E11.5 reduziert sind, wenn die Expression von β -Catenin noch unbeeinflusst ist. Interessanterweise ist β -Catenin an

der Migration der dopaminergen Neuronen der VTA und SN beteiligt (Tang et al., 2009). Während der Entwicklung migrieren postmitotische mDA Neuronen zunächst nach ventral entlang den Fasern der radialen Gliazellen, ehe sie beginnen lateral entlang der tangential angeordneten Nervenfasern zu wandern (Kawano et al., 1995; Ohyama et al., 1998; Gale & Li, 2008). Bei der Analyse der in dieser Arbeit verwendeten konditionalen Knockoutlinie Cre-Er;*Uncx4.1^{fl/-}* war keine signifikante Veränderung in der Gesamtzellzahl TH-positiver Neuronen zu verzeichnen. Dennoch war bei diesen Mutanten eine verminderte TH-Expression im lateralen Bereich der SN, ebenso wie ein größerer Abstand zwischen der VTA und SN, festzustellen. Dies deutet auf Migrationsdefekte hin, die auf die verminderte β -Catenin Expression zurückgeführt werden könnten. Obwohl in *Foxa2-Cre;Uncx4.1^{fl/-}* kein Verlust der lateralen TH-positiven Neuronen der SN zu verzeichnen war, wurde dennoch ebenfalls der vergrößerte Abstand zw. VTA und SN detektiert. Um zu spezifizieren, ob es sich tatsächlich um Migrationsdefekte handelt sind jedoch weitere Analysen notwendig.

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Uncx4.1* ein neuer Transkriptionsfaktor ist, der an dem regulatorischen Netzwerk der dopaminergen Neuronen des Mittelhirns beteiligt ist und seinen Einfluss wahrscheinlich über die Regulation von *Ngn2* ausübt. Ob eine direkte oder eine indirekte Regulation durch weitere Faktoren erfolgt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Neben der Aufgabe der Differenzierung spielt *Uncx4.1* vermutlich auch eine Rolle bei der Migration der dopaminergen Neuronen, was durch die Analyse der konditionalen Mausmutanten deutlich wird. An der Erhaltung reifer mDA Neuronen ist *Uncx4.1* allem Anschein nach nicht beteiligt.

3.3 *Uncx4.1* spielt keine Rolle während der Entwicklung der GABAergen Neuronen im embryonalen Mittelhirn der Maus

Im Gegensatz zu der Entwicklung GABAerger Neuronen im Vorderhirn, ist *Mash1* im Mittelhirn für ihre Entwicklung essenziell (Casarosa et al., 1999; Miyoshi & Bessho, 2004). Es wird vermutet, dass *Uncx4.1* während der Neurogenese sequenziell nach *Mash1* exprimiert wird (Kap. 3.1, (Sammata et al., 2010)). Da *Uncx4.1* in postmitotischen GABAergen Neuronen detektiert werden konnte ist anzunehmen, dass *Uncx4.1* während ihrer Differenzierung beteiligt ist. Es wäre möglich, dass *Uncx4.1*, ähnlich wie *Gata2*, als postmitotischer Selektor fungiert (Kala et al., 2009). Neben dem Vorkommen GABAerger Neuronen in der Basal- und Alarplatte

Gen/Protein	Untersuchtes Stadium	Marker für:	Effekt
Helt	E11.5	GABAerge Neuronen der VZ	unverändert
Mash1	E11.5	GABAerge Neuronen der VZ	unverändert
Gad67	E11.5	GABAerge Neuronen der MZ	unverändert
Gad67	E17.5	GABAerge Neuronen der MZ	unverändert
Nkx2.2	E12.5	GABAerge Neuronen VZ und MZ	unverändert
Gata2	E11.5	GABAerge Neuronen der MZ	unverändert
Olig2	E17.5	GABAerge Neuronen der MZ	unverändert
Olig2	E17.5	GABAerge Neuronen der MZ	unverändert
Foxa2	E11.5	dopaminerge, glutamaterge und GABAerge Neuronen der VZ und MZ	unverändert
Foxa2	E12.5	dopaminerge, glutamaterge und GABAerge Neuronen der VZ und MZ	unverändert

Tab. 2: Zusammenfassung der Veränderung GABAerger Marker im ventralen Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Embryonen. Die verschiedenen Marker sind mit Ausnahme von *Mash1* nicht in allen GABAergen Neuronen, sondern nur in Subpopulationen der GABAergen Neuronen, exprimiert. Es wurden mindestens n=2 Embryonen pro Marker und Stadium untersucht. VZ: ventrikuläre Zone, MZ: Mantelzone.

des Mittelhirns, sind in frühen Entwicklungsstadien (E11.5) auch GABAerge Neuronen in der Bodenplatte lokalisiert (Kala et al., 2009). Später findet man sie auch im Bereich der VTA und SN (Steffensen et al., 1998; Korotkova et al., 2004). Da die Reduzierung der dopaminergen Neuronen nicht auf Zellproliferationsdefekte, Apoptose oder eine verzögerte Reifung zurückzuführen ist, wurde überprüft, ob die dopaminergen Neuronen ihre Identität in ein GABAerges Zellschicksal ändern. Bei keinem der verwendeten Marker GABAerger Neuronen war eine Veränderung in ihrer Expression in *Uncx4.1*-defizienten Mausmutanten zu verzeichnen (Tab. 2), was darauf schließen lässt, dass *Uncx4.1* nicht an ihrer Differenzierung beteiligt ist. Es ist allerdings zu beachten, dass mit Ausnahme von *Mash1* keiner der verwendeten Marker in den GABAergen Neuronen der SN oder VTA bzw. der Bodenplatte (an E11.5) exprimiert ist. Daher kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die dopaminergen Neuronen ein GABAerges Zellschicksal in diesem ventromedialen Bereich annehmen. Da bislang jedoch keine Marker dieser speziellen Subpopulation GABAerger Neuronen bekannt sind, konnten hierzu keine Studien durchgeführt werden. Dennoch ist es aufgrund der vorgestellten Daten sehr unwahrscheinlich, dass *Uncx4.1* das GABAerge Zellschicksal beeinflusst. Um zu überprüfen, ob sich die Identität der dopaminergen Neuronen in ein GABAerges Zellschicksal verändert hat, wären z.B. 'Patch-clamp' Messungen möglich und sollten in einer weiterführenden Analyse durchgeführt werden (Neher & Sakmann, 1976).

3.4 Die Funktion von *Uncx4.1* während der Entwicklung der glutamatergen Neuronen des Mittelhirns

Die glutamatergen Neuronen des Mittelhirns sind sowohl im ventralen als auch im dorsalen Mittelhirn lokalisiert. An E11.5 grenzt die Domäne *Brn3a*-, als auch *Sim1*-positiver, glutamaterger Neuronen direkt an die der dopaminergen Neuronen (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009; Waite et al., 2011). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die reduzierten dopaminergen Neuronen ein glutamaterges Zellschicksal annehmen. Hierfür wurde die Expression verschiedener neuronaler Marker auf coronalen Gewebeschnitten analysiert (eine Übersicht befindet sich in Tab. 3). Es konnte gezeigt werden, dass die Marker der glutamatergen Neuronen des Nucleus ruber (*Sim1* und *Brn3a*) in *Uncx4.1*^{-/-}-Mausmutanten eine verstärkte mRNA Expression aufweisen. Der Transkriptionsfaktor *Nkx6.1*, der an der korrekten Entwicklung dieser Neuronenpopulation beteiligt ist (Prakash et al., 2009), zeigt ebenfalls eine erhöhte mRNA Expression, während mittels IHC kein Unterschied in der Expression auszumachen ist. Es ist bekannt, dass die Menge an mRNA und Protein in der Zelle variieren kann und die Proteinexpression nicht immer mit der mRNA Menge in Beziehung steht (Gygi et al., 1999; Lichtinghagen et al., 2002; Zermeno et al., 2009). Hierfür könnten post-transkriptionale oder -translationale Modifikationen die Ursache sein (Anderson & Seilhamer, 1997). Möglich wäre auch, dass ein erhöhtes Proteinlevel mittels der angewendeten Methode (IHC) nicht nachweisbar war. Frühere Studien zeigten bereits, dass eine *in situ* Hybridisierung unter Umständen sensitiver ist, als eine Immunohistochemische Analyse (Alonso et al., 1992; Lee et al., 2003). Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der erhöhten *Brn3a*- und *Sim1*-mRNA darauf hin, dass *Uncx4.1* eine Funktion während der Entwicklung der glutamatergen Neuronen des Nucleus ruber zukommt, und dass die erhöhte Expression von *Brn3a* und *Sim1* möglicherweise auf die erhöhte *Nkx6.1* mRNA zurückzuführen ist (Prakash et al., 2009).

Pax6 ist in einer kleinen Subgruppe glutamaterger Neuronen in der lateralen Basalplatte des Mittelhirns exprimiert (Kala et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl *Pax6*-positiver Zellen in *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen ab dem Embryonalstadium 13.5 erhöht ist. So sind an E13.5 ca. 55 % mehr *Pax6*-positive Zellen zu verzeichnen, wohingegen an E17.5 nur noch ca. 25 % mehr *Pax6*-positive Zellen im Vergleich zu Wildtypen detektierbar sind. Dies reflektiert die erhöhte Neurogenese die an E13.5, im Vergleich zu E17.5, abläuft (Finlay & Darlington, 1995). Durch eine Doppelimmunfärbung wurde deutlich, dass

Gen/Protein	Untersuchtes Stadium	Marker für:	Effekt
Brn3a	E11.5	glutamaterge Neuronen des NR und des dorsalen Mittelhirns	ventral stärkere Expression, dorsal unverändert
Brn3a	E12.5	glutamaterge Neuronen des NR und des dorsalen Mittelhirns	ventral stärkere Expression, dorsal unverändert
Brn3a	E13.5	glutamaterge Neuronen des NR und des dorsalen Mittelhirns	ventral stärkere Expression, dorsal unverändert
Sim1	E11.5	glutamaterge Neuronen des NR	unverändert
Sim1	E12.5	glutamaterge Neuronen des NR	stärkere Expression
Nkx6.1 - IHC	E12.5	glutamaterge Neuronen in der BP	unverändert
Nkx6.1 - ISH	E12.5	glutamaterge Neuronen in der BP	stärkere Expression
Pax6	E11.5	glutamaterge Neuronen der lateralen BP	unverändert
Pax6	E12.5	glutamaterge Neuronen der lateralen BP	unverändert
Pax6	E13.5	glutamaterge Neuronen der lateralen BP	55% mehr Pax6-positive Zellen
Pax6	E17.5	glutamaterge Neuronen der lateralen BP	26% mehr Pax6-positive Zellen
Ngn2	E11.5	dopaminerge und glutamaterge Neuronen	reduzierte Expression
Foxa2	E11.5, E12.5	dopaminerge, glutamaterge und GABAerge Neuronen	unverändert
Isl1	E11.5	glutamaterge Oculomotor Neuronen	unverändert

Tab. 3: Zusammenfassung der Veränderung spezifischer Marker glutamaterger Neuronen im Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Embryonen. Die verschiedenen Marker sind nur in Subpopulationen der glutamatergen Neuronen exprimiert. Es wurden mindestens n=3 Embryonen pro Marker und Stadium untersucht (außer für Sim1 und Nkx6.1 (ISH), hier wurden jeweils nur zwei untersucht). NR: Nucleus ruber, BP: Basalplatte.

mehr Pax6-positive Zellen im ventralen Bereich zu finden sind, was für eine Expansion dieser Domäne Richtung ventral spricht. Dies muss allerdings durch weitere Analysen bestätigt werden. Da Kele et al. (2006) berichteten, dass vorläufige Daten eine erhöhte mRNA Expression von *Pax6* in *Ngn2*-defizienten Mäusen zeigen, wurde zunächst davon ausgegangen, dass der Verlust der *Ngn2*-mRNA der Grund für die erhöhte *Pax6* Expression sei. Diese Vermutung konnte zunächst durch die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation bestätigt werden, da *Ngn2* und *Pax6* auf Protein-Protein Ebene miteinander interagieren. Dies Ergebnis bestätigt frühere Resultate von Tripathi et al. (2009). Die Autoren konnten mittels *in silico* Analyse eine potenzielle Protein-Protein Bindung von *Ngn2* und *Pax6* vorhersagen (Tripathi & Mishra, 2009). Eine nähere Untersuchung von *Ngn2*^{-/-} Mausembryonen zeigte im Vergleich zu Kontrolltieren keine Veränderung der Anzahl Pax6-positiver Zellen. Daraus kann abgeleitet werden, dass die erhöhte Anzahl Pax6-positiver Zellen in *Uncx4.1*^{-/-} Mausembryonen nicht durch die Reduzierung der *Ngn2*-mRNA hervorgerufen wird und *Uncx4.1* somit wichtige Funktionen während der glutamatergen Neurogenese übernimmt. Die Bildung eines Proteinkomplexes von *Pax6* und *Uncx4.1* kann jedoch ausgeschlossen werden, da mittels Co-IP keine Interaktion dieser beiden Proteine nachweisbar war. Die Tatsache, dass die Expression von *Uncx4.1* in *Pax6*-defizienten

Mausembryonen unverändert ist lässt vermuten, dass *Pax6* in der Signalkaskade abwärts von *Uncx4.1* agiert.

Vorhergehende Studien im murinen Cortex und Mesencephalon haben gezeigt, dass *Ngn2* ein glutamaterges Zellschicksal fördert (Schuurmans et al., 2004; Nakatani et al., 2007). Im dorsalen Mittelhirn ist *Ngn2* in glutamatergen Neuronen detektierbar (Nakatani et al., 2007; Kala et al., 2009). Die nahezu vollständige Reduzierung der *Ngn2*-mRNA im dorsalen Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Mausembryonen weist demnach ebenfalls auf die Involvierung von *Uncx4.1* bei der Spezifikation oder Differenzierung eines glutamatergen Zellschicksals hin. Interessanterweise konnte kein Unterschied in der Expression von *Brn3a* im dorsalen Mittelhirn verzeichnet werden, was die Existenz von Neuronen mit einem glutamatergen Phänotyp aufzeigt. Die Expression von *Ngn2* ist also möglicherweise nicht notwendig für die Etablierung eines glutamatergen Zellschicksales in diesem Gehirnareal. Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass die noch immer vorhandenen, geringen Mengen an *Ngn2*-mRNA im dorsalen Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Mausembryonen noch ausreichen, um die glutamaterge Linie erfolgreich zu differenzieren. Unterstützt wird dies durch die erhöhte Expression von *Brn3a* im Nucleus ruber, aber nicht im dorsalen Mittelhirn.

Die erhöhte Expression verschiedener Marker im Nucleus ruber und die Reduzierung der *Ngn2*-mRNA im dorsalen Mittelhirn, deutet auf die Existenz verschiedener Signalwege während der Entwicklung der glutamatergen Neuronen hin.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die erhöhte Expression verschiedener Marker im Nucleus ruber und die erhöhte Anzahl *Pax6*-positiver Zellen, ebenso wie der Verlust der *Ngn2*-mRNA darauf hindeutet, dass *Uncx4.1* an der glutamatergen Neurogenese beteiligt ist. Aufgrund seiner fehlenden Expression in mitotischen Zellen und seiner Funktion in dopaminergen Neuronen ist anzunehmen, dass *Uncx4.1* während der Differenzierung der glutamatergen Neuronen involviert ist. Die Frage, der in dieser Arbeit nachgegangen wurde, ob die reduzierten dopaminergen Neuronen ein glutamaterges Zellschicksal annehmen, kann nicht abschließend geklärt werden. Aufgrund der erhöhten Expression der glutamatergen Marker im Nucleus ruber und der räumlichen Nähe dieser Neuronen zu den mDA Neuronen ist es jedoch recht wahrscheinlich, dass einige mDA Neuronen in Abwesenheit von *Uncx4.1* ein glutamaterges Zellschicksal annehmen. Somit wird der Verlust der mDA Neuronen durch eine Akkumulation glutamaterger Neuronen kompensiert. Es ist möglich, dass *Uncx4.1* im Mittelhirn als postmitotisches Selektorgen fungiert (Cheng et al., 2004; Kala et al., 2009), indem es das

glutamaterge Zellschicksal zu Gunsten des dopaminergen Zellschicksals unterdrückt. Bereits in der Vergangenheit konnte im Rückenmark eine ähnliche Funktion des Homöobox enthaltenden Transkriptionsfaktors *Lbx1* gezeigt werden. *Lbx1* agiert im Hinterhirn als Selektorgen während der Spezifizierung von Vorläufern in somatosensorische und viszerosensorische Neuronen (Sieber et al., 2007). Um die Funktion von *Uncx4.1* als Selektorgen zu bestätigen, müssen noch weitere Analysen folgen. Neben zusätzlichen Untersuchungen *Uncx4.1*-defizienter Mäuse würden sich einige *in vitro* Studien anbieten. So wäre es möglich *Uncx4.1*-defiziente Neurosphären zu generieren: dabei werden neurale Vorläuferzellen kultiviert und schließlich die verschiedenen differenzierten neuronalen Subtypen quantifiziert (Reynolds & Weiss, 1992). So könnte untersucht werden ob in Abwesenheit von *Uncx4.1* tatsächlich mehr glutamaterge als dopaminerge Neuronen entstehen.

