

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen  
Abteilung experimentelle Embryologie  
Komm. Leiter: Dr. B. Hirt

Die Rolle des Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Gli3* bei der  
Anordnung und Ausbildung kortikaler Vorläuferzellen im  
zerebralen Kortex

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Thomas Paul Weisner  
aus  
Bytom / Polen

2011

---

Dekan: Herr Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Herr Professor Dr. T. Skutella

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. I. Krägeloh-Mann

---

kiss to chaos



---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Entstehung und Struktur des zerebralen Kortex</b>	<b>8</b>
1.1.1	Regionalisierung und Musterbildung	10
1.1.2	Neuronale Differenzierung des zerebralen Kortex	16
1.1.3	Laminierung des zerebralen Kortex	16
1.1.4	Arealisierung des zerebralen Kortex	19
<b>1.2</b>	<b>Neurogenese im zentralen Nervensystem</b>	<b>21</b>
1.2.1	Neokortikale Stamm- und Vorläuferzellen	21
1.2.2	Neuroepitheliale Zellen	23
1.2.3	Radiale Gliazellen	25
1.2.4	Basale Vorläuferzellen	27
<b>1.3</b>	<b>Das <i>Gli3</i>-Gen und seine Rolle bei der Entwicklung des dorsalen Telenzephalons</b>	<b>30</b>
<b>1.4.</b>	<b>Gemeinsame durch Mutationen im <i>Gli3</i>-Gen verursachte Krankheiten</b>	<b>32</b>
1.4.1	Das Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom) (GCPS, OMIM 175700)	34
1.4.2	Das Pallister-Hall-Syndrom (PHS, OMIM 146510)	35
1.4.3	Acrocallosal-Syndrom (ACS, OMIM 200990)	36
1.4.4	Die Postaxiale Polydaktylie (PAP; MIM 174200)	36
1.4.5	Die Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD-IV; MIM 174700)	37
<b>1.5</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>38</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>40</b>
<b>2.1</b>	<b>Tierexperimenteller Ansatz</b>	<b>40</b>
2.1.1	Tierstämme und Tierhaltung	40
2.1.2	Verpaarung und Tiertötung	40
<b>2.2</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>41</b>
2.2.1	Gewebevorbehandlung für Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitte	42
2.2.2	Anfertigung von Kryostatschnitten	42
2.2.3	Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryostatschnitten	42
2.2.4	Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen	43
2.2.5	Bestimmung der Proliferationsrate mit BrdU	44
2.2.6	Zelltodanalyse mit Propidiumiodidmarkierung	45
2.2.7	Dokumentation und Bearbeitung von Immunfluoreszenz- färbungen	46
<b>2.3</b>	<b><i>In-situ</i> Hybridisierung</b>	<b>46</b>
2.3.1	Durchführung	46
2.3.2	Dokumentation und Bearbeitung von in-situ Hybridisierungen	47

<b>2.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>47</b>
2.4.1	Kultivierung von Neurosphären	47
2.4.2	Isolierung und in Kulturnahme von Vorläuferzellen aus dem dorsalen Telenzephalon von E12.5 Mäusen	48
2.4.3	Kultivierung von Neurosphären	49
2.4.4	Neurosphärendifferenzierung	50
2.4.5	Lösen adhärenter Zellen	51
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>51</b>
2.5.1	Genotypisierung von genetisch veränderten Embryonen und adulten Mäusen	51
2.5.2	Gesamt-RNA für PCR-Analysen aus Neurosphären	52
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
2.5.4	Gelelektrophoretische Auftrennung	57
<b>2.6</b>	<b>Geräte und Technik</b>	<b>58</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Stamm- und Vorläuferzellen im dorsalen Telenzephalon der <i>Gli3</i>-Mutante</b>	<b>60</b>
3.1.1	Ektopische Expression von RGC-Markern bei E12.5	59
3.1.2	Ektopische Expression von RGC-Markern bei E11.5 und E10.5	62
3.1.3	Einfluss des <i>Gli3</i> -Gens auf die basalen Vorläuferzellen	64
3.1.4	Einfluss ektopischer RGC auf die Ausbildung Tuj1 <sup>+</sup> Neurone	67
<b>3.2</b>	<b>Stamm- und Vorläuferzellen im dorsalen Telenzephalon der <i>Wnt7b</i>-Mutante</b>	<b>69</b>
3.2.1	Untersuchung der Morphologie des dorsalen Telenzephalons	69
3.2.2	Untersuchung von RGC, basalen Vorläuferzellen und Neurone im dorsalen Telenzephalon	69
<b>3.3</b>	<b>Analyse des dorsalen Telenzephalons der <i>Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>/Wnt7b<sup>-/-</sup></i> Doppelmutante</b>	<b>71</b>
3.3.1	Morphologie der <i>Gli3/Wnt7</i> -Doppelmutante	72
3.3.2	Bestehende ektopische RGC-Marker Expressionen bei E12.5 in der <i>Gli3/Wnt7</i> -Mutante	72
3.3.3	Radiale Gliazellen exprimieren <i>Wnt7b</i>	74
<b>3.4</b>	<b>Analyse von Neurosphären des dorsalen Telenzephalons der <i>Gli3</i>-Mutante</b>	<b>76</b>
3.4.1	Isolierung von Neurosphären aus der <i>Gli3</i> -Mutante	76
3.4.2	Kultivierung von Neurosphären aus der <i>Gli3</i> -Mutante	77
3.4.3	Genexpressionanalyse von Neurosphären	77
3.4.4	Analyse der Proliferationsfähigkeit und Vitalität von Neurosphären	81
3.4.5	Gliale Differenzierung von Neurosphären	83
3.4.6	Gestörte neuronale Differenzierung <i>Gli3</i> -Neurosphären	86