3.5 Potentielle Rolle von *Uncx4.1* während der Gliogenese

Proneurale bHLH-Proteine im murinen Cortex begünstigen die Entwicklung zu einem neuronalen Zellschicksal, während sie gleichzeitig das gliogene Zellschicksal unterdrücken (Sauvageot & Stiles, 2002; Schuurmans & Guillemot, 2002). Neben *Ngn1* und *Mash1* ist auch das Protein *Ngn2* an der Unterdrückung des gliogenen Zellschicksals beteiligt (Nieto et al., 2001). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass in Gehirnen von konditionalen *Cre-ER;Uncx4.1^{fl}* Mäusen eine starke Erhöhung des Astrozytenmarkers GFAP im ventralen Mittelhirn vorliegt. Demnach könnte der partielle Verlust der *Ngn2*-mRNA in *Uncx4.1*-defizienten Embryonen zu einer Förderung des gliogenen Zellschicksals und damit zu der Erhöhung von GFAP führen. Weiterführende molekulare Markeranalysen der *Uncx4.1* Mausmutanten könnten zur Klärung hinsichtlich dieser Fragestellung beitragen.

3.6 Potentielle Rolle von *Uncx4.1* bei der Bildung der Axone in den Colliculi superiores

Der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1* ist ein Homolog des *Unc-4* Proteins des Nematoden *C. elegans* (Rovescalli et al., 1996; Mansouri et al., 1997). *Unc-4*-defiziente Nematoden zeigen eine gestörte Verbindung der VA Motorneuronen. So innervieren die Interneuronen, welche

normalerweise ausschließlich die VB Motorneuronen innervieren, ebenfalls die VA Motorneuronen (Miller et al., 1992; White et al., 1992; Pflugrad et al., 1995), was in einer gestörten Rückwärtsbewegung, der sogenannten „Unc-Bewegung“ resultiert. Spätere Studien konnten zeigen, dass *Unc4* zusammen mit einem Co-Repressor *Unc-37*, *ceh-12* (ein Mitglied der HB9 Familie der Homöoproteine) reprimiert und somit an der korrekten Spezifikation des Transmitterphänotyps beteiligt ist (Von Stetina et al., 2007). Aufgrund der Tatsache, dass das Fehlen von *Unc-4* in *C. elegans* axonale Defekte hervor ruft und sowohl die Expression von *Unc-4* als auch HB9 in den Vertebraten stark konserviert ist, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur korrekten Bildung und Positionierung der Axone im Mittelhirn durchgeführt.

Calbindin ist in verschiedenen Säugetieren in einigen Neuronen der Colliculi superiores detektierbar und steht scheinbar nicht immer in Abhängigkeit eines bestimmten Zelltyps, sondern in Zusammenhang mit der funktionellen Organisation dieser Gehirnstruktur (Behan et al., 1992; Lanea et al., 1997; Gonzalez-Soriano et al., 2000). Bereits an E13.5 deutet eine veränderte Calbindin Proteinexpression auf coronalen Gewebeschnitten *Uncx4.1*-defizienter Embryonen auf axonale Defekte der Colliculi superiores hin. So konnte gezeigt werden, dass die normalerweise getrennten Expressionsdomänen von Calbindin im dorsalen Mittelhirn von *Uncx4.1*^{-/-} Mausembryonen ineinander übergehen und die beiden Domänen nicht mehr klar voneinander abgrenzbar sind. Auch auf sagittalen Gewebeschnitten sind an E17.5 Unterschiede zu verzeichnen. So kann im dorsalen Teil der Colliculi superiores eine erhöhte Menge an Calbindin im Vergleich zu den Kontrolltieren ausgemacht werden, während die Menge in dem ventralen Bereich der Colliculi superiores verringert ist.

Synapsine gehören zu den Phosphoproteinen. Vergangene Studien haben gezeigt, dass beide Proteine eine Rolle in der Regulation der Axogenese spielen und an der axonalen Entwicklung beteiligt sind (Chin et al., 1995; Ferreira et al., 1998). Synapsin I+II sind normalerweise in den Nervenenden der Axone lokalisiert (Camilli et al., 1983; Greengard et al., 1993). In *Uncx4.1*-defizienten Mäusen sind Synapsin I+II nicht mehr auf der ganzen dorso-ventralen Achse der Colliculi superiores exprimiert, sondern akkumulieren in diesem Bereich. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung sind die Ergebnisse der DiI-Färbung ausgefallen. In Abwesenheit von *Uncx4.1* sind weniger lateral verlaufende Axone detektierbar, als in Kontrolltieren. Zusätzlich dazu scheinen die vorhandenen Axone kürzer zu sein, als es normalerweise der Fall wäre.

Die Signifikanz dieser Beobachtung erfordert jedoch zusätzliche Versuche, da nur je drei Gehirne pro Genotyp untersucht werden konnten und diese Methode aufgrund mehrerer

Variablen schwer reproduzierbar ist.

Die verkürzten Axone und die geringere Anzahl an axonalen Auswüchsen pro Neuron zeigt sich auch bei der angewandten Golgi-Färbung. Beachtet werden muss natürlich, dass bei der Golgi-Methode, wie bereits an anderer Stelle erwähnt, nur ca. zehn Prozent aller Neuronen angefärbt werden. Damit ist nicht gewährleistet, dass immer die gleichen Neuronentypen angefärbt wurden. Einen generellen Überblick gibt diese Färbung dennoch und unterstützt die Annahme, dass *Uncx4.1*-defiziente Mausembryonen axonale Defekte der Colliculi superiores aufweisen. Dies stimmt auch mit früheren Studien im Vorderhirn überein, in denen gezeigt wurde, dass *Uncx4.1* ebenfalls an der korrekten axonalen Projektion magnozellularer Neuronen zu posterioren Bereichen der Hypophyse beteiligt ist (Asbruek et al., 2006). Daneben konnten weitere Studien die Beteiligung von Homöoboxgenen an der axonalen Wegfindung (engl. „*axonal pathfinding*“) zeigen (Kania et al., 2000).

Die Western Blot-Analyse der vesikulären und nicht-vesikulären Proteine zeigte in *Uncx4.1*-defizienten Mausembryonen keine Veränderung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dies kann mehrere Gründe haben. 1. Die Unterschiede betragen weniger als 20 % und können somit mittels Westerblot-Analyse nicht detektiert werden, oder 2. es gibt keinen Unterschied in der Proteingesamtmenge. Für die zweite Möglichkeit sprechen die Ergebnisse der Synapsin I+II Färbung. In diesem Fall scheint, wie bereits weiter oben erwähnt, das Protein in einem Bereich zu akkumulieren, was somit zwar axonale Defekte nach sich ziehen könnte, aber kein Unterschied in der Gesamtproteinmenge detektierbar wäre. Auch muss bei der Auswertung der Westernblot-Analyse mit in Betracht gezogen werden, dass zum Vergleich von *Uncx4.1*^{-/-} und Wildtypen Proteinextrakte ganzer Gehirne verwendet wurden und somit geringe Unterschiede in einem kleinen Bereich, wie dem dorsalen Mittelhirn, unterrepräsentiert wären. Die unveränderte Expression vesikulärer Proteine steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der *Unc-4*-Mutanten in *C. elegans*, denn dort konnte gezeigt werden, dass vesikuläre Proteine, wie z.B. Synaptogamin und Synaptobrevin reduziert sind, während nicht vesikuläre Proteine unbeeinträchtigt sind (Lickteig et al., 2001).

Zusammengenommen zeigen die verkürzten Axone und geringeren axonalen Auswüchse, sowie die Unterschiede in der Calbindin und Synapsin I+II Färbung der Colliculi superiores deutlich, dass *Uncx4.1* eine Rolle während der axonalen Entwicklung zukommt. Welche Funktion *Uncx4.1* hierbei genau übernimmt konnte nicht geklärt werden. Es ist aber zu vermuten, dass *Uncx4.1*, wie sein Homolog *Unc-4*, mit einem Co-Repressor agiert. Der Verlust

der *Ngn2* Expression im dorsalen Mittelhirn *Uncx4.1*-defizienter Mäuse könnte ebenfalls für den axonalen Phänotyp in diesen Mausmutanten verantwortlich sein. Im Thalamus konnte, anhand der Analyse *Ngn2*-defizienter Mäuse, gezeigt werden, dass *Ngn2* an der Spezifikation axonaler Projektionen in diesem Gehirnareal von Bedeutung ist und *Ngn2* somit eine Rolle während der axonalen Entwicklung spielt (Seibt et al., 2003).

4 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor *Uncx4.1* ist bereits früh im Mesencephalon muriner Embryonen detektierbar, dennoch wurde bisher keine funktionelle Analyse von *Uncx4.1* im Mittelhirn durchgeführt. Die vorliegende Arbeit beinhaltet die ersten Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsfaktors *Uncx4.1* im Mittelhirn der Maus. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. *Uncx4.1* ist nahezu ausschließlich in postmitotischen Neuronen des Mittelhirns exprimiert. Eine vergleichende Expressionsanalyse mit verschiedenen Markern dopaminerger, GABAerger und glutamaterger Neuronen zeigte deutlich, dass die Expression nicht auf ein neuronales Schicksal begrenzt ist, sondern *Uncx4.1* in nahezu allen Neuronenpopulationen detektierbar ist. Die Expression von *Uncx4.1* in der Übergangszone der mitotischen und postmitotischen Neuronen deutet auf eine Rolle von *Uncx4.1* während der neuronalen Differenzierung hin.

2. Neben der Expressionsstudie wurden die dopaminergen, GABAergen und glutamatergen Neuronenpopulationen des Mittelhirns mit Hilfe einer globalen und einer konditionalen Knock-outlinie untersucht:

- *Uncx4.1* konnte als neuer Faktor des regulatorischen Netzwerkes zur Bildung dopaminerger Neuronen im ventralen Mittelhirn identifiziert werden. Bei einem Verlust von *Uncx4.1* ist die Anzahl dopaminerger Neuronen der VTA und SN reduziert. Die Expression von *Uncx4.1* in postmitotischen Zellen und die vollständige Co-Detektion von TH und *Uncx4.1* im embryonalen Mittelhirn an E11.5 lässt vermuten, dass *Uncx4.1* eine Rolle während der Differenzierung der mDA Neuronen zukommt. Dabei übt *Uncx4.1* seinen Einfluss höchstwahrscheinlich über die Regulation des proneuralen Gens *Ngn2* aus. Die Ergebnisse der konditionalen Knockoutlinie zeigen, dass *Uncx4.1* möglicherweise eine Funktion während der Migration der dopaminergen Neuronen zukommt, da die Mutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren einen größeren Abstand der VTA und SN aufweisen. Des Weiteren konnte in *Cre-ER;Uncx4.1^{fl/fl}* Mäusen festgestellt werden, dass weniger mDA Neuronen in der lateralen SN detektierbar sind, während die Gesamtzellzahl unbeeinflusst bleibt.

- Das Schicksal GABAerger Neuronen im Mittelhirn scheint hingegen unbeeinflusst von *Uncx4.1* zu sein, da die Analyse der GABAergen Marker keine Unterschiede im Vergleich von *Uncx4.1*^{-/-}- und Kontrollembryonen aufweist.
- In glutamatergen Neuronen des Mittelhirns kommt *Uncx4.1* ebenfalls eine Funktion während der Differenzierung zu. So zeigen molekulare Markerstudien, dass bei einem Funktionsverlust von *Uncx4.1* eine stärkere mRNA Expression einiger Marker des Nucleus ruber detektiert werden kann. Aufgrund der Lokalisation dieser Neuronen neben den mDA Neuronen (an E11.5) ist es möglich, dass die mDA Neuronen ein glutamaterges Zellschicksal annehmen. So ist, neben einer erhöhten Expression von Markern des Nucleus ruber, ab E13.5 auch eine erhöhte Anzahl glutamaterger Pax6-positiver Zellen zu verzeichnen. Interessanterweise jedoch ist die Expression von *Ngn2* im dorsalen Mittelhirn drastisch reduziert.

Im Allgemeinen ist festzuhalten, dass *Uncx4.1* eine generelle Funktion während der neuronalen Differenzierung zukommt. Über welche molekularen Signalwege *Uncx4.1* im einzelnen genau agiert, bleibt allerdings Gegenstand weiterführender Studien und konnte nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass *Uncx4.1* als eine Art postmitotisches Selektorgen fungiert und der Verlust der dopaminergen Neuronen im ventralen Mittelhirn durch eine Akkumulation glutamaterger Neuronen kompensiert wird. Somit könnte *Uncx4.1* das glutamaterge Zellschicksal zu Gunsten des dopaminergen Zellschicksals unterdrücken.

3. Neben der Funktion von *Uncx4.1* während der Differenzierung neuronaler Subgruppen konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass *Uncx4.1* an der Entwicklung der Axone der Colliculi superiores beteiligt ist. So sind die Axone dieser Region verkürzt und es sind weniger laterale Auswüchse detektierbar. Neben den morphologischen Unterschieden konnten auch Unterschiede in der Expression verschiedener Marker nachgewiesen werden. Es wäre möglich, dass der axonale Phänotyp nur eine Konsequenz des Verlustes der *Ngn2*-mRNA in diesem Bereich ist.

5 Material und Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Extraktion genomischer DNA aus Gewebeproben

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Mausgewebe wurde die Gewebeprobe zunächst in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 500 μ l Lysispuffer (Zusammensetzung siehe Tab. 4), sowie 25 μ l Proteinase K (10 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 und 1,5 M Kalziumacetat) zugegeben. Anschließend wurde das Gewebe je nach Gewebemenge bei 55 °C für 5 bis 24 Stunden in einem Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Um nicht lysierte Gewebereste zu entfernen folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden 500 μ l Isopropanol zugegeben, bevor eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten bei 13.000 rpm folgte. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1000 μ l 70%igem Ethanol gewaschen, ehe ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 13.000 rpm) folgte. Anschließend wurde das Pellet 7 Minuten bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und in 70-100 μ l autoklaviertem dH₂O bei 37 °C gelöst.

Chemikalie	Konzentration
Tris-HCl pH 8,0	100 mM
EDTA 0,5 M	5 mM
SDS 10 %	0,2 %
NaCl 5 M	200 mM

Tab. 4: Zusammensetzung des Lysispuffers für den Verdau muriner Gewebeproben.

5.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden je nach gewünschter DNA-Menge entweder 5 ml oder 200 ml LB-Medium (Tab. 5) mit dem Bakterienstamm angeimpft. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden, je nach Resistenz des Plasmides, Antibiotika mit einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zugegeben. Als Antibiotika wurden üblicherweise Ampicillin oder Kanamycin verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 200 rpm. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA, wie vom Hersteller beschrieben, aufgereinigt. Für kleine DNA-Mengen

wurde das QIAprep[®] Miniprep Kit und für größere DNA-Mengen das QIAfilter[®] Plasmid Maxi Kit (beides QIAGEN) verwendet. Die Aufnahme des Pellets erfolgte entweder in TE-Puffer (pH 8,5, Tab. 6) oder in dH₂O.

Chemikalie	Menge
Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10g
NaOH 1 M	7,5 ml

Tab. 5: Zusammensetzung des LB-Mediums Zusammensetzung des LB-Mediums. Nach Zugabe aller Komponenten wurde mit dH₂O auf einen Liter aufgefüllt.

Chemikalie	Menge
Tris-HCl pH 8,5 1 M	1 ml
EDTA 0,5 M	0,2 ml
dH ₂ O	98,8 ml

Tab. 6: Zusammensetzung des TE-Puffers Der pH Wert des eingesetzten Tris-HCl variiert je nach gewünschtem pH Wert des Puffers. Nach Zugabe aller Komponenten, wurde der pH-Wert gemessen und ggf. mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf den gewünschten Wert eingestellt.

5.1.3 Ethanolpräzipitation von DNA

Zur Konzentrierung der DNA wurde eine Ethanolpräzipitation durchgeführt. Hierzu wurde der Volumenanteil der DNA, sofern die DNA in Wasser gelöst vorlag, mit dem gleichen Volumenanteil TE-Puffer (pH 8,0, Tab. 6) versetzt. Lag die DNA bereits in TE-Puffer vor, wurde direkt das doppelte Volumen verwendet und 3 M Natriumacetat mit einer Endkonzentration von 10 % zugefügt. Nach kurzer Fällung in flüssigem Stickstoff folgte ein Zentrifugationsschritt bei 0 °C und 12.000 g für 10 Minuten. Anschließend wurde das Pellet 2 mal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Pellet für ca. 8 Minuten getrocknet, ehe es in 50 µl Wasser oder TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und eine Stunde bei 37 °C gelöst wurde.

5.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Reinigung der DNA von Proteinrückständen, Enzymen etc. wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der DNA ein Volumenanteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) zugesetzt und für 2 Minuten gevortext. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 Minuten wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) zugegeben, ebenfalls gevortext und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 1/25 Volumen 7 M Ammoniumacetat und einem 2,5 fachen

Volumen eisgekühltem 100%igem Ethanol versetzt. Nach der Fällung in flüssigem Stickstoff wurde für 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zwei mal mit 70%igem Ethanol gewaschen, ehe es für 7 Minuten bei RT getrocknet wurde. Je nach DNA Menge wurde das Pellet in 10-100 μl autoklaviertem dH_2O aufgenommen.