---

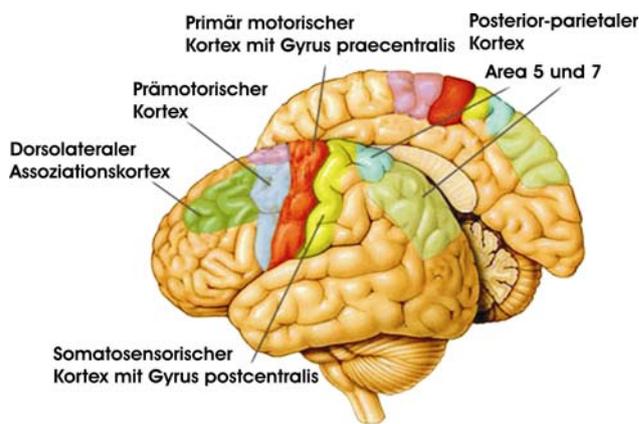
3.4.7	Erhöhte RC2 <sup>+</sup> Vorläuferzellzahl in ausdifferenzierten Neurosphären	90
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
4.1	Ektopische Expression RGC spezifischer Marker im Neokortex der <i>Gli3</i> -Mutante	93
4.2	BLBP und seine Bedeutung während der kortikalen Entwicklung	96
4.3	Ektopische Expression RGC spezifischer Marker im Neokortex der <i>Gli3/Wnt7b</i> -Doppelmutante und der Einfluss von <i>Wnt7b</i>	98
4.4	Einfluss von <i>Gli3</i> auf die Proliferation und Differenzierung in Kultur gehaltener Neurosphären	100
4.5	Reduzierte Expression der <i>NeuroD</i> -Genfamilie in der <i>Gli3</i> -Mutante	103
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>106</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>107</b>
6.1	Literaturverzeichnis	107
6.2	Abkürzungsverzeichnis	131
6.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	134
6.4	Danksagung	136
6.5	Lebenslauf	137

# 1 Einleitung

## 1.1 Entstehung und Struktur des zerebralen Kortex

Das Gehirn zählt bei den Säugetieren zu einem der komplexesten Systeme, dessen korrekte Funktion von der regelhaften Organisation und Unterteilung des Kortex in einzelne, spezielle Areale abhängig ist. Bei allen Säugetieren entwickelt sich aus der Neuralplatte, einem verdickten Bereich des Ektoderms, durch dessen Vertiefung zur Neuralrinne, das Neuralrohr. Aus dem kaudalen Abschnitt des Neuralrohrs entsteht das Rückenmark, während sich der rostrale Abschnitt zu den primären Hirnvesikeln entwickelt; dem als Vorderhirn bekannten Prosenzephalon, dem Mittelhirn (Mesenzephalon) und dem als Hinterhirn bekannten Rhombenzephalon. Diese werden in der fortschreitenden Entwicklung durch Teilung des vorderen und hinteren Vesikels, in die fünf Sekundärvesikel geteilt, aus denen die verschiedenen Hirnstrukturen hervorgehen; das Telenzephalon, Dienzephalon, Mesenzephalon, Metenzephalon und das Myelenzephalon. Zusätzlich findet eine Unterteilung in einen ventralen und dorsalen Bereich statt und dies bedeutet speziell beim Telenzephalon, dass es sich aus dem dorsalen Abschnitt das Pallium und aus dem ventralen Bereich, das Subpallium ausbildet. Aus dem letzteren entstehen die für die motorischen Abläufe benötigten Basalganglien. Der zerebrale Kortex entsteht indessen aus dem Pallium, welches wiederum in weitere Subdomänen unterteilt wird, aus denen später der Neokortex, der Archikortex und der Paläokortex mit den dazugehörigen Strukturen wie dem Hippokampus, dem Plexus Choroideus und dem Riechhirn entstehen. Die Untergliederung dieser Subdomänen ist nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell von Bedeutung, da jeder Struktur eine spezielle Verarbeitungs-spezialisierung zukommt.

Die motorischen Zentren des Großhirns sind im Neokortex in Nachbarschaft zum Gyrus praecentralis lokalisiert. Die rostral gelegenen Areale des präfrontalen Kortex werden sowohl mit der Handlungsplanung und -initiierung als auch der Persönlichkeitsbildung in Verbindung gebracht. Nach kaudal, am



**Abb. 1:** Vereinfachte Darstellung der Verarbeitungsspezialisierung des Gehirns

Der Kortex des Telenzephalons lässt sich grob in fünf bis sechs Lappen einteilen, die durch tiefere Sulci voneinander getrennt sind. Jedem dieser Abschnitte kann ein spezielles Verarbeitungsareal zugesprochen werden. Im Frontallappen liegen spezialisierte Areale, die zu den motorischen Zentren des Großhirns gezählt werden und um den Gyrus praecentralis lokalisiert sind. Nach hinten schließt sich der Parietallappen an, in dem das primäre sensible Zentrum liegt (Gyrus postcentralis). Da sich innerhalb des Kortex Unterschiede im histologischen Feinbau feststellen lassen, wurden diese in 52 Brodmann-Areale unterteilt. So wird z.B. Area 5 die Kontrolle der Körperhaltung und Bewegungen zugesprochen, während Area 7 auf eine Komplexe räumliche und zeitliche Wahrnehmung spezialisiert ist. Entnommen und modifiziert aus [www.thebrain.mcgill.ca](http://www.thebrain.mcgill.ca).

Gyrus postzentralis, schließt sich der Parietallappen an, in dem das primäre sensible Zentrum mit bewusster Wahrnehmung liegt, zu der auch das am Okzipitallappen lokalisierte Sehzentrum und das auf der Innenseite des Temporallobens gelegene Hörzentrum gehört. Der Archikortex, der als das limbische System bezeichnet wird, vermittelt generell zwischen subkortikalen und kortikalen Zentren und stellt daher die physiologische Grundlage für die Verknüpfung von Un-bewusstem mit Bewusstem dar. Dabei spielt das limbische System eine entscheidende Rolle bei der emotionalen Entstehung von

Sinneseindrücken, wie Angst, Freude und Wohlgefühl und deren Einordnung in bisher Erlebtes. Es ist aber auch für Lernvorgänge und Gedächtnisfunktionen entscheidend, bei der neue Inhalte im Hippokampus verarbeitet und später an den Kortex übertragen und ins Langzeitgedächtnis überführt werden. Der Paläokortex, auch als olfaktorischer Kortex im engeren Sinne bezeichnet, bildet die primäre Riechrinde und weist ebenfalls enge Verbindungen mit dem Hippokampus auf. Diese erwähnte Funktionalität des adulten zerebralen Kortex liegt einer geordneten Strukturierung zugrunde, indem der Kortex in sechs radiale neuronale Schichten aufgeteilt ist. Jede einzelne dieser als Lamina bezeichneten Schichten besitzt ihre eigenen histologischen und funktionellen Eigenschaften. Auf Grund dessen, bilden sich auf den gesamten Kortex verteilt, verschiedene Areale aus, die auf ganz bestimmte Signale spezialisiert sind und so als Schaltzentren für z.B. akustische oder visuelle Reize dienen. Liegt eine

Störung der kortikalen Architektur bei Menschen vor, so kann dies zu unterschiedlichen Syndromen wie Epilepsie, motorischer Bewegungsstörung und mentaler Retardation führen (Mischel et al. 1995; Gleeson and Walsh 2000; Olson and Walsh 2002).

### 1.1.1 Regionalisierung und Musterbildung

Die Morphogenese aller embryonalen Strukturen ist durch eine zeitliche und räumliche Abfolge von Signalen gesteuert. Untersuchungen am Modell der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Extremitätenentwicklung bei Wirbeltieren zeigen, dass die Signale in Form morphogener Gradienten wirken und entlang der antero-posterioren, medio-lateralen und der dorso-ventralen Achse als Signalzentren organisiert sind (Abb. 2) und den Zellen Informationen bezüglich ihrer Lokalisierung und Differenzierung geben. Damit beeinflussen sie das umliegende Gewebe (Johnson et al. 1994; Podos and Ferguson 1999). Viele dieser Mechanismen sind auch für die Entstehung des Zentralen Nervensystems (ZNS) verantwortlich, wobei das Telenzephalon unter der Wirkung von Signalmolekülen in weitere Bereiche unterteilt wird, zu denen wie bereits erwähnt auch der Hippokampus, der Neokortex und die ganglionische Eminenz gehören (Shimamura and Rubenstein 1997; Rubenstein et al. 1999; Assimakopoulos et al. 2003; Grove and Fukuchi-Shimogori 2003). Besondere Bedeutung bei der Anteriorisierung der Hirnanlage hat die Expression von Fibroblasten-Wachstums-Faktoren, wie z.B. *Fgf8* (Shimamura and Rubenstein 1997; Bachler and Neubuser 2001). *Fgf8* ist zunächst an der Grenze zwischen neuralem und nicht neuralem Ektoderm, dem sogenannten "anterioren neuralen Kamm" (ANR) vorzufinden. Diese Expression wird während der Entwicklung aufrecht erhalten und findet sich später im rostralen Telenzephalon, der Kommissurenplatte wieder (Crossley et al. 2001; Fukuchi-Shimogori and Grove 2001; Fukuchi-Shimogori and Grove 2003). In Säugetieren wurden diesbezüglich über 20 verschiedene Gene als Mitglieder der *FGF*-Familie klassifiziert. Alle *FGFs* haben eine 120 Aminosäuren große Domäne gemeinsam, die eine Rezeptor- und eine Heparin-Bindungsdomäne enthält

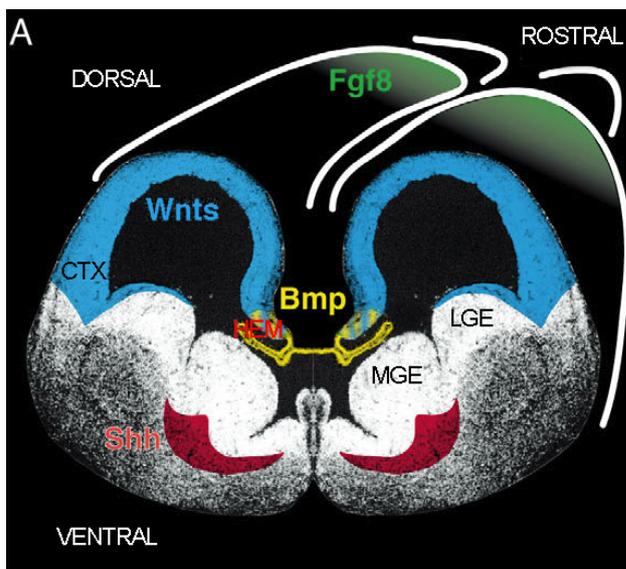
(Ornitz and Itoh 2001). *FGF*-Signale werden über den Rezeptor-Tyrosinkinase-Signaltransduktionsweg in die Zelle vermittelt. Bei Mausmutanten mit verringerter *Fgf8*-Expression konnte eine Kaudalisierung der Kortexanlage beobachtet werden (Garel et al. 2003). Zusätzlich wurde eine Verkleinerung des Vorderhirns mit unterdrückter Ausbildung und reduzierter Expression von spezifischen Markern des basalen Telenzephalons beobachtet (Ye et al. 1998; Shinya et al. 2001). Weiter konnten Studien unter ektopischen *Fgf8* Expressionen im dorsalen Telenzephalon eine Zunahme von ventralen Markern verzeichnen, was bei gleichzeitiger Abnahme dorsaler Marker für eine zunehmende Ventralisierung spricht (Fukuchi-Shimogori and Grove 2001; Kuschel et al. 2003).

Sonic Hedgehog (*Shh*) ist ein weiteres Signalmolekül, das entlang der gesamten ventralen Mittellinie des Neuralrohrs exprimiert wird und in Form eines Gradienten für die Spezifizierung von Neuronenklassen des ventralen Rückenmarks verantwortlich ist (Roelink et al. 1994; Briscoe and Ericson 2001; Fuccillo et al. 2004). Im Vorderhirn dienen die Prächordalplatte und später die mediale ganglionäre Eminenz (MGE) als Quelle von *Shh*. Das Morphogen *Shh* gehört neben Indian Hedgehog (*Ihh*) und Desert Hedgehog (*Dhh*) zur Hedgehog-Familie von Signalmolekülen in Vertebratenzellen, deren Mitglieder alle eine Homologie zum Hedgehog-Protein der Fruchtfliege aufweisen (Echelard et al. 1993). Auf der Oberfläche einer *Shh*-responsiven Zelle bindet *Shh* mit hoher Affinität an seinen Rezeptor Patched (*Ptc*), einem 12-transmembranalen Protein. Durch diese Bindung verliert *Ptc* seine inhibierende Wirkung auf Smoothened (*Smo*), einem 7-transmembranalen Protein.

Unter der Aktivität von *Shh* wird eine proteolytische Spaltung des *Gli3*-Represors unterdrückt und stattdessen die volle Länge des *Gli3*-Proteins transkribiert, der wiederum eine aktivierende Funktion besitzt (Dai et al. 1999; Zhou et al. 2006). *Shh* induziert auch die Expression von Genen des ventralen Vorderhirns und ist für die Ausbildung ventraler telenzephaler Strukturen von Bedeutung (Ericson et al. 1995; Chiang et al. 1996; Shimamura and Rubenstein 1997). So zeigten Untersuchungen bei *Shh*-defizienten Mäusen eine gestörte Ausbildung der medialen (MGE) und der lateralen ganglionären Eminenz

(LGE). Mediale Hirnstrukturen, wie der Plexus choroideus und der Hippokampus im dorsalen Telenzephalon entwickelten sich ebenfalls nicht (Chiang et al. 1996; Kohtz et al. 1998). Ein Verlust von *Shh* führt, sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen, während der embryonalen Entwicklung zur Holoprosencephalie, einer Erkrankung, die mit einer Fehlteilung beider Hemisphären einschließlich dem Verlust des Corpus Callosum, der Riechnerven und weiterer Defekte des Vorderhirns einhergeht. Sie äußert sich durch einen Mikrozephalus, einer reduzierten geistigen und mentalen Intelligenz, Epilepsien bis hin zu weiteren Defekten am Achsenskelett (Belloni et al. 1996; Roessler et al. 1996). Interessanterweise kommt es auch bei einer Überexpression von *Shh* zum Bild einer Holoprosencephalie, bei der jedoch das dorsale Vorderhirn betroffen ist (Huang et al. 2007).