5.1.5 Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wurde ein Nanodrop[®] ND-1000 Spektrophotometer (PeQlab) verwendet und die optische Dichte (OD) bei 280 nm und 260 nm gemessen. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde der Quotient aus der OD bei 260 nm und 280 nm gebildet. Die DNA wurde nur weiter verwendet, wenn der Wert des Quotienten zwischen 1,7 und 2,1 lag.

5.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es spezifische DNA-Fragmente mit Hilfe spezifischer Primer zu amplifizieren. Als DNA-Templates wurden DNA Präparate aus murinem Gewebe, sowie Plasmid-DNA verwendet. Für die Genotypisierung der transgenen und Knockout-Mäuse wurde die GoTag[®] Polymerase von Promega verwendet. Für Klonierungen wurde entweder die Pwo Polymerase von Roche oder ebenfalls die GoTag[®] Polymerase verwendet. Der Vorteil der Pwo Polymerase gegenüber der Taq Polymerase beruht darin, dass sie eine Korrekturlesefunktion und daher eine geringere Fehlerrate bei der Synthese hat. Die Polymerasen wurden den Angaben der Hersteller entsprechend verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 7 aufgelistet, die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 zu finden.

Lösung	Menge für 50 μl
autoklaviertes dH_2O	37,85 μl
5x PCR Puffer, GoTaq (Promega)	10 μl
20 mM dNTP Nukleotid-Mix (Genecraft)	0,75 μl
Senseprimer	0,1 μl
Antisenseprimer	0,1 μl
5U DNA-Polymerase	0,2 μl
DNA-Template	1 μl

Tab. 7: Zusammensetzung eines 50 μl umfassenden PCR-Ansatzes. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. U: Einheit (engl. „Unit“)

Die Primer für die Genotypisierung der *Lmx1a* Mäuse wurden alle drei gemeinsam in einem Ansatz verwendet. Die Menge des dritten Primers betrug ebenfalls 0,1 μ l. Für die Genotypisierung der *Ngn2* Mäuse wurden bei der Primerkombination Ngn2 (WT1) und Ngn2 (WT2) noch 1,7 μ l DMSO zugesetzt. Die zugesetzten Mengen wurden von der Menge an autoklaviertem dH₂O abgezogen.

Primer	Sense/Antisense	Sequenz
Genotypisierung Uncx4.1 (WT1) Uncx4.1(WT2) Uncx4.1(Mut)	sense antisense antisense	GTGGCCGCGAAAGCCAGCCC GACTCGACCAGGTCCAGGCGC CCTCCAGTACAGCGCGGCTGA
Ngn2 (WT1) Ngn2 (WT2) Ngn2 (Mut)	sense antisense antisense	GGACATTCCCGGACACACAC GCATCACCTTCACCCTCTCC AGATGTAATTGTGGCGAAG
Lmx1a (WT1) Lmx1a (WT2) Lmx1a (Mut)	sense antisense antisense	TGGACACTGCTTCGTCCTG CGAAGAGGGTGCTGTCTGG CTTGATGTTGCCGCGTCCT
Uncx4.1 floxed (WT1) Uncx4.1 floxed (WT2) Uncx4.1 floxed (Mut)	sense antisense antisense	TAGAAGCGAGGCCCGATTGTAGT CAGAAGGAAGCCTGATCATCACAAC AATTAGCAGAAGGCCAGTGTG
Neo1 Neo2	sense antisense	CAGCTGTGCTCGACGTTGTCCTG CCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCG
Cre1 Cre2	sense antisense	CGATGCAACGAGTGATGAGGTTCCG AGCATTGCTGCTACTTGGTCGTGG
Klonierung Ngn2-NotI Ngn2-BamHI	sense antisense	CAAAGAATCTGCGGCCGCATGTTTCGTCAAATCTGAGACTCTG GTTACGGGATCCCTAGATACAGTCCCTGGCGAGGGGCGAG

Tab. 8: Verwendete Primersequenzen.

Alle PCR- Reaktionen wurden mit einem Mastercycler[®] Gradient (Eppendorff) mit einem Standardprogramm durchgeführt (Tab. 9). Die Annealingtemperatur wurde je nach Schmelztemperatur der verwendeten Primer angepasst. Die Primer wurden entweder von Operon oder Sigma-Aldrich hergestellt.

Schritt-Nr.	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	94 °C	4 min
2	Denaturierung	94 °C	45 sek - 1 min
3	Annealing	55 °C-65°C	45 sek - 1 min
4	Elongation	72 °C	40 sek - 1 min
5	Abschließende Elongation	72 °C	6 - 10 min

Tab. 9: Verwendetes Standard-PCR Programm. Die Schritte 2 - 4 wurden 30 - 38 mal wiederholt ehe die abschließende Elongation folgte. Die Annealingtemperatur variierte je nach Schmelzpunkt der verwendeten Primer. Die Dauer der einzelnen Zyklen variierte ebenfalls je nach verwendetem Primerpaar.

5.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Genotypisierung, der Überprüfung des Restriktionsverdau, zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente oder zur Überprüfung der RNA Probensynthese wurden 0,8 - 1,2%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung wurde zunächst die gewünschte Menge Agarose (Roth) mit 0,5x TBE Puffer (Tab. 10) versetzt und erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde Ethidiumbromid mit einer finalen Konzentration von 0,3 $\mu\text{l/ml}$ zugegeben und das Gel bei 4 °C in einer Gelelektrophoresekammer polymerisiert. Die DNA- oder RNA-Probe wurde mit 6x Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol in dH₂O) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die DNA wurde allerdings nur mit Ladepuffer versetzt, wenn sie nicht aus einer Genotypisierungsreaktion hervorgegangen ist, denn für Genotypisierungen wurde der 5x Green GoTaq[®] Flexi Puffer (Promega) verwendet, welcher bereits einen Ladepuffer erhält. Zusätzlich zum 6x Ladepuffer wurden RNA-Proben noch mit TE-Puffer (pH 7,5) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 - 120 Volt in 0,5x TBE-Puffer. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 258 nm sichtbar gemacht.

Chemikalie	Konzentration 10x	Konzentration 0,5x
Tris-Base	890 mM	44,5 mM
Borat	890 mM	44,5 mM
EDTA (pH 8,0)	20 mM	1 mM

Tab. 10: 10x TBE-Puffer in dH₂O . Zur Herstellung des 0,5x TBE Puffers wurde der 10x TE Puffer mit dest. H₂O verdünnt.

5.1.8 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen (z.B. für Klonierungen) wurde die gewünschte Bande unter schwachem UV-Licht mittels eines Skalpell isoliert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des GeneClean[®] SpinKits (MPIbio) und wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.1.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Klonierung der amplifizierten PCR-Produkte war es wichtig das Produkt zunächst aufzureinigen um unspezifische Produkte, Reste von Primern etc. zu entfernen. Hierzu wurde das

GeneClean[®] SpinKit (MPIbio) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

5.1.10 Restriktionsverdau von DNA

Zur Linearisierung, Vorbereitung von Plasmid-Vektoren oder dem Verdau von PCR Fragmenten wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Enzyme wurden entweder über New England Biolabs, Roche oder Promega bezogen. Für den Verdau wurde der Reaktionsansatz mit einem finalen Volumen von 50 μ l/ml - 150 μ l/ml (je nach eingesetzter DNA-Menge) für 2 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Präparation der Plasmid-Vektoren für die Klonierung waren mehrere Restriktionsenzyme erforderlich. Sofern für beide Enzyme dieselben optimalen Bedingungen notwendig waren erfolgte ein gleichzeitiger Verdau mit beiden Enzymen. Waren die optimalen Bedingungen abweichend erfolgte ein sequenzieller Restriktionsverdau, wobei das Produkt zwischen beiden Verdaus mittels GeneClean[®] SpinKit (MPIbio) aufgereinigt wurde. Der Verdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Eine Liste der verwendeten Vektoren und Plasmide findet sich in Tabelle 11.

5.1.11 DNA-Ligation

Die Ligation zweier DNA-Fragmente erfolgte mittels der T4 Ligase von Promega nach Angaben des Herstellers. Es wurden 100 ng DNA-Fragment eingesetzt. Das Verhältnis zwischen eingesetztem DNA-Fragment und verwendetem Vektor betrug 3:1. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Anschließend erfolgte eine Transformation des Ligationsproduktes in *E.coli* DH5 α Zellen (Promega). Eine Liste der verwendeten Plasmide befindet sich in Tabelle 11.

Name	Vektor	eingefügtes DNA-Fragment	Verwendungszweck	Herkunft
Ngn2-FLag Ngn2-HA pCS2-Pax6-FLAG pCDNA3.Uncx4.1 myc	pFLAG-CMV TM -2 pCMV-HA pCS2+FLAG pCDNA3	Ngn2 Ngn2 Pax6-FLAG Uncx4.1-Myc	Proteinexpression Proteinexpression Proteinexpression Proteinexpression	diese Arbeit Dr. M.S. Diaconu Abteilungs-Stock Prof. A. Kispert
Hh16.1 Nkx6.1 Nkx2.2 Gad67 Δ HindIII Isl1 Pax6 Ngn2 Gata2 Sim1 H2-A4 Brn3a Uncx4.1 Pitx3 Lmx1a	pBlueskript II SK pBlueskript II SK pBlueskript II SK pT7T3 pGM-T easy pBlueskript II SK pGEM-3 pBlueskript II SK pBlueskript II SK pCRII-TOPO pBlueskript II SK	Shh Nkx6.1 Nkx2.2 Gad67 Isl1 Pax6 Ngn2 Gata2 Sim1 Helt Brn3a Uncx4.1 Pitx3 Lmx1a	ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH ISH	Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Abteilungs-Stock Prof. M. Zenke Abteilungs-Stock Prof. J. Guimera Prof. A. Simeone Abteilungs-Stock Prof. A. Simeone Prof. P. Burbach

Tab. 11: Liste der verwendeten Plasmide. Sofern bekannt, wurde der Vektor, in dem die DNA eingebracht wurde, mit angegeben.

5.1.12 Sequenzierungen

Zur Kontrolle der DNA Sequenzen nach den oben beschriebenen Schritten wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurde das Taq Dye Deoxy Terminator Kit (Perkin Elmer) und des ABI Prism 377 DNA Sequenziergerät (Applied Biosystems) verwendet. Die Sequenzierungen wurden von Sigurt Hille aus der Abteilung Molekulare Zellbiologie (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt.

5.1.13 Herstellung kalzium-kompetenter Zellen

Zur Herstellung kalzium-kompetenter Zellen wurde eine Kolonie von *E.coli DH5 α* oder 50 μ l bereits vorhandener kompetenter Zellen über Nacht in 2x 5 ml LB Medium ohne Antibiotika (Tab. 5) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2x 50 ml LB Medium mit 2,5 ml der Vorkultur angeimpft und für ca. zwei Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 2000 rpm für zehn Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 25 ml eisgekühltem Kalziumchlorid (50 mM CaCl₂) resuspendiert und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und eine erneute Resuspension des Pellets mit 3 ml eisgekühltem Kalziumchlorid. Schließlich erfolgte die Zugabe von 10 % Glycerol und es wurden 100 μ l Aliquote bei -80 °C eingefroren.

5.1.14 Transformation von DNA in kalzium-kompetente Zellen

Zur Transformation wurden zunächst 100 μl Zellen auf Eis aufgetaut und 2 μl des Ligationsansatzes oder der Plasmid-DNA zugefügt. Zur Ligation wurde das Reaktionsgemisch zunächst für 20 Minuten auf Eis inkubiert, ehe es für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad erwärmt wurde. Folgend wurden die Zellen für zwei Minuten auf Eis gestellt und anschließend mit 900 μl LB-Medium ohne Antibiotika versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert, bevor je 100 μl , 200 μl und 500 μl der Suspension mittels eines sterilen Drigalsgispatels auf LB-Agarplatten (je nach Resistenz des Plasmides mit geeignetem Antibiotikum versetzt) ausgestrichen und der Rest des Ansatzes verworfen wurde. Zur Kultivierung der Bakterien wurden die Agarplatten über Nacht bei 4 °C inkubiert.

5.1.15 Herstellung von Glycerolstocks

Zur Lagerung der transformierten Bakterien wurden 500 μl einer frischen Bakterienkultur mit 10 % Glycerol versetzt und für eine Minute in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurde der Stock bei -80 °C gelagert.

5.1.16 Aufreinigung von total RNA aus Hefe

Für die *in situ* Hybridisierung (ISH) war es notwendig die benötigte total RNA aus der Hefe zunächst aufzureinigen, was der Reduzierung des Hintergrundes bei der ISH diente. Hierfür wurden 4x 250 mg total RNA (engl. „total RNA from yeast“, Roche) abgewogen und je in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und unter Zugabe von 25 ml TE-Puffer (pH 7,5, Tab. 6) bei 60 °C im Wasserbad gelöst. Da die RNA nur schwer löslich war wurde mehrmals für fünf Minuten gevortext. Anschließend wurde je ein Volumenanteil Phenol pH 4,5 (Amresco) zugegeben und für 30 Minuten gevortext, ehe eine 30 minütige Inkubation auf einem Rollschüttler erfolgte. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei RT und 3500 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase verworfen. Die Vorgänge des Vortexens, Schüttelns und Zentrifugierens wurden insgesamt 3x wiederholt. Am Schluss wurde zu der wässrigen Phase je 1 ml 5 M NaCl zugegeben und der Reaktionsansatz gut vermischt. Anschließend erfolgten drei Extraktionsschritte. Hierzu wurde der Reaktionsansatz zunächst mit

einem Volumenanteil Chloroform versetzt und ebenfalls für 30 Minuten gevortext, ehe eine Inkubation auf einem Rollschüttler für 30 Minuten erfolgte. Nach anschließender Zentrifugation, bei 3500 rpm für 15 Minuten, wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach dreimaliger Wiederholung wurden der wässrigen Phase 2,5 Volumenanteile eisgekühltem Ethanol zugefügt und das Gemisch über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Am nächsten Morgen erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet für einige Minuten getrocknet, ehe es in je 5 ml TE-Puffer pH 7,5 gelöst wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte, wie in Kapitel 5.1.5 beschrieben.

5.1.17 Herstellung DIG und Fluorescein markierter Proben

Für die *in situ* Hybridisierung war es zunächst notwendig entsprechend markierte anti-sense RNA-Sonden herzustellen. Solche Marker sind u.a. Digoxigenin-11-UTP (DIG) und Fluorescein-12-dUTP (Fluorescein), die später mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können. Für die Herstellung DIG und Fluorescein markierter RNA wurde der in Tabelle 12 beschriebene Synthesansatz pipettiert und für 37 °C bei 2 - 4 Stunden inkubiert. Falls die SP6 RNA-Polymerase verwendet wurde, erfolgte die Inkubation bei 40 °C. Im Anschluss an die Inkubation wurde die DNA mittels DNase (1U/ μ l, Promega) verdaut. Zur Kontrolle der Transkription und des DNA Verdau wurde 1 μ l des Reaktionsansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen ehe die RNA gefällt wurde (2 μ l 0,2 M EDTA, 2,5 μ l 4 M LiCl, 75 μ l 100 % EtOH). Die Fällung erfolgte für eine Minute in flüssigem Stickstoff. Zur Aufreinigung der Probe wurde der Reaktionsansatz zunächst bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet mit 100 μ l 100%igem Ethanol gewaschen, ehe eine erneute Zentrifugation erfolgte. Nach Trocknung des Pellets wurde die RNA in 100 μ l DEPC-H₂O 10 Minuten bei 65 °C gelöst. Die Probe wurde bei -20 °C gelagert.

Reagenz	Menge
autoklaviertes dH ₂ O	13,5 μ l
10x Transkriptionspuffer (Roche)	2 μ l
DIG oder Fluorescein markierter Nucleotid Mix (Roche)	2 μ l
DNA-Template (liniarisierte Plasmid-DNA)	ca. 2 μ g
RNAasin (Promega)	1 μ l
RNA Polymerase (T7, T3 oder SP6)	1 μ l

Tab. 12: Ansatz zur Herstellung DIG- oder Fluorescein-markierter RNA.

5.2 Tierexperimentelle Methoden

5.2.1 Tiere

Alle verwendeten Mauslinien wurden auf einen C57/BL6 Hintergrund gekreuzt und auf diesem erhalten. Wildtyp C57/BL6 Mäuse wurden von Charles River bezogen. Einzig die verwendete *Foxa2*-Cre Linie wurde auf einem gemischten Hintergrund (C57/BL6 gekreuzt mit CD1) gehalten. Als Ammen wurden Weibchen aus dem Auszuchtstamm CD1 verwendet, die ebenfalls von Charles River bezogen wurden. Die Behandlung der Tiere erfolgte entsprechend der Regulationen des Regierungsbezirks Braunschweig. Eine Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien findet sich in Tabelle 13.

Name	Beschreibung	Referenz
CD1	Wildtypiere des CD1 Auszuchtstammes	Charles River
C57/BL6	Wildtypiere des C57/BL6 Inzuchtstammes	Charles river
U6	globaler <i>Uncx4.1</i> -Knockout	(Mansouri et al., 2000)
<i>Uncx4.1^{fl/fl}</i>	konditionaler <i>Uncx4.1</i> -Knockout	(Leitges et al., 2000)
<i>Foxa2</i> -Cre	Induzierbare Cre Linie unter dem Promotor von <i>Foxa2</i>	(Park et al., 2008)
Cre-ER	Induzierbare Cre Linie. Cre ist ubiquitär exprimiert.	(Hayashi & McMahon, 2002)
Cmv-Cre	nicht induzierbare Cre-Linie. Cre ist ubiquitär exprimiert.	(Schwenk et al., 1995)
Ngn2-KiGFP	globaler <i>Ngn2</i> -Knockout	(Seibt et al., 2003)
<i>Lmx1a</i> -ko	globaler <i>Lmx1a</i> -Knockout	(Griesel et al., 2011)
<i>Pax6</i>	globaler <i>Pax6</i> -Knockout	(St-Onge et al., 1997)

Tab. 13: Liste der verwendeten Mauslinien.