Als ein Strukturzentrum des dorsalen und später medialen Kortex wird zum einen die BMP-reiche (Bone morphogenetic protein) und Wnt-reiche (Wingless-



**Abb. 2:** Vereinfachte Darstellung der Signalzentren.

A: Die grün markierte Fläche stellt die Expression von *Fgf8* dar, welche im rostralen Telenzephalon für dessen Anteriorisierung verantwortlich ist. Die *Wnt*- und *Bmp*-Proteine haben ihren Ursprung im kortikalen Saum (HEM) und üben Einfluss auf den zerebralen Kortex aus (CTX). Ventral findet sich das *Shh*-Signal in der medialen ganglionären Eminenz (MGE). (LGE = laterale ganglionäre Eminenz) Entnommen und modifiziert aus Götz and Sommer, 2005.

Protein) Dachplatte angesehen (Furuta et al. 1997). Später übernimmt die zwischen der Hippokampusanlage und dem Plexus choroideus gelegene, als kortikaler Saum (cortical hem) ausgezeichnete Region, die Bildung der verschiedenen *Wnt*- und *Bmp*-Proteine (Grove et al. 1998; Monuki et al. 2001). Die Gruppe der *BMPs* gehört zur Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren (*TGF $\beta$* ) *BMPs* binden Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren, die daraufhin *Smad*-Proteine aktivieren können. Abhängig von der Kombination der aktivierten *Smads* wird die

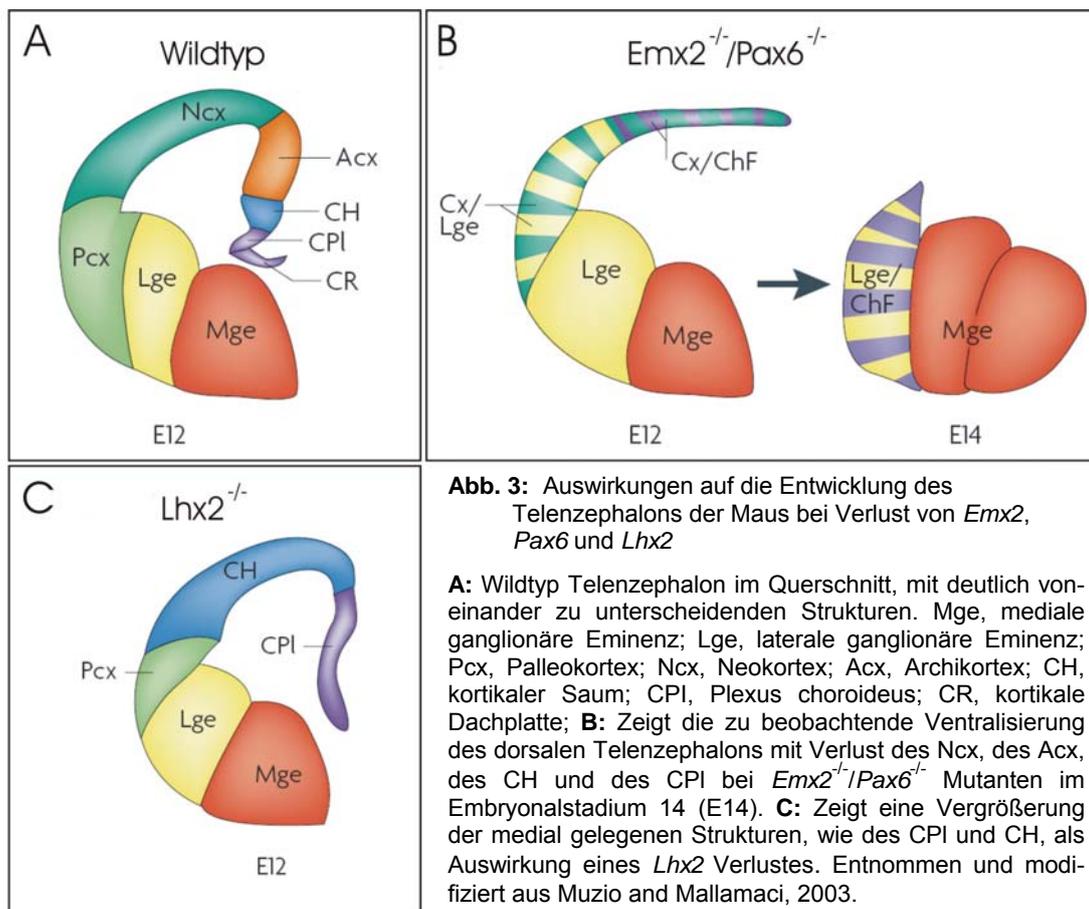
Transkription in der Zelle aktiviert oder unterdrückt. Dabei werden Bmp-Signale für die Abspaltung des Plexus choroideus vom Primordium des zerebralen Kortex verantwortlich gemacht, da in der Maus der Verlust des Bmp-Rezeptors 1a (*Bmpr1a*) zu einer drastischen Reduktion des Plexus choroideus führt. Demgegenüber führt die Expression von konstitutiv aktivem Bmp Rezeptor *Bmpr1a* zu einer Ausdehnung des choroidalen Plexus und einer Reduktion des zerebralen Kortex (Panchision et al. 2001; Hebert et al. 2002). Die Wnt-Signale spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des dorsalen Telenzephalons (Gunhaga et al. 2003). In Vertebraten wurden bisher 19 Mitglieder gefunden und auch in allen anderen Tierstämmen wurden orthologe *Wnt*-Gene entdeckt. Wie *BMPs* und *FGFs* sind *Wnt*-Proteine sehr cysteinreich. Sie enthalten eine invariante Abfolge von 23 Cysteinen (Wodarz and Nusse 1998). *Wnts* sind zwar sekretierte Faktoren, sie diffundieren aber aufgrund ihrer starken Glykosylierung nur schlecht im extrazellulären Raum. *Wnt*-Proteine sind in der Lage, unterschiedliche Signalkaskaden zu aktivieren. Der erste aufgeklärte *Wnt* -Signalweg wird als kanonischer *Wnt*-Signalweg bezeichnet (Wodarz and Nusse 1998). Er wird über den *Wnt*-Rezeptor *Frizzled* vermittelt und führt zur Stabilisierung und nukleären Lokalisation des Proteins *β-Catenin* (Willert and Nusse 1998). Im Zellkern interagiert *β-Catenin* mit den DNA-bindenden Faktoren *TCF* und *LEF* und kontrolliert dort die Transkription (Willert and Nusse 1998). Jedoch aktivieren nicht alle *Wnt*-Faktoren den kanonischen Signaltransduktionsweg. Die nicht-kanonischen *Wnts* verursachen z.B. eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung und aktivieren die G-Protein abhängigen Kinasen Cam-Kinase II und Proteinkinase C (Kuhl et al. 2000). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Signale des kortikalen Saums ist für die Ausbildung des Hippokampus von großer Bedeutung, da bei *Wnt3a*-Signaldefizienten Mäusen die Hippokampusformation nahezu vollständig fehlt (Lee et al. 2000). Weiterhin bewirkt der Aktivitätsverlust von *Lef1/TCF*-Transkriptionsfaktoren, als Mediatoren des kanonischen Wnt -Signalweges, ähnliche Defekte im medialen Kortex. Hierbei wird davon ausgegangen, dass *Wnt*-Signale nicht die Spezifizierung einer hippokampalen Identität, sondern vielmehr die Expansion einer bereits vorliegenden Hippokampusanlage steuern