Als Kontrolltiere für die Analyse des globalen *Uncx4.1*-Knockouts wurden entweder WT oder für *Uncx4.1* heterozygote Embryonen verwendet, da diese Tiere keinen Phänotyp zeigen. Wenn WT und heterozygote Tiere als Kontrollen verwendet wurden, dann ist der Phänotyp folgendermaßen angegeben: *Uncx4.1^{+/?}*.

5.2.2 Generierung konditionaler *Uncx4.1* Mausmutanten

Für die konditionale Inaktivierung von *Uncx4.1* wurden zunächst der globale *Uncx4.1*-Knockout mit der gewünschten Cre-Linie verpaart um *Uncx4.1* heterozygote Tiere zu generieren, welche ebenfalls Cre positiv sind. Anschließend wurden diese Tiere mit der konditionalen *Uncx4.1^{fl/fl}* Linie verpaart. Eine Übersicht über die Verpaarung findet sich in Abb. 41. Bei der Verwendung einer induzierbaren Cre-Linie wurde den Tieren zum gewünschten Zeitpunkt der

Inaktivierung Tamoxifen verabreicht. Da die Mütter meistens nicht in der Lage waren die Jungen nach Verabreichung des Tamoxifens zu gebären, wurden die Embryonen zwischen E17.5 und E20 (je nach Kondition der Mutter) entnommen und zu CD1-Ammen gesetzt.

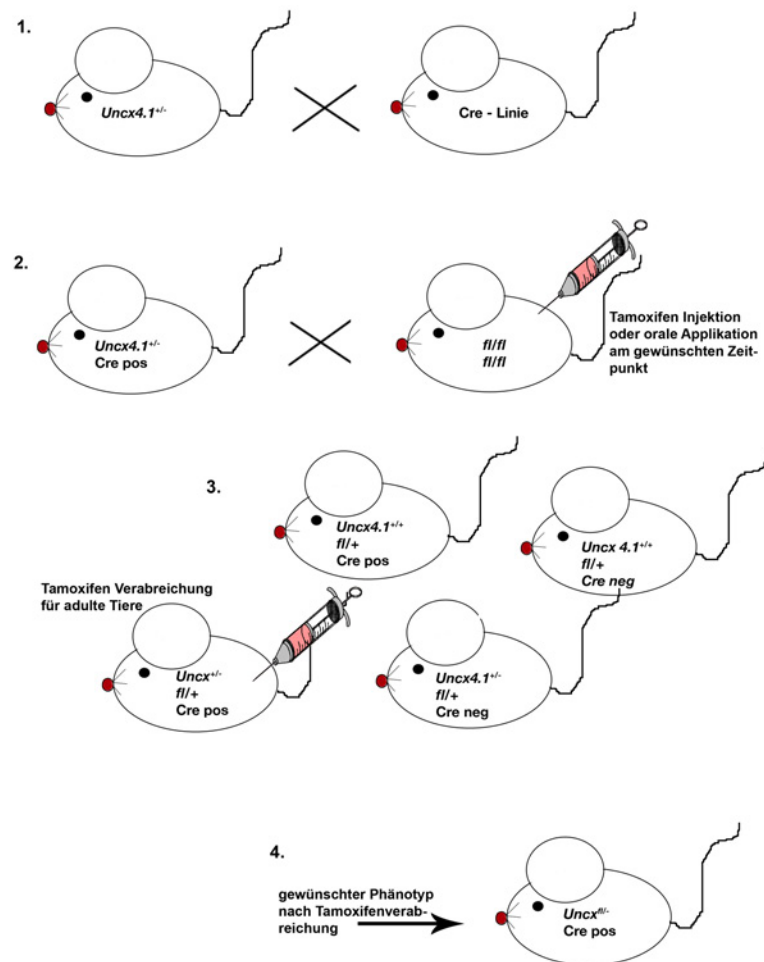


Abb. 41: Verpaarungs-Strategie konditionaler *Uncx4.1* Mausmutanten. (1.) Zunächst wurden heterozygote Tiere des konservativen Knockouts mit Tieren der gewünschten Cre-Linie verpaart. (2.) Die Cre positiven und *Uncx4.1* heterozygoten Tiere wurden anschließend mit geflochtenen Tieren des konditionalen Knockouts verpaart. (2.) und (3.) Tamoxifen wurde entweder den tragenden Müttern appliziert (2.) oder den Cre-positiven Nachkommen (3.), die ein gefloxtes *Uncx4.1*-Allel und ein knockout Allel besaßen. (4.) Zeigt den gewünschten Phänotyp nach der Tamoxifenverabreichung.

5.2.3 Tamoxifenverabreichung

Zunächst wurden 20 mg Tamoxifen (Sigma) in 1 ml Keimöl (Sigma) bei 37 °C unter Ausschluss von Licht bei leichtem Schütteln auf einem Thermoblock gelöst. Das Tamoxifen wurde bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Induktion von Cre wurde entweder den tragenden oder den

drei Wochen alten Tieren das auf 37 °C vorgewärmte Tamoxifen verabreicht. Die Verabreichung erfolgte entweder mit Hilfe einer Spritze intraperitoneal oder oral mittels einer Magensonde. Die Menge des verabreichten Tamoxifens betrug 0,5 mg oder 1 mg pro 10 g Körpergewicht der Maus. Eine Übersicht über die Zeitpunkte der Tamoxifenverabreichung und Analyse der Tiere findet sich in Abbildung 42.

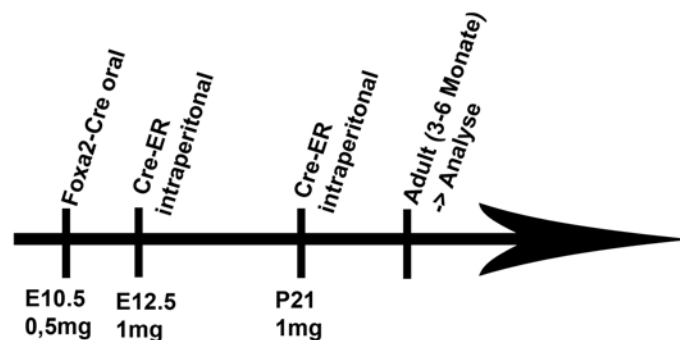


Abb. 42: Zeitliche Übersicht der Tamoxifenverabreichung. Die Verabreichung von Tamoxifen bei Tieren, die mit der Foxa2-Cre Linie gekreuzt wurden erfolgte durch orale Applikation an Tag E10.5. Es wurde eine Menge von 0.5 mg Tamoxifen pro 10 g Körpergewicht der Maus verabreicht. Tieren die mit der Cre-ER Linie gekreuzt worden sind, wurde das Tamoxifen intraperitoneal an Tag E12.5 oder P21 gespritzt. Hierbei wurde eine Menge von 1 mg Tamoxifen pro 10 g Körpergewicht verabreicht. Die Analyse der Tiere erfolgte drei oder sechs Monate nach der Geburt.

5.2.4 BrdU-Injektion

Für Proliferationsstudien wurde das chemische Thymidinanalogon BrdU (5'-Brom-2'-desoxyuridin) injiziert. Liegt BrdU vor, kann dieses anstelle von Thymidin während der DNA-Synthese in den neuen Strang inkorporiert werden und somit als Markierung proliferierender Zellen verwendet werden. Der BrdU-Nachweis erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Zur Herstellung einer BrdU-Lösung wurden zunächst 0,028 gr BrdU (Roche) in 1714 μ l 1x PBS (Zusammensetzung Tab. 15) bei 37 °C unter leichtem Schütteln gelöst. Von dieser Lösung wurden den tragenden Müttern zum gewünschten Zeitpunkt je 100 μ l pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Das gelöste BrdU wurde bis zu drei Monaten bei -20 °C gelagert.

5.3 Histologische Methoden

5.3.1 Präparation von Embryonen und adulten Gehirnen

Für die Analyse von Embryonalstadien wurde der Tag des Vaginalplugs als embryonaler Tag 0.5 angenommen (E0.5). War das gewünschte Embryonalstadium erreicht, wurden die trächtigen Mütter mittels zervikaler Dislokation getötet und die Embryonen entnommen. Die Körper, Köpfe oder Gehirne wurden heraus präpariert und entweder in das gewünschte Medium eingebettet oder für die DiI Färbung verwendet. Für die Vorbereitung von adulten Gehirnen wurden die Tiere zunächst ebenfalls mittels zervikaler Dislokation getötet, ehe das Gehirn heraus präpariert wurde.

5.3.2 Einbetten in Kryomatrix

Nach der Präparation des Gewebes wurde dies zunächst kurz in 1x PBS (Tab. 15) gewaschen ehe es in 4%igem PFA (Paraformaldehyd, Fluka) fixiert wurde. Die Dauer der Fixierung war abhängig von der Größe des zu fixierenden Gewebes (Tab. 14).

Stadium	Art des Gewebes	Dauer der PFA-Fixierung
E10.5	Kopf	45 Minuten
E11.5	Kopf	1 Stunde
E12.5	Kopf	2 Stunden
E13.5	Kopf	2,5 Stunden
E14.5	Kopf	3 Stunden
E16.5	Kopf	4 Stunden
E16.5	Gehirn	1,5 Stunden
E17.5	Kopf	5 Stunden
E17.5	Gehirn	2 Stunden
P0	Gehirn	6 Stunden
Adult	Gehirn	über Nacht

Tab. 14: Dauer der PFA-Fixierung von Gewebe für das Einbetten in Kryomatrix. Die Gewebe wurden in 4 % PFA fixiert.

Im Anschluss an die Fixierung, erfolgte dreimaliges Waschen in 1x PBS für 20 Minuten, ehe das Gewebe für 30 Minuten in eine 15 %ige Sucroselösung (in 1x PBS) überführt wurde. Anschließend wurde es in eine 30%ige Sucroselösung (in PBS) gegeben, wo es verblieb bis das Gewebe vollständig abgesunken war. Dieser Vorgang dauerte unter Umständen bis zu 20 Stunden. Nachdem das Gewebe abgesunken war, wurde es für eine halbe Stunde in einen Mix aus 30 % Sucrose und Kryomatrix (Tissue Freezing Medium[®] Einbettmedium, Leica) überführt

bevor es für eine weitere halbe Stunde in reine Kryomatrix gegeben wurde. Alle Schritte erfolgten auf Eis unter leichtem Schütteln. Zum Schluss wurde das Gewebe auf Trockeneis in Kryomatrix eingebettet und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Chemikalie	Menge für 20x PBS
NaCl	160 g
KCl	4 g
Na ₂ HPO ₄	26,44 g
NaH ₂ PO ₄	1,95 g
KH ₂ PO ₄	4 g

Tab. 15: 20x PBS . Nach Zugabe aller Komponenten wurde mit dH₂O auf einen Liter aufgefüllt und die Lösung autoklaviert. Zur Herstellung 1x PBS wurde die 20x PBS Stocklösung mit dH₂O verdünnt.

5.3.3 Einbetten in Paraffin

Für eine Paraffineinbettung wurde das Gewebe wie in Tab. 16 beschrieben behandelt und anschließend mit Hilfe einer Einbettmaschine (Leica) eingebettet. Die Lagerung der Paraffinblöcke bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Reagenz	Dauer
4 % PFA	über Nacht
0,89 % Saline	20 Minuten
PBS	3x 20 Minuten
50 % Ethanol	2x 1 Stunde
70 % Ethanol	2x 1 Stunde
90 % Ethanol	2x 1 Stunde
95 % Ethanol	2x 1 Stunde
100 % Ethanol	2x 1 Stunde oder über Nacht
Isopropanol	über Nacht
Isopropanol/Toluol (75 %/25 %)	2x 1 Stunde
Isopropanol/Toluol (50 %/50 %)	2x 1 Stunde
Isopropanol/Toluol (25 %/75 %)	2x 1 Stunde
Toluol	über Nacht
Paraffin	3x 1 Tag

Tab. 16: Aufbereitung des Gewebes für die Paraffineinbettung.

5.3.4 Einbetten in 2% „Low Melting Point“ Agarose

Für die Einbettung des Gewebes in 2% „Low Melting Point“ Agarose (Thermo Scientific) wurde die Agarose zunächst in 0,5x TBE erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war und anschließend auf Eis gekühlt. Dann wurde das Gewebe auf Eis eingebettet.

5.3.5 Anfertigung von Gewebeschnitten

Mit Hilfe eines Kryotoms (Leica) wurden aus den in Kryomatrix eingebetteten Gewebelöcken 10 bzw. 18 μm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf je vier alternierende Adhäsions-Objektträger (Menzel-Gläser, Superfrost Ultra Plus[®]) aufgezogen und max. eine Stunde bei ca. 30 °C getrocknet, ehe sie bei -20 °C gelagert wurden. Die Paraffinblöcke wurden mittels eines Mikrotoms (Leica) ebenfalls in 10 oder 18 μm dicke Schnitte geschnitten und zur Glättung in ein ca. 40 °C warmes Wasserbad überführt, ehe sie alternierend aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet wurden. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei 4 °C. In Low Melting Point Agarose eingebettetes Gewebe wurde mittels eines Vibratoms (Leica) in 100 - 150 μm dicke Schnitte geschnitten. Die anschließend im Wasser freischwimmenden Präparate wurden dann auf Adhäsions-Objektträger aufgezogen und im Falle einer folgenden Golgi-Färbung eine Woche bei RT getrocknet.

5.3.6 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (IHC) auf Gewebeschnitten

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden entweder 10 μm dicke Paraffin- oder Kryoschnitte verwendet. Die Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert und mit einem hitzebeständigen Fettstift umrandet (ImmEdge Pen, Vector) ehe sie in einer absteigenden Ethanolreihe entwässert wurden. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Gewebeschnitte für eine Minute in einer auf Zitronensäure basierenden Demaskierungslösung (Vetrashield, Vector Laboratories) in einem Dampfkochtopf unter maximalem Druck gekocht. Anschließend wurden die Objektträger in dH₂O überführt, ehe sie 3 mal in 1x PBS gewaschen wurden. Um ein mögliches Hintergrundsignal zu vermeiden bzw. zu reduzieren wurden die Schnitte für 70 Minuten mit einer Blocklösung inkubiert. Die Blocklösung bestand aus 10 % Serum und 0,1 % Triton-X-100 in PBS. Bei dem verwendeten Serum handelte es sich je nach Antikörper entweder um FCS, NGS oder BSA. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte 16 - 72 Stunden bei 4 °C. Eine Liste der verwendeten Antikörper und Verdünnungen befindet sich in Tabelle 18. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte zunächst 3 mal für 7 Minuten mit 1x PBS gewaschen ehe ein Fluophor-gekoppelter sekundärer Antikörper (Tab. 18) appliziert und 70 Minuten bei RT inkubiert wurde. Nach Auswaschen des sekundären Antikörpers mit 1x PBS (3 mal 7 Minuten) wurden die Gewebeschnitte in Vectashield[®] Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Für die indirekte

Fluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten wurde das Protokoll ab der Überführung der Präparate in 1x PBS genauso durchgeführt wie für Paraffinpräparate (Tab. 17). Alle Fluoreszenzaufnahmen der Präparate wurden entweder mit einem BX-60 Fluoreszenzmikroskop (Olympus) und der Cell^P Software (Olympus) oder mit einem Konfokalen-Lasermikroskop (LSM 410 invert, Leica) gemacht. Die Bilder wurden anschließend mit Photoshop 10.0 (Adobe) übereinander gelegt, sowie Größe, Kontrast und Helligkeit angepasst. Konfokale Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ bearbeitet.

Schritt-Nr.	Reagenz	Dauer
1	Histoclear	3x 15 min
2	100 % Ethanol	2x 2 min
3	95 % Ethanol	3x 20 min
4	70 % Ethanol	2x 1 Stunde
5	50 % Ethanol	2x 1 Stunde
6	30 % Ethanol	2x 1 Stunde
7	dH ₂ O	2x 5 min
8	Kochen in Demaskierungslösung	1 min bei höchstem Druck
9	dH ₂ O	über Nacht 2x 5 min
10	1x PBS	3x 7 min
11	Blocklösung	70 min
12	primärer Antikörper in Blocklösung	16-72 Stunden
13	1x PBS	3x 7 min
14	sekundärer Antikörper in Blocklösung	70 min
15	1x PBS	3x 7min

Tab. 17: Übersicht über die Schritte der IHC. Die Färbung von Paraffinschnitten umfasste Schritt-Nr. 1-15, während die Färbung von Kryopräparaten die Schritte 10-15 umfasste. Nachdem das letzte mal in PBS gewaschen wurde (Schritt-Nr. 15), wurden die Präparate in Eindeckmedium mit DAPI eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

5.3.7 BrdU-Färbung

Zum Nachweis proliferierender Zellen in der S-Phase wurde BrdU verwendet (Präparation der Embryonen siehe Kap. 5.2.4). Für die Proliferationsanalyse wurden Embryonen des Embryonaltages 14.5 verwendet, in Kryomatrix eingebettet und Kryoschnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst 15 Minuten in 1x PBS gewaschen, ehe sie für 30 Minuten in 2 N HCl überführt und bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 2x 30 Minuten in 1x PBS gewaschen, ehe sie mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vector) umrandet wurden. Das Blocken erfolgte 60 Minuten bei 4 °C (10 % FCS, 0,01 % Tween-20 in 1x PBS). Der primäre Antikörper (Tab. 18) wurde appliziert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger 2x 15 Minuten in 1x PBS gewaschen und der

Antikörper	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung	Verwendungszweck	Serum
Primäre Antikörper					
anti-Uncx4.1	Kaninchen	Dr. S. Blanke	1:750	ICC & IHC, Kryo- und Paraffinschnitte	FCS oder BSA
anti-Pax6	Kaninchen	Covance	1:300	ICC & IHC, Kryo- und Paraffinschnitte	FCS
anti-Pax6	Maus	DSHB	1:200	IHC auf Kryoschnitten	FCS
anti-Calbindin	Kaninchen	Swant	1:200	IHC, Kryo- und Paraffinschnitten	FCS
anti-Calretinin	Kaninchen	Sigma		IHC, Kryo- und Paraffinschnitten	FCS
anti-DAT	Ratte	Santa Cruz	1:100	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Hnf3β	Ziege	Santa Cruz	1:150	IHC, Kryoschnitte	BSA
anti-Nkx6.1	Kaninchen	P.Serup	1:1000	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Nkx6.1	Maus	DSHB	1:100	IHC, Kryoschnitte	BSA
anti-Nestin	Kaninchen	Abcam	1:200	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Tuj	Maus	Covance	1:100	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Lhx1		DSHB	1:100	IHC, Kryoschnitte	BSA
anti-TH	Kaninchen	Sigma	1:300	IHC, Kryo- und Paraffinschnitte	FCS
anti-TH	Maus	Chemicon	1:8000	IHC, Kryo- und Paraffinschnitte	BSA und FCS
anti-Pitx3	Kaninchen	P. Burbach	1:700	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Pitx3	Kaninchen	Zymed	1:300	IHC, Kryoschnitte	BSA
anti-Nurr1	Ziege	B&D Pharmingen	1:150	IHC, Kryoschnitte	BSA
anti-S100β	Kaninchen	Dako	1:200	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-GFAP	Kaninchen	Chemicon	1:750	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Aldh1a1	Kaninchen	Abcam	1:100	IHC, Kryoschnitte	FCS oder BSA
anti-Synapsin I+II	Kaninchen	Synaptic Systems	1:500	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Isl1	Kaninchen	Abcam	1:300	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Lmx1a	Kaninchen	Millipore		IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-5-HT	Kaninchen	Sigma	1:2500	IHC, Paraffinschnitte	FCS
anti-5-HT	Kaninchen	Sigma	1:5000	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-β-Catenin	Maus	BD PharMingen	1:800	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-GFP	Huhn	Abcam	1:100	IHC, Kryoschnitte	BSA, FCS oder NGS
anti-Olig2	Kaninchen	Chemicon	1:500	IHC, Kryo- und Paraffinschnitte	FCS
anti-BrdU	Maus	Roche	1:50	IHC, Kryoschnitte	FCS
anti-Flag	Kaninchen	Sigma	1:1000	ICC & WB	5 % FCS (ICC), 5 % Milchpulver (WB)
anti-HA	Ratte	Roche	1:1000	ICC & WB	5% FCS (ICC), 5 % Milchpulver (WB)
anti-c-myc	Maus	Santa Cruz	1:500	ICC & WB	FCS (ICC), 5 % Milchpulver (WB)
Sekundäre Antikörper					
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Dianova	1:10.000		
Anti-Maus-HRP	Ziege	Dianova	1:10.000		
Anti-Ratte-HRP	Ziege	Dianova	1:10.000		
Anti-Kaninchen-Alexa594	Ziege	Molecular probes	1:1000		
Anti-Kaninchen-Alexa594	Esel	Molecular probes	1:1000		
Anti-Kaninchen-Alexa488	Esel	Molecular probes	1:500		
Anti-Maus-Alexa594	Ziege	Molecular probes	1:700		
Anti-Ratte-Alexa594	Ziege	Molecular probes	1:500		
Anti-Ratte-Alexa488	Ziege	Molecular probes	1:500		
Anti-Ziege-Alexa594	Esel	Molecular probes	1:500		
Anti-Ziege-Alexa488	Esel	Molecular probes	1:500		
Anti-Huhn-Alexa594	Ziege	Molecular probes	1:500		

Tab. 18: Verwendete Antikörper. Das FCS, BSA oder NGS gibt an welches Serum zum Blocken verwendet wurde.

sekundäre Antikörper für 90 Minuten bei RT inkubiert, ehe zwei weitere Waschschrte in 1x PBS für 30 Minuten erfolgten. Zum Abschluss wurden die Schnitte in Eindeckmedium (Vectrashield mit DAPI) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

5.3.8 LacZ Färbung ganzer Embryonen

Für den Nachweis von β -Galaktosidaseaktivität in ganzen Embryonen wurde eine LacZ-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde das Gewebe zunächst gründlich in 1x PBS gewaschen, ehe es für eine Stunde in Fix A (Tab. 19) fixiert wurde. Im Anschluss wurde die Fixierlösung ausgewaschen (3x 20 Minuten in 1x PBS), ehe das Gewebe mittels X-gal Färbelösung (Tab. 20) bei 37 °C gefärbt wurde. Die Färbung erfolgte so lange, bis das Signal vollständig entwickelt war, dann folgte die Aufklärung der Embryonen. Hierzu wurde das Gewebe zunächst zwei mal in 1x PBS gewaschen ehe es in einer aufsteigenden Glycerolreihe (15 %, 30 %, 50 %, 70 % und 80 %) aufgeklärt wurde. Das Gewebe wurde in 80%igem Glycerol bei 4 °C gelagert.

Reagenz	Menge
37 % Formaldehyd	0,675 ml
25 % Glutaraldehyd	0,2 ml
10 % NP-40	0,05 ml
20x PBS	1,25 ml
dH ₂ O	22,825 ml

Tab. 19: Zusammensetzung der Fix A Fixierlösung für die LacZ-Färbung

Reagenz	Menge
1x PBS	9,35 ml
X-Gal (40 mg/ml)	0,25 ml
200 mM K ₃ Fe(CN) ₆	0,25 ml
200 mM K ₄ Fe(CN) ₆	0,25 ml
100 mM MgCl ₂	0,2 ml

Tab. 20: Zusammensetzung der LacZ-Färbelösung. Das X-Gal wurde in Dimethylformamid angesetzt.

5.3.9 LacZ Färbung von Kryoschnitten

Zur Visualisierung der β -Galaktosidaseaktivität auf Kryoschnitten wurden die Gewebeschnitte zunächst für 10 Minuten bei 4 °C fixiert (0,2 % Glutaraldehyd in 1x PBS). Anschließend wurden sie 3x 5 Minuten mit LacZ-Puffer (Tab. 21) bei RT gewaschen und in völliger Dunkelheit bei 37 °C gefärbt (Färbelösung siehe Tab. 20). Die Färbung dauerte 16 - 96 Stunden. Nachdem das Signal sichtbar war, wurden die Kryoschnitte zum Abstoppen der Färbereaktion 2x 5 Minuten bei Raumtemperatur in 1x PBS gewaschen, ehe sie mit Mowiol[®] 4-88 (Roth) eingedeckelt wurden.

Reagenz	Menge
1 M MgCl ₂	1 ml
10 % NP-40	1 ml
1 % NaDOC	5 ml
20x PBS	25 ml
dH ₂ O	468 ml

Tab. 21: LacZ-Fixierungslösung für Kryoschnitte.

5.3.10 TUNEL-Methode

Zur Visualisierung apoptotischer Zellen wurde die TUNEL-Methode (engl. „*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*“) angewandt (Gavrieli et al., 1992). Während der Apoptose wird die DNA von Endonukleasen zersetzt, so dass DNA-Bruchstücke entstehen. Die dabei freiwerdenden Hydroxylgruppen werden mit Hilfe einer terminalen Desoxynukleotid-Transferase (TdT) markiert, da das Enzym die Kopplung eines mit z.B. Fluoreszin gekoppelten Farbstoffes ermöglicht. Die Farbstoffe können anschließend mittels Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden. Für die Durchführung des TUNEL-Testes wurde das ApopTag[®] Red *in situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden Kryoschnitte für den TUNEL-Test herangezogen.

5.3.11 Golgi-Färbung

Zur Analyse der Axone von Nervenzellen im Mittelhirn wurde eine Golgi-Färbung durchgeführt. Diese Färbung basiert auf der Imprägnierung mit Silbernitrat. Der Vorteil der Golgi-Färbung beruht darin, dass nur ein geringer Prozentsatz aller Neuronen angefärbt wird und diese daher sehr gut visualisiert werden können und ihr Verlauf somit gut verfolgt werden kann. Für die Golgi-Färbung wurde das FD Rapid GolgiStain[™] Kit (FD Neurotechnologies) verwendet. Es wurden Gehirne von E16.5 und E17.5 alten Embryonen gefärbt. Das Protokoll wurde bis auf folgende Ausnahme nach Angaben des Herstellers durchgeführt: Anstatt Gefrierschnitte des Gewebes anzufertigen wurden die gefärbten Gehirne teilweise in 2 % „Low Melting Point“ Agarose eingebettet und mit einem Vibratom wie in Kapitel 5.3.5 beschrieben geschnitten. Die Dokumentation erfolgte mit einem BX-60 Fluoreszenzmikroskops (Olympus) und der Cell^P Software (Olympus). Bearbeitet wurden die Bilder anschließend mit Photoshop 10.0 (Adobe).

5.3.12 DiI-Färbung

Um den Verlauf der Axone der Colliculi superiores zu visualisieren wurde eine Färbung der Axone mittels DiI (CellTracker CM-DiI, Molecular Probes) durchgeführt. 50 μg des CellTrackers wurden in 1 ml Methanol gelöst. Zur Applikation des DiI's wurden embryonale Gehirne der Stadien E16.5 und E17.5 heraus präpariert und in eisgekühltes 1x PBS überführt. Anschließend erfolgte die Injektion des gelösten Farbstoffes mittels vorher speziell präparierter Glaskapillaren und einer Injektionsvorrichtung. Pro Experiment wurde immer dieselbe Menge DiI injiziert. Nach der Applikation des Farbstoffes wurden die Gehirne für 7 - 14 Tage in 4%igem PFA bei 4 °C fixiert. Während dieser Zeit konnte der Farbstoff entlang der axonalen Zellmembran wandern und so die Axone färben. Anschließend wurden die Gehirne mit 1x PBS gewaschen und in 2 % „Low Melting Point“ Agarose eingebettet. Mit einem Vibratom wurden 100 μm dicke Gewebeschnitte hergestellt, welche in Vectrashield mit DAPI eingedeckelt wurden. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Konfokalen-Lasermikroskop (LSM 410 invert, Leica) gemacht und anschließend mit Software ImageJ übereinander gelegt und bearbeitet.

5.3.13 Detektion von mRNA mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) auf Gewebeschnitten

Zur Detektion der Expression von RNA in Gewebeproben wurde die sogenannte *in situ* Hybridisierung (ISH) auf Kryoschnitten durchgeführt (Moorman et al., 2001). Im Falle einer Einzelfärbung wurden grundsätzlich DIG markierte RNA-Sonden verwendet. Wenn eine Doppelfärbung durchgeführt wurde, dann wurden DIG und Fluorescein markierte RNA-Sonden verwendet. Die ISH erfolgte über mehrere Tage. Am ersten Tag wurden die Gewebeschnitte zunächst für 15 Minuten in 4 % PFA fixiert, ehe sie 2x 5 Minuten in 1x PBS gewaschen wurden. Um das Gewebe permeabel zu machen, wurden die Schnitte für 3 - 5 Minuten (je nach Embryonalstadium) mit Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K in 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA in DEPC-dH₂O) behandelt. Die Proteinase K Aktivität wurde mittels Inkubation in 1%igem Glycin in 1x PBS für 5 Minuten gestoppt. Dann wurden die Gewebeschnitte in 1x PBS (2x 5 min) gewaschen, ehe eine erneute Fixierung folgte (4 % PFA und 0,2 % Glutaraldehyd in 1x PBS). Um die Fixierlösung zu entfernen, wurden die Gewebeschnitte zwei mal 5 Minuten in 1x PBS gewaschen. Im Anschluss folgte die Prehybridisierung in einer Feuchtekammer bei 70 °C in Hybridisierungslösung (Tab. 22). Für die Hybridisierung wurden die RNA-Sonden zunächst bei

80 °C für 3 Minuten denaturiert, ehe sie in Hybridisierungspuffer verdünnt auf die Schnitte appliziert wurden. Die Verdünnung betrug je nach Qualität der RNA 1:20 - 1:100. Wenn eine ISH mit zwei Proben durchgeführt wurde, dann wurden die DIG und Fluorescein markierten Sonden gleichzeitig aufgetragen. Die Inkubation erfolgte 16 Stunden bei 70 °C in einer Feuchtekammer mit 2x SSC pH 4,5 und 50 % Formamid in DEPC-dH₂O.

Reagenz	Menge
Formamid (Merck)	50 %
20x SSC pH 4,5	25 %
Blockpulver (Boehringer)	1 g
0,5 M EDTA	1 %
10 % CHAPS	1 %
Tween-20 (Merck)	0,1 %
Heparin	1 mg/ml
total RNA aus Hefe	1 mg/ml

Tab. 22: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers. Die Lösung wurde mit autoklaviertem dH₂O angesetzt.

Nach der Hybridisierung war es wichtig ungebundene Probe wieder von den Schnitten herunter zu waschen. Dazu wurden die Objektträger zunächst in 2x SSC pH 4,5 bei RT gewaschen, ehe sie 3x 30 Minuten mit 50 % 2x SSC (pH 4,5) in Formamid bei 65 °C im Wasserbad inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte zur Equilibrierung des Gewebes 2x 10 Minuten in KTBT (Tab. 23) gewaschen. Im Falle einer Doppelfärbung erfolgte vor dem Waschen in KTBT noch eine Inkubation in TNE (10mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit RNAase A (20 µg/ml). Um mögliche Hintergrundfärbung zu vermeiden und unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren wurden die Schnitte für 2 Stunden in Blocklösung (20 % FCS in KTBT) inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation des Antikörpers (1:2000 Anti-Digoxigenin-AP F_{ab}-Fragmente (Roche) in Blocklösung) bei 4 °C über Nacht in einer mit dH₂O gefüllten Feuchtekammer.

Reagenz	Menge
1 M Tris-HCl pH 7,5	100 ml
5 M NaCl	60 ml
1 M KCl	20 ml
Tween-20 (Merck)	20 ml
dH ₂ O	1800 ml

Tab. 23: KTBT Zusammensetzung. Außer des Tween-20's wurden alle Lösungen vorher autoklaviert.

Um ungebundenen Antikörper zu entfernen wurden die Gewebeschnitte am nächsten Tag exzessiv in KTBT gewaschen (zunächst 3x 5 Minuten, gefolgt von 3x 30 Minuten). Im Anschluss

wurden die Schnitte in NTMT (Tab. 24) überführt, ehe die Farbreaktion durch Applikation der Färbelösung (NTMT mit 200 μ l NBT/BCIP (Roche)) gestartet wurde. Die Farbreaktion erfolgte bei RT und unter regelmäßigem Wechsel der Färbelösung. War es notwendig über mehrere Tage zu Färben, so wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen in 1x PBT (1x PBS + 1 % Tween-20) gestoppt (4x 5 Minuten). Im Falle einer Einzelfärbung wurden die Schnitte anschließend mit Mowiol[®]-488 (Roth) eingedeckelt. Erfolgte eine Doppelfärbung wurden die Schnitte nach dem Waschen in 1x PBS für 15 Minuten in 4 % PFA fixiert, ehe sie in 1x PBS gewaschen wurden (2x 5 Minuten). Um das zuerst applizierte DIG-AP Enzym zu inaktivieren wurden die Gewebeschnitte bei 65 °C in KTBT inkubiert (30 Minuten). Im Anschluss daran wurde das Gewebe in KTBT (3x 10 Minuten, RT) equilibriert ehe die Blocklösung appliziert wurde (2 Stunden, RT). Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit anti-Fluorescein-AP F_{ab}-Fragmenten (1:1500 in Blocklösung, Roche) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtekammer.

Reagenz	Menge
1 M Tris-Cl pH 9,5	100 ml
5 M NaCL	20 ml
1 M MgCl ₂	50 ml
Tween-20 (Merck)	1 ml
dH ₂ O	892 ml
Levamisol	0,24 g

Tab. 24: NTMT Zusammensetzung. Das Levamisol wurde erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Am nächsten Tag wurde ungebundener Antikörper durch Waschen in KTBT (3x 5 Minuten, gefolgt von 3x 30 Minuten) entfernt ehe die Schnitte 3 mal für 5 Minuten in NTMT inkubiert wurden. Die Farbreaktion wurde wie bereits oben beschrieben durchgeführt, nur wurden anstelle von NBT/BCIP eine INT/BCIP Lösung verwendet (75 μ l INT/BCIP in NTMT). Abgestoppt wurde die Reaktion ebenfalls durch Waschen in 1x PBT (4x 5 Minuten), ehe sie in Mowiol[®]-488 (Roth) eingedeckelt wurden. Die Dokumentation erfolgte entweder mit einem BX-60 oder einem SZX-12 Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Anpassung der Größe, der Helligkeit oder des Kontrastes wurden mit Photoshop Version 10.0 (Adobe) durchgeführt.