(Galceran et al. 2000) Wird hingegen der *Wnt*-Signalweg durch das  $\beta$ -*catenin/LEF1* Fusionsprotein ektopisch aktiviert, kommt es im Neokortex zu einer Ausweitung von, für den Hippokampus charakteristischen Zellen und einer reduzierten Anzahl kortikaler Zellen, zumal die Expression neuronaler Faktoren ebenfalls vermindert ist (Machon et al. 2007).

Fgf-, Shh-, Bmp-, Wnt-Proteinen der Signalzentren sind in der Lage, die Expression diverser Transkriptionsfaktoren zu steuern. So konnte gezeigt werden, dass *Emx2*, als ein direktes Zielgen des Bmp/Wnt-Signalsystems, ebenfalls für die Ausprägung medialer Hirnstrukturen verantwortlich ist, da Mausmutanten mit verringerter *Emx2* Expression einen nur zum Teil angelegten oder komplett fehlenden Hippokampus aufweisen (Pellegrini et al. 1996; Tole et al. 2000; Theil et al. 2002). Es wird darüber hinaus davon ausgegangen, dass zwischen Bmp, Fgf und *Emx2* eine negative Kontrollschleife existiert, da *Emx2* direkt oder indirekt über das Protein noggin, die Bmps unterdrücken kann, so dass wiederum Fgfs sich ausbilden können. Fgf besitzt hingegen die Fähigkeit, die *Emx2*-Expression zu reduzieren (Fukuchi-Shimogori and Grove 2003; Shimogori et al. 2004). Bei Shh ist die Funktion der gegenseitig antagonisierenden Wirkung zwischen den Shh- und *Gli3*-Transkriptionfaktoren für die Ausbildung des ventralen Telenzephalons und der Wirbelsäule ebenfalls bekannt (Litingtung and Chiang 2000; Rallu et al. 2002; Hayhurst and McConnell 2003).

Zusätzlich wird spekuliert, ob die kortikale Identität der Zellen auf die Funktionalität eines weiteren Transkriptionsfaktors zurückzuführen ist, wie z.B. *Lhx2* (Muzio et al. 2002). Bei *Lhx2* handelt es sich um einen Homöodomänen-Transkriptionsfaktor (LIM homebox 2), dessen Lokalisation sich einzig auf das kortikale Neuroepithel beschränkt (Xu et al. 1993). Untersuchungen bei *Lhx2*-homozygoten Mäusen konnten eine massive Ausweitung des kortikalen Saums unter einem kompletten Verlust des zerebralen Kortex zeigen (Bulchand et al. 2001). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, *Lhx2* sei für eine Abgrenzung des kortikalen Saums verantwortlich, wobei seine Aktivität als Signalzentrum auf den äußeren medialen Rand des Kortex beschränkt bleibt. Anhand von *Lhx2*-Chimären konnte mit sowohl *Lhx2*<sup>+</sup> als auch *Lhx2*<sup>-</sup> Zellen

bestätigt werden, dass *Lhx2* als ein klassisches Selektorgen für die kortikale Identität verantwortlich ist, indem es zum frühen Zeitpunkt der embryonalen Genese mögliche alternative Zellentwicklungen unterdrückt und gleichzeitig für die Entstehung des kortikalen Saums verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang konnte dem kortikalem Saum die Funktion eines Organisationszentrums für den Hippokampus zugesprochen werden (Mangale et al. 2008). Überraschenderweise steht *Lhx2*, obwohl es nicht im kortikalen Saum exprimiert wird, unter Kontrolle der Bmp signalreichen Dachplatte (Grove and Tole 1999; Monuki et al. 2001). *Foxg1* spielt ebenfalls eine Rolle für eine geordnete Ausbildung der Strukturen der dorsalen Mittellinie, so dass die *Foxg1*-homozygote Mausmutante einen zu *Lhx2*-homozygoten Mäusen ähnlichen Phänotyp zeigt. Die Strukturen des ventralen Telenzephalons zeigen sich ab der Entwicklung E10,5 mehr und mehr gestört als die des dorsalen Telenzephalons. Insbesondere zeigt sich ein Verlust der ganglionären Eminenz, während der Neokortex verkleinert erscheint und durch einen an Größe



zugenommenen Archikortex und kortikalen Saum verdrängt wird (Xuan et al. 1995). *Foxg1* ist somit in der Lage die Expression von Bmps und Fgf8 hoch- und runterregulieren zu können und nimmt dadurch indirekt Einfluss auf die Regionalisierung innerhalb des Telenzephalons ein (Shimamura and Rubenstein 1997; Dou et al. 1999; Storm et al. 2003; Martynoga et al. 2005). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass bei der Musterbildung im zerebralen Kortex sowohl die Signalmoleküle der Signalzentren als auch räumlich spezifischen Expression früher Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen. Beide Systeme treten miteinander in Wechselwirkung und verleihen so den Zellen des Telenzephalons ihre Positionsinformation, um letztendlich die verschiedenen Regionen des Telenzephalons auszubilden.

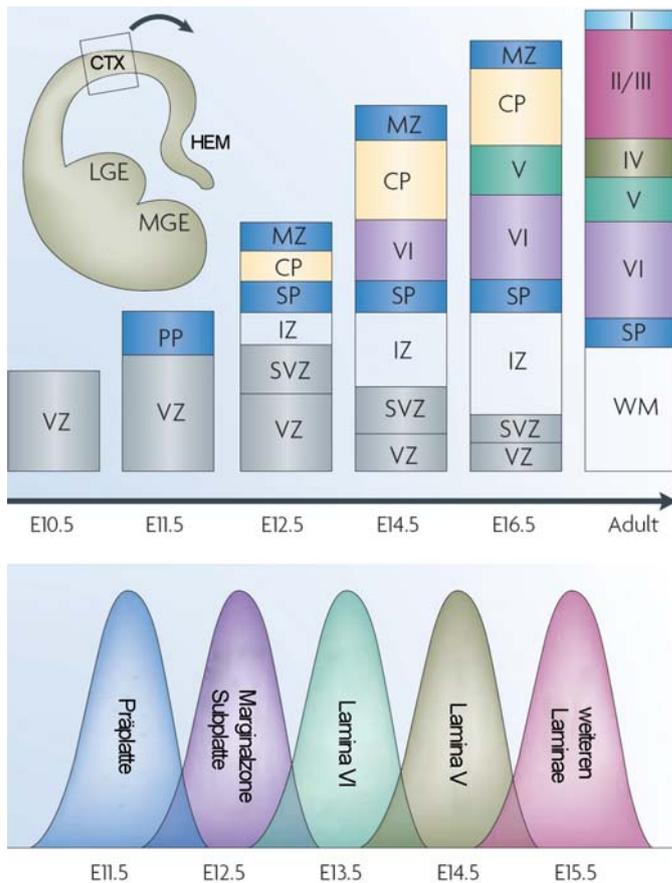
### 1.1.2 Neuronale Differenzierung des zerebralen Kortex

Zur Bewerkstellung aller kognitiven Leistungen im zerebralen Kortex, spielen zwei Klassen von Neuronen eine wichtige Rolle. Zum einen handelt es sich um die, dem ventralen Telenzephalon entstammenden Interneurone und zum anderen um die dem dorso-lateralen Telenzephalon entspringenden Projektionsneurone. Letztere verfügen über lange Axone die sich über weite Strecken ausdehnen und somit intrakortikale, subkortikale und subzerebrale Strukturen erreichen und diese miteinander verbinden. Die Information, sich in die entsprechenden Neuronensubtypen der einzelnen kortikalen Laminae zu entwickeln, erhalten die Vorläuferzellen entsprechend ihrer Lokalisation und der zeitlichen Expression von den bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren. Diese sind nicht nur für die gegenseitige Musterbildung und Kontrolle mit den beschriebenen Signalmolekülen verantwortlich, sondern auch für die Spezialisierung von neuronalen Vorläuferzellen, da sie sich bereits zur frühen Entwicklungszeit in der dorso-lateralen Wand der Ventrikularzone (VZ) befinden und auf diese Weise das Neuroepithelium beeinflussen. So konnten Studien an *Lhx2*-homozygoten Mäusen eine fast komplett fehlende Differenzierung der Vorläuferzellen in der, an Größe stark reduzierten, VZ zeigen. Gleichzeitig ist die Anzahl an kortikalen Präplattenneuronen ebenfalls stark erhöht (Bulchand et

al. 2001; Monuki et al. 2001). Ähnliche Beobachtungen ließen sich bei *Foxg1*-defizienten Mäusen feststellen. Diese zeigten ebenfalls einen Verlust von neokortikalen Vorläuferzellen, während sich die Vorläuferzellen des Archikortex und der kortikalen Hemregion uneingeschränkt ausbilden konnten (Dou et al. 1999; Muzio and Mallamaci 2005). So wird an diesen Beispielen ersichtlich, dass *Foxg1* ebenfalls in der Neurogenese als ein Hauptregulator im Telenzephalon angesehen werden kann, indem er die Proliferation über die Regulierung von *Fgf*-Signalen und die Differenzierung kortikaler Vorläufer über die Beeinflussung von *Bmp*-Signalen steuern kann (Martynoga et al. 2005).

### 1.1.3 Laminierung des zerebralen Kortex

Der zerebrale Kortex wird während der embryonalen Entwicklung in einer sechsschichtigen Anordnung angelegt (Rakic 1974) Jede dieser einzelnen Schichten besitzt ihre eigenen histologischen und funktionellen Eigenschaften mit identischen Neuronensubtypen, Genexpressionen und deren Projektionseigenschaften. Wenn diese gestört werden, kann es zu unterschiedlichen Syndromen wie Bewegungsstörungen, epileptischen Anfällen und mentaler Retardation kommen (Mischel et al. 1995; Olson and Walsh 2002). Für die Entstehung der einzelnen Schichten, findet während der frühen Entwicklung eine verstärkte Vermehrung neuroepithelialer Zellen in der dorso-lateralen Wand des Neuralrohrs statt. Diese neu entstandene Zellschicht liegt dem Ventrikel direkt an und wird dementsprechend als Ventrikularzone (VZ) bezeichnet. Dabei erscheinen aus der stark proliferierenden VZ in der Maus die ersten Projektionsneurone zum Zeitpunkt E10.5 und bilden die über der VZ liegende Präplatte (PP) aus, die später in eine weiter basal liegende Marginalzone (MZ) und eine darunter zum liegen kommende Subplatte (SP) geteilt wird. Zum Zeitpunkt E12.5 entsteht zwischen MZ und SP die kortikale Platte (CP), aus der sich später die entsprechenden Laminae II-VI bilden. Diese CP-Neurone setzen ihre Wanderung durch die gesamte Kortikalplatte bis unter die Marginalzone in einem sogenannten „inside-out“ Muster fort (Rakic 1974).



**Abb. 4:** Entwicklung der Architektur des zerebralen Kortex der Maus

Verdeutlicht die Entwicklung der sechs schichtigen Anordnung des Neokortex (CTX) mit der Aufspaltung der, durch erste Neurone gebildete, Präplatte (PP) in die Marginalzone (MZ) und Subplatte (SP) um E12.5. Die dazwischen liegende kortikale Platte (CP), wandelt sich in einem „inside-out“ Muster zu den Laminae II-VI aus. HEM, kortikaler Saum; LGE, laterale ganglionäre Eminenz; MGE, mediale ganglionäre Eminenz; E, Entwicklungstag; SVZ, Subventrikuläre Zone; IZ, Intermediale Zone; WM, weiße Zone; Entnommen und modifiziert aus O’Leary and Nakagawa (2002).