5.3.14 Statistische Analyse

Um festzustellen, ob die Anzahl positiver Zellen in den Mutanten signifikant verändert war, wurde ein „*student's t-test*“ (engl.) durchgeführt. Bei embryonalen Stadien wurden zunächst

alle positiven Zellen des Mittelhirns in jedem vierten Schnitt gezählt. Aus diesem Wert wurde ein Mittelwert gebildet. Dies wurde für mindestens drei verschiedene Tiere (pro WT und Mutante) gemacht. Auf die Mittelwerte wurde der „*student's t-test*“ unter Verwendung von Excel (Microsoft) angewandt. Betrug der Wert weniger als 0,05 ($p < 0,05$), dann wurde angenommen, dass die Veränderung signifikant ist. Die statistische Analyse adulter Gehirne wurde vom Prinzip her ebenso wie die Analyse embryonaler Stadien durchgeführt. Es wurde aber immer nur jeder siebte Schnitt eines halben Mittelhirns ausgezählt. Da das Gehirn symmetrisch aufgebaut ist, macht es keinen Unterschied ob das gesamte Hirn oder nur die Hälfte ausgezählt wird. Zusätzlich zum „*student's t-test*“ wurde die Standardabweichung berechnet. Die Werte wurden alle normalisiert, so dass der Wert des WT als 100 % angenommen und davon ausgehend der Prozentwert der Mutanten berechnet werden konnte. In den Graphen sind die Prozentwerte und die Standardabweichung angegeben.

5.4 Zellbiologische Methoden

5.4.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden HeLa (humane Cervixcarcinom-Zellen) Zellen und Hek293T (humane, embryonale Nieren-Zellen die zusätzlich ein SV40 T-Antigen exprimieren) Zellen verwendet.

5.4.2 Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion von Zellen wurde das Transfektionsreagenz LipofectaminTM 2000 (Invitrogen) verwendet. 24 Stunden vor der Transfektion wurden HeLa oder Hek293T Zellen in Gewebeschalen oder auf Lab-TekTM II - CC2TM Objektträgern (Nunc) so ausplattiert, dass am Tage der Transfektion eine 90%ige Konfluenz vorlag. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in luftgesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ in DMEM-Medium mit 4mM L-Glutamin, 4, 5% Glukose (Invitrogen) und 10 % inaktiviertem FCS. Die Plasmid-DNA wurde in serumfreien OPTI[®] MEM[®]I (Invitrogen) verdünnt (24 µg in 1,5 ml für eine 100-mm Kulturschale, 2 µg in 100 µl für eine Objektträger-Kammer). Die verwendete Plasmid-DNA wurde zuvor einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Der Einsatz von LipofectaminTM 2000 und die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden bei 37 °C wie oben beschrieben kultiviert.

5.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz auf Zellen (ICC)

Um Nachzuweisen ob die Methode der Transfektion erfolgreich war und um Nachzuweisen ob die Proteine in der Zelle co-lokalisiert sind wurde eine indirekte Immunfluoreszenz auf Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst wie oben Beschrieben unter Verwendung von Lab-Tek™ II - CC2™ Objektträgern (Nunc) transfiziert. Nach 16 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt und die Kultivierung schließlich nach 24 Stunden gestoppt. Das Medium wurde vorsichtig entfernt und die Zellen 2 mal in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,74 % Formamid (in 1x PBS) für 20 Minuten fixiert, ehe sie erneut in 1x PBS gewaschen wurden (3x 5 Minuten). Um die Zellen zu Permeabilisieren wurden sie zunächst 5 Minuten in 1x PBS mit 0,5 % Triton X-100 und anschließend in 1x PBS mit 0,1 % Tween-20 (2x 5 Minuten) inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Zellen 70 Minuten in Blocklösung (10 % FCS in 1x PBS) inkubiert. Im Folgenden wurde der primäre Antikörper appliziert und die Zellen über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte dreimaliges Waschen in PBT (0,1 % Tween-20 in 1x PBS) ehe der sekundäre Antikörper appliziert wurde. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte 45 Minuten bei RT in vollkommener Dunkelheit. Zum Entfernen des sekundären Antikörpers wurden die Zellen erneut in PBT (3x 7 Minuten) im Dunkeln gewaschen ehe sie in Vectashield® mit DAPI (Vector laboratories) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt wurden. Aufnahmen wurden mit dem BX-60 Fluoreszenzmikroskop (Olympus) und der Cell^P Software (Olympus) gemacht.

5.5 Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Gewebe

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Gewebe wurden Gehirne von Embryonen des Stadiums E17.5 in 1 ml Homogenisierungspuffer (320 mM Sucrose, 5 mM Hepes-NaOH pH 7,4, 5 mM EDTA) mit einem Gewebe-Lysierer (Tissue Lyser LT, Quiagen) homogenisiert. Zu dem Homogenisierungspuffer wurden kurz vor Gebrauch Proteaseinhibitoren zugesetzt (eine Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail, EDTA frei (Roche) pro 10 ml Puffer). Die Homogenisierung erfolgte für 3 Minuten mit 50 Oszillation bei 4 °C. Wenn es nicht sofort weiter verwendet wurde, wurde das Gesamtproteinextrakt bei -80 °C gelagert.

5.5.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Zellen

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Zellen wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen in einem ml Lyse-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 M NaCl, 1 mM DTT, 1,0 % Triton-X[®]-100) für 30 Minuten bei 4 °C unter leichtem Schütteln lysiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst und das Zell-Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C. Das Zell-Lysat wurde sofort für die Co-Immunopräzipitation weiter verwendet.

5.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde ein BCA-Kit (BCA Protein Assay Reagenz, Thermo Scientific) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichreihe erstellt, ehe 10 μ l der Probe mit 200 μ l BCA-Reagenz versetzt und die die Absorption bei 562 nm gemessen wurde. Für die Eichreihe wurden Messungen mit 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 μ l BSA eingesetzt. Die Proteinkonzentration der Probe konnte dann mit Hilfe der erstellten Eichreihe abgelesen werden.

5.5.4 Co-Immunopräzipitation

Zur Studie von Protein-Protein Interaktionen wurde eine Methode der Co-Immunopräzipitation angewandt. Hierzu wurden HeLa oder Hek293T Zellen wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben kultiviert und transfiziert. Um eine frühzeitige Degenerierung der Proteine zu verhindern, wurde 16 Stunden nach der Transfektion, der Proteasomeninhibitors MG132 (Sigma) in einer Endkonzentration von 10 μ l zugegeben. Nach weiterer Kultivierung der Zellen für 8 Stunden wurden die Zellen wie in Kapitel ??sec: Zell-lysate) beschrieben lysiert, ehe eine Co-Immunopräzipitation mittels FLAG[®] Tagged Protein Immunoprecipitation Kit (Sigma) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die Dauer der einzelnen Waschschrte betrug 15 Minuten und es wurden 950 μ l Zell-Lysat über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der optionale Waschschrte wurde ebenfalls mit eingeschlossen. Die Elution wurde mit dem Kit beiliegenden 2x SDS Probenpuffer durchgeführt.

5.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Um eine gute Trennung der Proteinmoleküle zu erreichen, wurden die Proben zunächst in einem weitporigen Sammelgel gesammelt ehe sie in einem engporigen Trenngel aufgetrennt werden. Für die Herstellung der Gele wurde zunächst das Trenngel (Zusammensetzung siehe Tab. 25) gegossen und mit Isopropanol überschichtet, was eine Polymerisation unter Luftausschluss gewährleistet. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel darauf gegossen (Zusammensetzung siehe Tab. 25). Das Gel wurde mittels einer Hamilton-Spritze geladen und bei 25 mA, in einer mit 1x Laufpuffer (0,125 M Tris, 0,96 M Glycin und 0,1 % SDS in dH₂O) gefüllten Gelkammer, laufen gelassen, bis der verwendete Proteinmarker gut aufgetrennt war. Als Proteinmarker wurde der Precision Plus ProteinTM All Blue Marker von Biorad verwendet.

Reagenz	Menge für ein 12%iges Trenngel	Menge für ein 15%iges Trenngel	Menge für das Sammelgel
30 % Acrylamid-Bisacrylamid (Roth)	12 ml	30 ml	4 ml
4x Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	-	6 ml
dH ₂ O	10,5 ml	7,5 ml	14 ml
10 % APS	100 µl	100 µl	160 µl
TEMED	100 µl	100 µl	16 µl

Tab. 25: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE Der 4x Trenngelpuffer besteht aus 1,5 M Tris und 0,4 % SDS in dH₂O mit pH 8,8, während der 4x Sammelgelpuffer aus 0,5 M Tris und 0,4 % SDS in dH₂O besteht und einen pH-Wert von 6,8 aufweist.

5.5.6 Western Blotting

Für eine Western Blot Analyse wurden die Proteine, die in einem SDS-Gel getrennt wurden zunächst mittels eines Transfers auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer Membran, Millipore) übertragen. Dazu wurde das Gel auf ein Whatman-Papier gelegt, auf das Gel wurde eine aktivierte PVDF-Membran und darauf ein weiteres Whatman-Papier gelegt. Anschließend wurde es in eine Blotkammer (BioRad) eingespannt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4 °C und 15 Volt. Bevor die PVDF-Membran verwendet werden konnte, wurde sie 30 Sekunden in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und anschließend 15 Minuten in 1x Transferpuffer inkubiert. Das Whatman-Papier wurde vor Verwendung ebenfalls 15 Minuten in 1x Transferpuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Transfer für 3 Stunden auf 30 V hoch gestellt ehe die Membran entfernt und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 90 Minuten

in Blocklösung (5 % Milchpulver, 1 % Tween-20 in 1x PBS) überführt wurde. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (Verdünnt in Blocklösung, siehe Tab. 18) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x 20 Minuten in 1x PBT (1 % Tween-20 in 1x PBS) gewaschen und der mit HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelte sekundäre Antikörper appliziert (Tab. 18). Die Einwirkzeit betrug 90 Minuten. Nach erneutem Waschen in 1x PBT (3x 20 Minuten) erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz. Hierzu wurde das SuperSignal[®] West Pico Chemilumineszent Substrate und das SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (beides Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Entwicklung wurden BioMax MR Röntgenfilme (Kodak) und eine Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa) verwendet.

Literatur

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., & Brulet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development*, 115, 3279–3290.
- Agarwala, S. & Ragsdale, C. W. (2002). A role for midbrain arcs in nucleogenesis. *Development*, 129, 5779–5788.
- Akiyama, T. (2000). Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 11, 273–282.
- Alonso, M., Gomez, F., Munoz, E., Abad, M., Roldan, M., Curiel, I., Paz, J., Bullon, A., & Lopez-Bravo, A. (1992). Comparative study of in situ hybridization and immunohistochemical techniques for the detection of human papillomavirus in lesions of the uterine cervix. *Eur J Histochem*, 36, 271–278.
- Anderson, L. & Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mrna and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18, 533–537.
- Anderson, S., Eisenstat, D., Shi, L., & Rubenstein, J. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *dlx* genes. *Science*, 128, 474–476.
- Andersson, E., Jensen, J., Parmar, M., Guillemont, F., & Björklund, A. (2006a). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of *neurogenin2*. *Development*, 133, 507–516.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., & Ericson, J. (2006b). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell*, 124, 393–405.
- Ang, S.-L. (2006). Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development*, 133, 3499–3506.
- Arvidsson, U., Riedl, M., Elde, R., & Meister, B. (1997). Vesicular acetylcholine transporter (vacht) protein: A novel and unique marker for cholinergic neurons in the central peripheral nervous systems. *The Journal of Comparative Neurology*, 378, 454–467.

- Asbruek, C. H. J., van Doorinck, J. H., Mansouri, A., Smidt, M. P., & Burbach, J. P. H. (2006). Neurophysial dysmorphogenesis in mice lacking the homeobox gene *uncx4.1*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36, 65–71.
- Azmitia, E. C. & Whitaker-Azmitia, P. M. (2008). Anatomy. cell biology and maturation of the serotonergic System: . *American Collage of Neuropsychopharmacology*, Online publication: , www.acnp.org/g4/GN401000042/Ch042.html.
- Baimbridge, G. K., Cello, M. R., & Rogers, J. H. (1992). Caldum-bin@ng proteins in the nervous system. *Trends in Neuroscience*, 15, 303–308.
- Bally-Cuif, L., Alvarado-Mallart, R., Darnell, D., & Wassef, M. (1992). Relationship between *wnt-1* and *en-2* expression domains during early development of normal and ectopic met-mesencephalon. *Development*, 115, 999–1009.
- Bally-Cuif, L. & Wassef, M. (1994). Ectopic induction and reorganization of *wnt-1* expression in quail/chick chimeras. *Development*, 120, 3379–3394.
- Behan, M., Jourdain, A., & Bray, G. (1992). Calcium binding protein (calbindin d28k) immunoreactivity in the hamster superior colliculus: ultrastructure and lack of co-localization with gaba. *Exp Brain Res.*, 89, 115–124.
- Bennett, M. R. & Balcar, V. J. (1999). Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochemistry international*, 35, 269–280.
- Björklund, A. & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, 30, 194–202.
- Blaess, S., Corrales, J. D., & Joyner, A. L. (2006). Sonic hedgehog regulates gli activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. *Development*, 133, 1799–1809.
- Bonilla, S., Hall, A. C., Pinto, L., Attardo, A., Götz, M., Huttner, W. B., & Arenas, E. (2008). Identification of midbrain floor plate radial glia-like cells as dopaminergic progenitors. *Glia*, 56, 809–820.
- Briscoe, J. & Ericson, J. (1999). The specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 10, 353–362.

- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T., & Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, 101, 435–445.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T., & Rubenstein, J.L. and Ericson, J. (1999). Homeobox gene *nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling. *Nature*, 398, 622–627.
- Broccoli, V., Boncinelli, E., & Wurst, W. (1999). The caudal limit of *otx2* expression positions the isthmus organizer. *Nature*, 401, 164–168.
- Brodski, C., Weisenhorn, D. M., Signore, M., Sillaber, I., Oesterheld, M., Broccoli, V., Acampora, D., Simeone, A., & Wurst, W. (2003). Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *Journal of Neuroscience*, 23, 4199–4207.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y., & Südhof, T. C. (1995). Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans unc-13* gene define novel family of c_2 -domain proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 25273–25280.
- Cagniard, B., Balsam, P. D., Brunner, D., & Xiaoxi, Z. (2006). Mice with chronically elevated dopamine exhibit enhanced motivation, but not learning, for a food reward. *Neuron*, 51, 1362–1370.
- Camilli, P. D., Cameron, R., & Greengard, P. (1983). Synapsin I (protein 1), a nerve terminal-specific phosphoprotein I. its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *Journal of Cell Biology*, 96, 1337–1354.
- Casarosa, S., Fode, C., & Guillemot, F. (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development*, 126, 525–534.
- Chebat, D.-R., Boire, D., & Ptito, M. (2006). Development of the commissure of the superior colliculus in the hamster. *The Journal of Comparative Neurology*, 494, 887–902.
- Cheng, L., Arata, A., Mizuguchi, R., Qian, Y., Karunaratne, A., Gray, P.A. Arata, S., Shirasawa, S., Bouchard, M., Luo, P., Chen, C., Busslinger, M., Goulding, M., Onimaru, H., & Ma, Q. (2004). *Tlx3* and *tlx1* are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over gabaergic cell fates. *Nature Neuroscience*, 7, 510–517.

- Cheng, L., Samad, O. A., Xu, Y., Mizuguchi, R., Luo, P., Shirasawa, S., Goulding, M., & Ma, Q. (2005). *Lbx1* and *tlx3* are opposing switches in determining gabaergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nature Neuroscience*, 8, 1510–1515.
- Chi, C. L., Martinez, S., Wurst, W., & Martin, G. R. (2003). The isthmic organizer signal *fgf8* is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development*, 130, 2633–2644.
- Chiang, C., Ying, L. T. T., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., & Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. *Nature*, 381, 407–413.
- Chilov, D., Sinjushina, N., Saarimäki-Vire, J., Taketo, M., & Partanen, J. (2010). beta-catenin regulates intercellular signalling networks and cell-type specific transcription in the developing mouse midbrain-rhombomere 1 region. *PLoS One*, 5, e10881.
- Chin, L.-H., Li, L., Ferreira, A., Kosik, K., & Greengard, P. (1995). Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin i-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9239–9234.
- Chizhikov, V. V. & Millen, K. J. (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Developmental Biology*, 277, 287–295.
- Chung, S., Leung, A., Baek-Soo Han, B.-S., Chang, M.-Y., Moon, J.-I. Chun-Hyung Kim, C.-H., Hong, S., Pruszak, J., Isaacson, O., & Kim, K.-S. G. (2009). *Wnt1-lmx1a* forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the *shh-foxa2* pathway. *Cell -Stem Cell*, 5, 646–658.
- Corbin, J., Gaiano, N., Machold, R., Langston, A., & Fishell, G. (2000). The *gsh2* homeo-domain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development*, 127, 45007–5020.
- Cortázar, D., Kunz, C., Selfridge, J., Lettieri, T., Saito, Y., MacDougall, E., Wirz, A., Schuermann, D., Jacobs, A. L., Siegrist, F., Steinacher, R., Jiricny, J., Bird, A., & Schär, P. (2011). Embryonic lethal phenotype reveals a function of *tdg* in maintaining epigenetic stability. *Nature*, 470, 419–432.