Das bedeutet, dass die neu entstandenen Neurone einer weiteren Lamina durch die bereits vorhandenen Laminae wandern müssen, um an ihren Zielort zu gelangen. Innerhalb dieses Prozesses spielt die PP und ihre Derivate eine bedeutende Rolle, indem sie die Morphologie radialer Gliafasern, die neuronale Migration, als auch die axonale Wegführung steuern können (Super et al. 1998). Studien deckten eine Reihe an Molekülen auf, die an diesem Laminierungsprozess beteiligt sind, wie z.B. *Reelin* (Rice et al. 1998; Rice and Curran 2001; Soriano and Del Rio 2005). Dieses Protein wird von Cajal-Retzius (CR) Neuronen, die sich in der Marginalzone des Neokortex befinden,

exprimiert und reguliert so die Migration und Positionierung postmitotischer Neurone. Fehlt das *Reelin*-Protein, wie in der *reeler*-Mutante, so sind die einzelnen Laminae in umgekehrter Reihenfolge angeordnet (Soriano and Del Rio 2005). Trotzdem besitzen die einzelnen Laminae bei falscher Anordnung nach wie vor ihre spezifischen Neuronensubtypen. Man geht bei der Ausbildung Lamina-spezifischer Neuronen von einem weiteren, bisher unbekanntem Mechanismus aus (Polleux et al. 1998; Tarabykin et al. 2001). Das menschliche *Reelin*-Gen stimmt mit dem Mausgen nahezu überein. Es befindet sich auf

Chromosomen 7q22 (DeSilva et al. 1997) und wird in Zusammenhang mit Lissencephaly gebracht (Hong et al. 2000). Einer Erkrankung, bei der das Gehirn glatt und frei von Windungen erscheint und bei der es zu motorischen Dysfunktionen, wie Schluckstörungen oder Epilepsien kommen kann (Ross et al. 2001; Chang et al. 2007).

So wird ersichtlich, dass auch bei dem Prozess der Laminierung, die bereits erwähnten Signalzentren als auch Transkriptionsfaktoren eine große Rolle spielen (Bohner et al. 1997). Beispielsweise ist *Pax6* an der Entstehung höher liegender Laminae wesentlich beteiligt, da es zunächst im Neuroepithelium der VZ stark exprimiert wird und so deren Proliferation beeinflusst, bevor es in den Zellen der Subventrikulären Zone (SVZ), unter aufkommen des T-box Transkriptionsfaktors *Tbr2*, in seiner Expression erlischt und somit die Entstehung der SVZ begünstigt (Caric et al. 1997; Land and Monaghan 2003; Schuurmans et al. 2004; Englund et al. 2005). Die SVZ bildet sich zum Zeitpunkt von E14.5 zu einer zusätzlichen, proliferativ hoch aktiven Schicht. Sie dient speziell, in Anlehnung an die VZ, der Produktion von Projektionsneuronen der höheren Laminae (Tarabykin et al. 2001; Nieto et al. 2004). So konnte unter Verlust von *Pax6* eine reduzierte Anzahl von *Tbr2* positiven Vorläuferzellen und Neuronen von höher angelegten Laminae beobachtet werden. Als möglicher Mechanismus wird die Beeinflussung von *Pax6* bei der symmetrischen gegen die asymmetrische Zellteilung diskutiert, da Vorläuferzellen *Pax6* homozygoter Mäuse eine vermehrte asymmetrische Zellteilung unter einer zunehmenden Abnahme *Cux2*-exprimierenden Zellen der SVZ zeigen (Nieto et al. 2004).

#### **1.1.4 Arealisierung des zerebralen Kortex**

Der adulte Neokortex ist in über hundert verschiedene tangentielle Areale unterteilt, die wiederum durch ihre unterschiedliche Architektur, Verteilung neuronaler Subtypen und axonalen Projektionen, unterschiedliche Funktionen wahrnehmen können (Grove and Fukuchi-Shimogori 2003; Hamasaki et al. 2004). Bei der Etablierung der kortikalen Areale durch zelluläre und molekulare Mechanismen haben sich zwei unterschiedliche Modelle etabliert. Zum einem

das „Protomap“ Model (Rakic 1988) und zum anderen das „Protocortex“ Model (Van der Loos and Woolsey 1973; O'Leary 1989). In Anlehnung an das erste Model, wird die Arealisierung durch molekulare Signale direkt aus der Ventrikularzone gesteuert und konnte zum einem mit Hilfe von Transplantationsversuchen von Zellen zum Zeitpunkt E10,5-12.5 unterschiedlicher Regionen des Telenzephalons bestätigt werden (Tole et al. 1997; Gitton et al. 1999; Tole and Grove 2001; Vyas et al. 2003). Zum anderen wurden Versuche mit *Mash1* und *Gbx2* Knockout-Mäusen unter der Beobachtung einer normalen Arealisierung durchgeführt, obwohl die Tiere einen Verlust der Thalamokortikalen Verbindung aufweisen (Miyashita-Lin et al. 1999; Nakagawa et al. 1999). Anders beim zweiten Model, spricht man der Ventrikularzone keine regulierende Rolle zu. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass die Arealisierung durch molekulare Signale aus subkortikalen Strukturen und deren Afferenzen an den Kortex gesteuert wird, zu denen ebenfalls der Thalamus gehört (Sur 1988; Schlaggar and O'Leary 1991). Heute lassen sich beide Modelle miteinander vereinigen. Es wird angenommen, dass während der frühen Entwicklung ohne angelegte thalamokortikale Verbindungen, die Arealisierung direkt über molekulare Signale aus der Ventrikularzone reguliert wird, während zum späteren Zeitpunkt der Thalamus hinzugezogen wird (Mallamaci and Stoykova 2006).

Bei der Etablierung der kortikalen Areale entlang der anterior-posterior Achse, haben sich die Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren *Emx2* und *Pax6* als primäre Regulatoren erwiesen (Bishop et al. 2000; Mallamaci et al. 2000; Bishop et al. 2002). *Emx2* und sein Gegenspieler *Pax6* werden in komplementären Gradienten in der Kortexanlage exprimiert, mit einer hohen *Pax6*-Expression am rostro-lateralen und hoher *Emx2*-Expression am kaudo-medialen Pol. Beiden Genen wird somit eine kortikale Arealisierungsfunktion entlang der antero-posterioren Achse zugesprochen. Mindestens ein funktionelles Allel eines dieser Gene muss vorliegen, um den zerebralen Kortex als auch dorsale Vorläuferzellen zu generieren (Muzio et al. 2002). In doppelt homozygoten Mäusen (*Emx2*<sup>-/-</sup>, *Pax6*<sup>Sey/Sey</sup>) wird der zerebrale Kortex durch Gewebe mit einer genetischen Ausstattung der Basalganglien ersetzt. Es