- Craven, S. E., Lim, K.-C., Ye, W., Engel, J. D., de Sauvage, F., & Rosenthal, A. (2004). Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development*, 131, 1165–1173.
- Crossley, P. H., Martinez, S., & Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by fgf8 in the chick embryo. *Nature*, 380, 66–68.
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K., & McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of cre recombinase. *Current Biology*, 8, 1323–1326.
- Deschamps, J. (2007). Ancestral and recently recruited global control of the *Hox* genes in development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17, 422–427.
- Ding, Y.-Q., Marklund, U., Yuan, W., Yin, J., Wegman, L., Ericson, J., Deneris, E., Johnson, R. L., & Chen, Z. (2003). *Lmx1b* is essential for the development of serotonergic neurons. *Nature Neuroscience*, 398, 933–938.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St Jacques, B., Shen, L., and Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic-hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of cns polarity. *Cell*, 75, 1417–1430.
- Elsworth, J. D. & Roth, R. H. (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: Relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 144, 4–9.
- Eng, S., Gratwick, K., Rhee, J., Fedtsova, N., Gan, L., & Turner, E. (2001). Defects in sensory axon growth precede neuronal death in *brn3a*-deficient mice. *J Neurosci*, 21, 541–549.
- Erlander, M. G., Tillakaratne, N., Feldblum, S., Patel, N., & Tobin, A. J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, 7, 91–100.
- Fahn, S. (2003). Description of parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Science*, 991, 1–14.
- Ferreira, A. & Caceres, A. (1992). The expression of the class iii beta-tubulin isotype in developing neurons in culture. *J Neurosci. Res*, 32, 516–529.
- Ferreira, A., Chin, L.-S., Li, L., Lanier, L. M., Kosik, K. S., & Greengard, P. (1998). Distinct roles of synapsin i and synapsin ii during neuronal development. *Molecular Medicine*, 4, 22–28.

- Ferri, A. L., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A., & Ang, S. L. (2007). *Foxa1* and *foxa2* regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*, 134, 2761–9.
- Finlay, B. L. & Darlington, R. B. (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science*, 268, 1578–1584.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Golidis, C., & Guillemont, F. (1998). The bhlh protein *neurogenin2* is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron*, 20, 483–494.
- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.-L., Anderson, D. J., & Guillemont, F. (2000). A role for neuronal determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes and Development*, 14, 1164–1169.
- Fogel, J. L., Chiang, C., Huang, X., & Agarwala, S. (2008). Ventral specification and perturbed boundary formation in the mouse midbrain in the absence of hedgehog signaling. *Developmental Dynamics*, 237, 1359–1372.
- Gale, E. & Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular brain*, 1, 8.
- Garcia-Fernàndez, J. (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nature Reviews Genetics*, 6, 881–894.
- Gaspar, P., Cases, O., & Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*, 4, 1002–1012.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear dna fragmentation. *J Cell Biol*, 119, 493–501.
- Gellon, G. & McGinns, W. (1998). Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of hox expression patterns. *BioEssays*, 20, 116–125.
- Gilbert, S. F. (2006). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc.
- Gonzalez-Soriano, J., Gonzalez-Flores, M., Conteras-Rodriguez, J., Rodriguez-Veiga, E., & Martinez-Sainz, P. (2000). Calbindin d28k and parvalbumin immunoreactivity in the rabbit superior colliculus: An anatomical study. *The Anatomical Record*, 259, 334–346.

- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J., & Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science*, 259, 780–785.
- Griesel, G., Krug, C., Yurlova, L., Diaconu, M., & Mansouri, A. (2011). Generation of knockout mice expressing a gfp-reporter under the control of the *lmx1a* locus. *Gene Expr. Patterns*, Epub ahead of print, Epub ahead of print.
- Griesel, G., Treichel, D., Collombat, P., Krull, J., Zembrzycki, A., van den Akker, W. M., Gruss, P., Simeone, A., & Mansouri, A. (2006). *Sp8* controls the anteroposterior patterning at the midbrain-hindbrain border. *Development*, 133, 1779–187.
- Gruber, P. & Gould, D. J. (2010). The red nucleus: Past, present, and future. *Neuroanatomy*, 9, 1–3.
- Guo, C., Qiu, H. Y., Huang, Y., Chen, H., Yang, R. Q., Chen, S. D., Johnson, R. L., Chen, Z. F., & Ding, Y. Q. (2007). *Lmx1b* is essential for *fgf8* and *wnt1* expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development*, 134, 317–325.
- Gygi, S., Rochon, Y., Franza, B., & Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mrna abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 19, 1720–1730.
- H. Nakamura, K. M., Takagi, S., & Fujisawa, H. (1991). Projection of the retinal ganglion cells to the tectum differentiated from the prosencephalon. *Neurosci. Res.*, 11, 189–197.
- Hayashi, S. & McMahon, A. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev. Bio*, 244, 305–318.
- Hendricks, T., Fyodorov, D., Wegman, L., Lelutiu, N., Pehek, E., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E., Sweatt, J., & Deneris, E. (2003). *pet-1* ets gene plays a critical role in 5-ht neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behaviour. *Neuron*, 37, 233–247.
- Hwang, D. Y., Hong, S., Jeong, J. W., Choi, S., Kim, H., Kim, J., & Kim, K. S. (2009). Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of *pitx3* in the ventral midbrain dopamine neurons. *Journal of Neurochemistry*, 111, 1202–1212.

- Iacopino, A. M., Rhoten, W. B., & Christakos, S. (1990). Calcium binding protein (calbindin-d28k) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum. *Molecular Brain Research*, 8, 283–290.
- Ishikawa, K., Mizusawa, H., Fujita, T., Ohkoshi, N., Doi, M., Komatsuzaki, Y., Iwamoto, H., Ogata, T., & Shoji, S. (1995). Calbindin-d 28k immunoreactivity in the cerebellum of spinocerebellar degeneration. *Journal of Neurological Sciences*, 129, 179–185.
- Jacobs, F. M. J., van Erp, S., van der Linden, A. J. A., von Oerthel, L., Burbach, J. P. H., & Smidt, M. P. (2009). Pitx3 potentiates nurr1 in dopamine neuron terminal differentiation through release of smrt-mediated repression. *Development*, 136, 531–540.
- Jafari, G., Appleford, P. J., Seago, J., Pocock, R., & Woollard, A. (2011). The unc-4 homeobox protein represses *mab-9* expression in da motor neurons in *caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Development*, 128, 49–58.
- Joksimovic, M., Anderegg, A., Roy, A., Campochiaro, L., Yun, B., Kittappa, R., McKay, R., & Awatramani, R. (2009a). Spatiotemporally separable shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *PNAS*, 106, 19185–19190.
- Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Wchang, W., Taketo, M. M., McKay, R. D. G., & Awatramani, R. B. (2009b). Wnt antagonism of shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 12, 125–131.
- Joseph C. Pearson, D. L. & McGinnis, W. (2005). Modulating hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics*, 6, 893–904.
- Joyner, A. L., Liu, A., & Millet, A. (2000). Otx2, gbx2 and fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 736–741.
- Kadkhodaei, B., Ito, T., Joodmardi, E., Mattsson, B., Rouillard, C., Carta, M., Muramatsu, S.-I., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Metzger, D., Chambon, P., Lindqvist, E., Larsson, N.-G., Olson, L., Björklund, A., Ichinose, H., & Perlmann, T. (2009). Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *Journal of Neuroscience*, 29, 15923–15932.
- Kala, K., Haugas, M., Lilleväli, K., Guimera, J., Wurst, W., Salminen, M., & Partanen, J. (2009). Gata2 is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain gabaergic neurons. *Development*, 136, 253–262.

- Kania, A., Johnson, R. L., & Jessel, T. M. (2000). Coordinate roles for lim homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell*, 102, 161–173.
- Kawano, H., Ohyamaa, K., Kawamura, K., & Nagatsu, I. (1995). Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Development in brain research*, 86, 101–113.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L., Mira, H., Guillemont, F., Arenas, E., & Ang, S.-L. (2006). Neurogenin2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development*, 133, 495–505.
- Kelley, A. E. & Berridge, K. C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *Journal of Neuroscience*, 22, 3306–3311.
- Kikuta, H., Kanai, M., Ito, Y., & Yamasu, K. (2003). gbx2 homeobox gene is required for the maintenance of the isthmus region in the zebrafish embryonic brain. *Developmental Dynamics*, 228, 433–450.
- Kittapa, R., Chang, W. W., Awatramani, R., & McKay, D. (2007). The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol*, 5, e325.
- Korotkova, T. M., Ponomarenko, A., Brown, R., & Haas, H. (2004). Functional diversity of ventral midbrain dopamine and gabaergic neurons. *Molecular Neurobiology*, 29, 243–259.
- Kroll, T. T. & O’Leary, D. (2005). Ventralized dorsal telencephalic progenitors in pax6 mutant mice generate gaba interneurons of a lateral ganglionic eminence fate. *PNAS*, 102, 7374–7379.
- Lanea, R. D., Allana, D. M., Bennett-Clarke, C. A., Howella, D. L., & Rhoades, R. W. (1997). Projection status of calbindin- and parvalbumin-immunoreactive neurons in the superficial layers of the rat’s superior colliculus. *Visual Neuroscience*, 14, 277–286.
- Lang, A. E. & Lozano, A. M. (1998a). Parkinson’s disease - first of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 339, 1044–1053.
- Lang, A. E. & Lozano, A. M. (1998b). Parkinson’s disease - second of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 339, 1130–1143.

- Lee, J., Choi, Y., Choi, H., & Myung, K. (2003). Tnfalpha expression in the paraffin-embedded tissues of leprosy. *Korean J. Dermatol*, 38, 363–371.
- Lee, K. J. & Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annual Reviews Neuroscience*, 22, 261–294.
- Leitges, M., Neidhardt, L., Haenig, B., Hermann, B., & Kispert, A. (2000). The paired homeobox gene *uncx4.1* specifies pedicles, transverse processes and proximal ribs of the vertebral column. *Development*, 127, 2259–2267.
- Lendahl, U., Zimmerman, L., & McKay, R. (1990). Cns stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60, 585–595.
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews Genetics*, 2, 743–755.
- Li, J. Y. H. & Joyner, A. L. (2001). *Otx2* and *Gbx2* are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development*, 128, 4979–4991.
- Li, S., Misra, K., Matisse, M., , & Xiang, M. (2005). *Foxn4* acts synergistically with *mash1* to specify subtype identity of v2 interneurons in the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 10688–10693.
- Liang, C., Sinton, C., Sonsalla, P., & German, D. (1996). Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-d28k exhibit reduced vulnerability to mptp-induced neurodegeneration. *Neurodegeneration*, 282, 313–8.
- Lichtinghagen, R., Musholt, P., Lein, M., Römer, A., Rudolph, B., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Schnorr, D., Loening, S., & Jung, K. (2002). Different mrna and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol*, 42, 398–406.
- Lickteig, K. M., Duerr, J. S., Frisby, D. L., Hall, D. H., Rand, J. B., & Miller, D. M. (2001). Regulation of neurotransmitter vesicles by the homeodomain protein *unc-4* and its transcriptional corepressor *unc-37/groucho* in *Caenorhabditis elegans* cholinergic motor neurons. *The journal of Neuroscience*, 21, 2001–20014.

- Lin, W., Metzakopian, E., Mavromatakis, Y., Gao, N., Balaskas, N., Sasaki, H., Briscoe, J., Whitsett, J., Goulding, M., Kaestner, K., & Ang, S. (2009). *Foxa1* and *foxa2* function both upstream of and cooperatively with *lmx1a* and *lmx1b* in a feedforward loop promoting mesodiencephalic dopaminergic neuron development. *Developmental Biology*, 333, 386–396.
- Liu, A. M., Losos, K., & Joyner, A. L. (1999). *Fgf8* can activate *gbx2* and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain. *Nature*, 126, 4827–4838.
- Ma, Q., Fode, C., Guillemont, F., & Anderson, D. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes and Development*, 13, 1717–1728.
- Manak, J. & Scott, M. (1994). A class act: conservation of homeodomain functions. *Development Supplement*, (pp. 61–77).
- Mansouri, A. (2001a). *Knockout and Knock-in Animals*. John Wiley & Sons, Ltd: <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0003840>.
- Mansouri, A. (2001b). *Mouse Knockouts: Modifying the Mouse Genome by using Embryonic Stem Cells*. John Wiley & Sons, Ltd: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0002668.pub2>.
- Mansouri, A., Voss, A., Thomas, T., Yokota, Y., & Gruss, P. (2000). *Uncx4.1* is required for the formation of the pedicles and proximal ribs and acts upstream of *pax9*. *Development*, 127, 2251–2258.
- Mansouri, A., Yokota, Y., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Gruss, P. (1997). Paired-related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney and nervous system. *Developmental Dynamics*, 210, 53–65.
- Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L. R., & Martin, G. R. (1999). *Fgf8* induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on *otx2* expression. *Development*, 126, 1189–1200.
- Martinez, S., Wassef, M., & Alvarado-Mallart, R. M. (1991). Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*. *Neuron*, 6, 971–981.

- Matsunaga, E., Katahira, T., & Nakamura, H. (2002). Role of *lmx1b* and *wnt1* in mesencephalon and metencephalon development. *Development*, 129, 5269–5277.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., & Aizawa, S. (1995). Mouse *otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes and Development*, 9, 2646–2658.
- Mavromatakis, Y. E., Lin, W., Metzakopian, E., Ferri, A. L. M., Yan, C. H., Sasaki, H., Whisett, J., & Ang, S. (2011). *Foxa1* and *foxa2* positively and negatively regulate *shh* signalling to specify ventral midbrain progenitor identity. *Mechanisms of Development*, 128, 90–102.
- Maxwell, S., Ho, H., Kuehner, E., Zhao, S., & Li, M. (2005). *Pitx3* regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev Biol.*, 282, 467–79.
- McMahon, A. P. & Bradley, A. (1990). The *wnt-1* (*int-1*) protooncogene is required for development of a large region of the mouse-brain. *Cell*, 62, 1073–1085.
- McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., & McMahon, J. A. (1992). The midbrain hindbrain phenotype of *wnt-1*^{-/-}*wnt-1*⁻ mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell*, 69, 581–595.
- Meyers, N., E., Lewandoski, M., & Martin, G. R. (1998). An *fgf8* mutant allelic series generated by cre- and flp-mediated recombination. *Nature Genetics*, 18, 136–141.
- Miller, D., Niemeyer, C., & Chitkara, P. (1993). Dominant *unc-37* mutations suppress the movement defect of a homeodomain mutation in *unc-4*, a neural specificity gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 135, 741–753.
- Miller, M., Shen, M., Shamu, C., Bürglin, T., Ruvkun, G., Dubois, M., Ghee, M., & Wilson, L. (1992). *C. elegans Unc-4* gene encodes a homeodomain protein that determines the pattern of synaptic input to specific motor neurons. *Nature*, 355, 841–845.
- Miller, M. D. I. & Niemeyer, C. (1995). Expression of the *Unc-4* homeoprotein in *Caenorhabditis elegans* motor neurons specifies presynaptic input. *Development*, 121, 2877–2886.
- Millonig, J. H., Millen, K. J., & Hatten, M. E. (2000). The mouse dreher gene *lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature*, 403, 764–769.

- Miyoshi, G. & Bessho, Y. (2004). Identification of a novel basic helix-loop-helix gene, heslike, and its role in gabaergic neurogenesis. *J. Neurosci*, 24, 3672–3682.
- Moorman, A., Houwling, A., de Boer, P., & Christoffels, V. (2001). Sensitive nonradioactive detection of mrna in tissue sections: novel application of the whole-mount in situ hybridization protocol. *J Histochem Cytochem*, 49, 1–8.
- Mosimann, C., Hausmann, G., & Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 276–286.
- Mukhopadhyay, R., Ho, Y.-S., Swiatek, P. J., Rosen, B. P., & Bhattacharjee, H. (2006). Targeted disruption of the mouse *Asna1* gene results in embryonic lethality. *FEBS Letters*, 580, 38893894.
- Nakamura, H., Nakano, K., Igawa, H., Takagi, S., & Fujisawa, H. (1986). Plasticity and rigidity of differentiation of brain vesicles studied in quail-chick chimeras. *Cell Differentiation*, 19, 187–193.
- Nakatani, T., Kumaia, M., Mizuharaa, E., Minakia, Y., & Ono, Y. (2010). *Lmx1a* and *lmx1b* cooperate with *foxa2* to coordinate the specification of dopaminergic neurons and control of floor plate cell differentiation in the developing mesencephalon. *Developmental Biology*, 339, 101–113.
- Nakatani, T., Minaki, Y., Kumai, M., & Ono, Y. (2007). *Helt* determines gabaergic over glutamatergic neuronal fate by repressing *ngn* genes in the developing mesencephalon. *Development*, 134, 2783–2793.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature*, 260, 799–801.
- Neidhardt, L. M., Kispert, A., & Hermann, B. G. (1997). A mouse gene of the paired-related homeobox class expressed in the caudal somite compartment and in the developing vertebral column, kidney and nervous system. *Dev Genes Evol*, 207, 330–339.
- Nemere, I., Leathers, V., B.S., T., Luben, R., & Norman, A. (1991). Redistribution of calbindin-d28k in chick intestine in response to calcium transport. *Endocrinology*, 129, 2972–824.

- Nemoto, C., Hida, T., & Arai, R. (1999). Calretinin and calbindin-d28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: a triple-labeling immunohistochemical study. *Brain Res.*, 846, 313–8.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., & Guillemot, F. (2001). Neural bhlh genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron*, 29, 244–249.
- Nieuwkoop, P. D. (1991). The successive steps in the pattern-formation of the amphibian central-nervous-system. *Development, Growth & Differentiation*, 33, 149–154.
- Nunes, I., Tovmasian, L. T., Silva, M., Burke, R. E., & Stephen P. Goff, S. (2003). Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *PNAS*, 100, 4245–4250.
- Ohyama, K., Kawano, H., Asou, H., Fukuda, T., Oohira, A., Uyemura, K., & Kawamura, K. (1998). Coordinate expression of 11 and 6b4 proteoglycan/phosphacan is correlated with the migration of mesencephalic dopaminergic neurons in mice. *Brain Res Dev Brain Res*, 15, 219–226.
- O’Leary, D. D. & McLaughlina, T. (2005). Mechanisms of retinotopic map development: Ephs, ephrins, and spontaneous correlated retinal activity. *Progress in Brain Research*, 147, 43–65.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Takahasi, J., & Imai, T. (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development*, 134, 3213–3225.
- Pan, G., Chang, Z., Schöler, H., & Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor oct4. *Cell Research*, 12, 321–329.
- Panhuisen, M., Weisenhorn, D. M. V., Blanquet, V., Brodski, C., Heinzmann, U., Beisker, W., & Wurst, W. (2004). Effects of wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26, 101111.
- Pannese, E. (1999). The golgi stain: Invention, diffusion and impact on neurosciences. *Journal of the History of the Neurosciences*, 8, 132–140.
- Park, E., Sun, X., Nichol, P., Saijoh, Y., Martin, J., & Moon, A. (2008). System for tamoxifen-inducible expression of cre-recombinase from the foxa2 locus in mice. *Dev. Dyn.*, 237, 447–453.

- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J., & Guillemont, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes *mash1* and *ngn2* in the specification of neuronal subtype identity. *Genes and Development*, 16, 324–338.
- Peltopuro, P. & Kala, K. (2010). Distinct requirements for *ascl1* in subpopulations of midbrain gabaergic neurons. *Dev Biol*, 343, 63–70.
- Pflugrad, A., Meir, J., Barnes, R., & Miller, D. I. (1995). The Groucho-like transcription factor UNC-37 functions with the neural specificity gene *Unc-4* to govern motor neuron identity in *C. elegans*. *Development*, 124, 1699–1709.
- Pilati, N., Baker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., & Hamann, M. (2008). A rapid method combining golgi and nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56, 539–550.
- Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puellas, E., Gogoi, R. and Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D. and Sussel, L., Weisenhorn, D., Martinez, S. and Arenas, E., Simeone, A., & Wurst, W. (2006). A *wnt1*-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain dopaminergic progenitors in vivo. *Development*, 133, 89–98.
- Prakash, N., Puellas, E., Freude, K., Trümbach, D., Omodei, D., Di Salvio, M., Sussel, L., Ericson, J., Sander, M., Simeone, A., & Wurst, W. (2009). *Nkx6-1* controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain. *Development*, 136, 2549–2555.
- Prakash, N. & Wurst, W. (2004). Specification of midbrain territory. *Cell Tissue Research*, 318, 5–14.
- Prakash, N. & Wurst, W. (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cellular and molecular life science*, 63, 187–206.
- Puelles, E. (2007). Genetic control of basal midbrain development. *Journal of Neuroscience Research*, 85, 3530–3534.
- Puelles, E., Acampora, D., Gogoi, R., Tuorto, F., Papalia, A., Guillemot, F., Ang, S.-L., & Simeone, A. (2006). *Otx2* controls identity and fate of glutamatergic progenitors of the thalamus by repressing gabaergic differentiation. *The Journal of Neuroscience*, 26, 5955–5964.

- Reynolds, B. & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707–1710.
- Rossant, J. & Tam, P. P. L. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*, 136, 701–713.
- Rovescalli, A., Asoh, S., & Nierenberg, M. (1996). Cloning and characterization of four murine homeobox genes. *Proceedings of the National Academy of Science*, 93, 10691–10696.
- Saito, T., Lo, L., Anderson, D. J., & Mikoshiba, K. (1996). Identification of novel paired homeodomain protein related to *c. elegans unc-4* as a potential downstream target of *mash1*. *Dev Biol*, 180, 143–155.
- Sammata, N., Hardina, D. L., & McClintock, T. S. (2010). *Uncx* regulates proliferation of neural progenitor cells and neuronal survival in the olfactory epithelium. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45, 398–407.
- Sanes, D., Reh, T., & Harris, W. (2006). *Development of the Nervous System*. Academic Press.
- Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J., Le, W., Smidt, M., Cox, J., De Mayo, F., Burbach, J., & Conneely, O. (1998). *Nurr1* is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 4013–4018.
- Sauvageot, C. & Stiles, C. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 244–249.
- Scardigli, R., Schuurmans, C., Gradwohl, G., & Gillemont, F. (2001). Crossregulation between *neurogenin2* and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord. *Neuron*, 31, 203–217.
- Schrägle, J., Huang, R., Christ, B., & Pröls, F. (2004). Control of the temporal and spatial *Uncx4.1* expression in the paraxial mesoderm of avian embryos. *Anat Embryol*, 208, 323–332.
- Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J. M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L.-M., Seibt, J., Tang, H., Cunningham, J. M., Dyck, R., Walsh, C., Campbell, K., Polleux, F., & Guillemot, F. (2004). Sequential phases of cortical specification involve neurogenin-dependent and -independent pathways. *The EMBO Journal*, 23, 2892–2902.

- Schuurmans, C. & Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 26–34.
- Schwenk, F., Baron, U., & Rajewsky, K. (1995). A cre–transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, 23, 5080–508.
- Seibt, J., Schuurmans, C., G. Gradwohl, Dehay, C., Vanderhaeghen, P., & an F. Polleux, F. G. (2003). Neurogenin2 specifies the connectivity of thalamic neurons by controlling axon responsiveness to intermediate target cues. *Neuron*, 39, 4013–4018.
- Sieber, M. A., Storm, R., de-la Torre, M. M., Müller, T., and Katja Reuter, H. W., Vasyutina, E., & Birchmeier, C. (2007). Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *The Journal of Neuroscience*, 27, 4902–4909.
- Simeone, A. (2000). Positioning the isthmus organizer - where otx2 and gbx2 meet. *Trends in Genetics*, 16, 237–240.
- Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D., & O’Leary, D. D. M. (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *Journal of Neuroscience*, 21, 3126–3134.
- Smidt, M., Smits, S., Bouwmeester, H., Hamers, F., van der Linden, A., Hellemons, A., Graw, J., & Burbach, J. (2004). Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene pitx3. *Development*, 131, 1145–55.
- Smidt, M. P., Asbreuk, C. H. J., Cox, J. J., Chen, H., Johnson, R. L., & Burbach, J. P. H. (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires lmx1b. *Nature Neuroscience*, 111, 337–341.
- Smidt, M. P., van Schaick, H., Lanctôt, C., Tremblay, J., Cox, J., van der Kleij, A. A., Wolterink, G., Drouin, J., & Burbach, J. P. (1997). A homeodomain gene ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(24), 13305–10.
- Smits, S. M., Ponnio, T., Conneely, O. M., Burbach, J. P. H., & Smidt, M. P. (2003). Involvement of nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 18, 1731–1738.

- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., & Gruss, P. (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*, 387, 406–409.
- Steffensen, S. C., Svingos, A. L., Pickel, V. M., & Henriksen, S. J. (1998). Electrophysiological characterization of gabaergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 18, 8003–8015.
- Sudarov, A. & Joyner, A. (2007). Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Development*, 2, doi:10.1186/1749–8104–2–26.
- Tang, M., Miyamoto, Y., & Huang, E. (2009). Multiple roles of β -catenin in controlling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons. *Development*, 136, 2027–2038.
- Tang, M., Miyamoto, Y., & Huang, E. (2010). Interactions of wnt/ β -catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*, 30, 9280–9291.
- Tardif, E. and S. Clarke, S. (2002). Commissural connections of human superior colliculus. *Neuroscience*, 2, 363–372.
- Tripathi, R. & Mishra, R. (2009). In silico analysis of pax6 interacting proteins indicates missing molecular links in development of brain and associated disease. *International Journal of Biological and Life Sciences*, 8, 2012.
- Usdin, T. B., Eiden, L. E., Bonner, T. I., & Erickson, J. D. (1995). Molecular biology of the vesicular ach transporter. *Trends in Neuroscience*, 18, 218–224.
- van den Munckhof, P., Luk, K., Ste-Marie, L., Montgomery, J., Blanchet, P., Sadikot, A., & Drouin, J. (2003). Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development*, 130, 2535–2542.
- Von Stetina, S. E., Fox, R. M., Watkins, K. L., & Starich, T. A. (2007). Unc-4 represses ceh-12/hb9 to specify synaptic inputs to va motor neurons in *C. elegans*. *Genes and Development*, 21, 332–346.
- Waite, M., Skidmore, J., Billi, A., Martin, J., & Martin, D. (2011). Gabaergic and glutamatergic identities of developing midbrain *Pitx2* neurons. *Developmental Dynamics*, 240, 333–346.

- Wallen, A. & Perlmann, T. (2003). Transcriptional control of dopamine neuron development. *Annals of the New York Academy of Science*, 991, 48–60.
- Wallen, A., Zetterstrom, R., Solomin, L., Arvidsson, M., Olson, L., & Perlmann, T. (1999). Fate of mesencephalic *ahd2*-expressing dopamine progenitor cells in *nurr1* mutant mice. *Exp. Cell Res.*, 153, 737–746.
- Wassarman, K., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A., Rubenstein, J., Martinez, S., & Martin, G. (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *gbx2* gene function. *Development*, 224, 2923–2934.
- Wasserman, R. & Fullmer, C. (1989). On the molecular mechanism of intestinal calcium transport. *Adv Exp Med Biol*, 249, 45–65.
- White, J. G., Southgate, E., & Thompson, J. (1992). Mutations in the *Caenorhabditis elegans unc-4* gene alter the synaptic input to ventral motor neurons. *Nature*, 355, 838–841.
- Winkler, C. & Kirik, D. (2005). Cell transplantation in parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci.*, 28, 86–92.
- Winnier, A., Meir, J., Ross, J., Tavernarakis, N., Driscoll, M., Ishihara, T., Katsura, I., & Miller, D. (1999). UNC-4/UNC-37-dependent repression of motor neuron-specific genes control synaptic choice in *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development*, 13, 2774–2786.
- Wolpert, L., Tickle, C., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J., & Jessel, T. (2011). *Principles of Development*. Oxford University press.
- Wurst, W., Auerbach, A. B., & Joyner, A. L. (1994). Multiple developmental defects in engrailed-1 mutant mice - an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development*, 120, 2065–2075.
- Wurst, W. & Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 99–108.
- Xiang, M., Lin, G., Zhou, L., Klein, W., & Nathans, J. (1996). Targeted deletion of the mouse pou-domain gene *brn-3a* causes a selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling. *PNAS*, 93, 11950–11955.

- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L. R., Hynes, M., & Rosenthal, A. (1998). Fgf and shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 93, 755–766.
- Zermeno, V., Espindola, S., Mendoza, E., & Hernandez-Echeagaray, E. (2009). Differential expression of neurotrophins in postnatal c57bl/6 mice striatum. *Int J. Biol. Sci*, 5, 118–127.
- Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B., Olson, L., & Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-Deficient mice. *Science*, 276, 248–250.
- Zhao, Z.-Q., Scott, M., Chiechio, S., Wang, J.-S., Renner, K. J., Gereau IV, R. W., Johnson, R. L., Deneris, E. S., & Chen, Z.-F. (2006). *Lmx1b* is required for maintenance of central serotonergic neurons and mice lacking central serotonergic system exhibit normal locomotor activity. *The Journal of Neuroscience*, 26, 12781–12788.
- Zhou, Y. and Yamamoto, M. & Engel, J. (2000). Gata2 is required for the generation of v2 interneurons. *Development*, 127, 3829–3838.

6 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt...

... Prof. Wimmer für die Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen und für ein offenes Ohr für Fragen aller Art.

... Ahmed Mansouri für Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas. Auch möchte ich mich besonders für die immerwährende Hilfe und Diskussionsbereitschaft bedanken, sowie für so manch kritischen Blick, durch den ich den richtigen Umgang mit Experimenten und die kritische Auswertung wissenschaftlicher Ergebnisse gelernt habe. Danke!

...PD Dr. Anastassia Stoykova, Prof. Reinhard Schuh, Prof. Martin Göpfert und Prof. Walter Paulus für ihr Entgegenkommen und die Bereitschaft sich meiner Prüfungskommission anzuschließen. Außerdem möchte ich Anastassia Stoykova herzlich für alle Ratschläge und Hilfestellungen der letzten Jahre danken.

... allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Zellbiologie für die Hilfestellungen und die schöne Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Thomas Schulz für die fortwährende Hilfe und die Bereitschaft mir das technische „Know-How“ beizubringen. Dr. Stephen Blanke möchte ich besonders herzlich für die Herstellung des Uncx4.1 Antikörpers danken. Dr. Mihaela Diaconu danke ich für die Bereitstellung des Ngn2-HA Plasmides und die hilfreichen Tips und Tricks zur Durchführung der Co-IP und des Western Blottings. Zeeshan Ahmad möchte ich recht herzlich für die schöne Laboratmosphäre in den letzten Jahren danken. Martina Daniel und Petra Rus danke ich besonders für die technischen Hilfestellungen aller Art und die super Atmosphäre in der Histologie - mit euch macht sogar das Schneiden Spaß. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei unseren Engeln Bojka, Manuela und Geli bedanken - ihr erleichtert uns den Laboralltag wirklich sehr mit eurem unermüdlichen Einsatz!

... Vanessa Paul, Simon Kordowich, Alexander Klimke, Marco Tylkowski und Christian Krug für die immerwährende Bereitschaft die täglichen Probleme des Laboralltages zu diskutieren und für jegliche Hilfestellung. Auch möchte ich mich für die schönen Abende außerhalb des Labors bedanken. Christian möchte ich besonders dafür danken, dass er immer bereit war die kleinen Mupelmäuse zu versorgen, wenn es mich mal wieder in die Heimat verschlagen hat. Ich danke euch als Kollegen und Freunde.

... Christiane Heuchel, Alexandra Kurth und dem ganzen Maushausteam für ihre exzellente Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Christiane für ihr Engagement und ihre Ausdauer bedanken immerwährend und zu jeder Zeit eine super Arbeit zu leisten und die Tiere im Auge zu haben - trotz einer sehr schweren Zeit. Danke Christiane!

... Dr. Frederique Varoqueaux und Klaus Hellmann für die Hilfestellungen und die Durchführung der Analyse der synaptischen Proteine.

... Dr. Martin H. J. Jaspers für die immerwährende Hilfe „mal schnell“ ein paar Aufnahmen am konfokalen Mikroskop zu machen.

... meiner lieben Schwester Mandy und meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mir diesen Werdegang ermöglicht haben. Vielen Dank für eure bedingungslose Unterstützung - ihr seid die besten Eltern die man sich wünschen kann!

... meinem Freund der mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Danke für die Geduld und die tatkräftige Unterstützung, besonders in den letzten Wochen - du hast mich immer ermutigt und mir den Rückhalt gegeben, den ich brauchte. Dankeschön!

7 Curriculum vitae

Persönliche Angaben:

Tamara Rabe
Deisterstr. 17
37081 Göttingen
tamara.rabe@gmx.de

Geburtsdatum: 16.12.1982
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Wissenschaftliche Ausbildung:

- | | |
|-------------|---|
| seit 2008 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen
Abteilung: Molekulare Zellbiologie, Forschungsgruppe: Molekulare Zelldifferenzierung
Dissertation zum Thema: „Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors Uncx4.1 im murinen Mittelhirn“ |
| 2008 - 2011 | Zugehörigkeit zum Programm des DFG Forschungszentrums Molekularphysiologie des Gehirns (CMPB) |
| 2002 - 2007 | Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Ausbildungsschwerpunkte: Genetik, Molekularbiologie, Mikrobiologie, Physiologie
Abschluss: Diplom Biologin |

Publikationen:

Rabe, T.I., Grisel, G., Blanke, S., Burbach, P.H., Guillemot, F., Kispert, A., Varoqueaux, F. and Mansouri, A. (2011), „The transcription factor Uncx4.1 is involved in the development of midbrain dopaminergic neurons“, Manuskript in Vorbereitung