kommt zu einer Überexpression von *Nkx2.1* und *Dlx2* und lediglich sehr wenige Zellen in diesem Gewebe exprimieren dann noch Marker des zerebralen Kortex (Wilson and Rubenstein 2000; Muzio et al. 2002). Neben den Veränderungen Areal-spezifischer Marker, zeigt die Doppelmutante zudem Veränderungen in der Projektion von thalamokortikalen Axonen, die für den Relais von sensorischem, auditiven und somatischen Input an den Neokortex verantwortlich sind (Bishop et al. 2000; Mallamaci et al. 2000; Bishop et al. 2002). *Emx2*<sup>-/-</sup> Mutanten zeigen außerdem eine Verlagerung von *Coup-tf1* nach kaudal. *Coup-tf1* ist ein weiterer Transkriptionsfaktor der vor allem im kaudolateralen Kortex exprimiert wird (Mallamaci and Stoykova 2006). *Coup-tf1* gilt als molekularer Vermittler zwischen weiteren Transkriptionsfaktoren, die einen Einfluss auf kortikale Vorläuferzellen in der VZ nehmen. Es kommt unter Verlust von *Coup-tf1* zu einer deregulierten und verstreuten Expression areal-spezifischer Marker über den gesamten Kortex mit einem Zusammenlaufen der Projektionen von sowohl somatossensorischen als auch visuellen Afferenzen aus dem Thalamus in Richtung Kortex (Zhou et al. 2001).

## 1.2 Neurogenese im zentralen Nervensystem

### 1.2.1 Neokortikale Stamm- und Vorläuferzellen

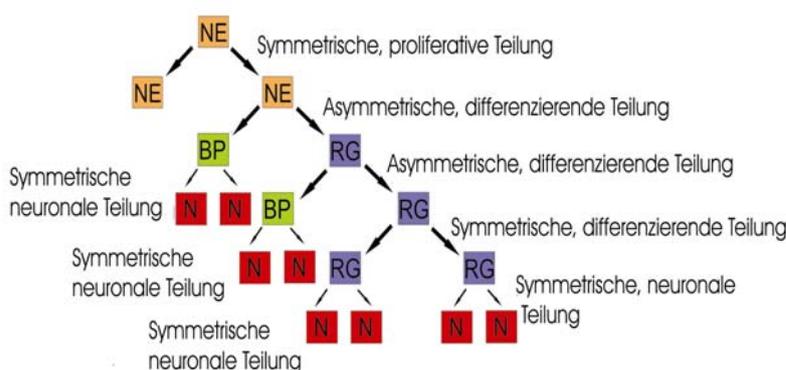
Bei der Entwicklung des menschlichen Gehirns, mit all seinen Regionen und spezialisierten Arealen, wird neokortikalen Stamm- und Vorläuferzellen ein besonderer Stellenwert zugesprochen. Diese werden in diesem Abschnitt näher beschrieben. Zunächst soll jedoch auf die Bedeutung der unterschiedlichen Arten von Stammzellen und deren Eigenschaften eingegangen werden.

Die Eizelle bis zum Achtzellstadium wird als totipotente Stammzelle bezeichnet, da noch keine der acht Zellen spezialisiert ist und für sich allein das Potenzial besitzt, sich zu einem kompletten Organismus entwickeln zu können. Abgrenzend unterscheidet man die pluripotenten Stammzellen oder auch embryonale Stammzellen, die aus dem Blastozystenstadium stammen und sich in nahezu alle Zelltypen der drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm und

Endoderm) differenzieren können. Weiterhin spricht man bei adulten Stammzellen von multipotenten Stammzellen, da sie sich im Vergleich zu embryonalen Stammzellen nicht mehr frei spezialisieren können. Die Aufgabe dieser adulten Stammzellen bzw. Vorläuferzellen besteht daher im Ersetzen vom zugrundegegangenen Gewebe, indem sie sich zu Zellen dieses Gewebes differenzieren.

Stammzellen zeichnen sich somit durch die beiden Eigenschaften aus, sich zum einen in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, was als Multipotenz bezeichnet wird. Zum anderen durch die Fähigkeit sich selbst zu erneuern, im Idealfall in einer unbegrenzten Anzahl (Anderson 2001; O'Shea 2004).

Diese Zellen sind in der Lage sich über unterschiedliche Arten der Zellteilung zu reproduzieren. Es wird zwischen symmetrischer und asymmetrischer Zellteilung unterschieden. Dabei entstehen durch eine symmetrische Zellteilung zwei zur Mutterzelle völlig identische Tochterzellen bzw. durch eine asymmetrische Zellteilung eine identische Tochterzelle und eine weitere sich von der Mutterzelle unterscheidende Vorläuferzelle. Es können aber auch durch eine symmetrische Zellteilung zwei identische, sich von der Mutterzelle unterscheidende ausdifferenzierte Tochterzellen entstehen. Die Tochterzellen können dann ihrerseits gewebespezifische Aufgaben erfüllen. Neben der



**Abb. 5:** Entwicklungsbaum der Neurogenese im zerebralen Kortex

Diese Grafik zeigt eine vereinfachte Darstellung der Beziehungsverhältnisse zwischen neuroepithelialen Zellen (NE), radialen Gliazellen (RG) und basalen Vorläuferzellen, die als Quelle neuronaler Zellen gelten. Die verschiedenen Teilungsarten werden mitberücksichtigt. Entnommen und modifiziert aus Götz & Huttner, 2005.

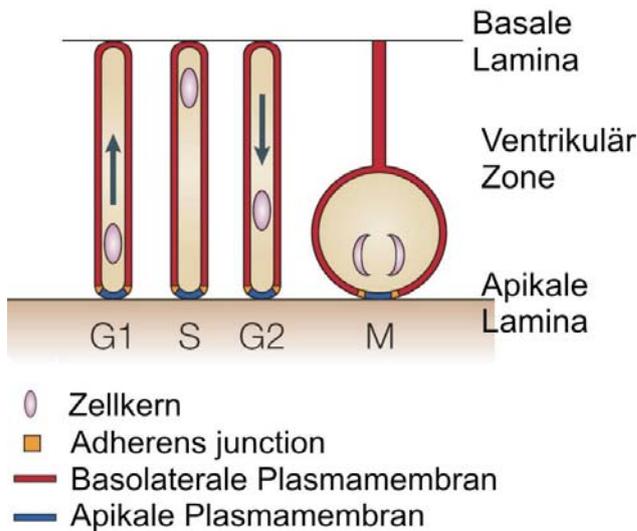
Zellpolarität und der Zellzykluslänge erscheint auch die Orientierung der Teilungsspindel eine wichtige Rolle zu spielen, ob eine Tochterzelle weiter als Stammzelle agiert oder zu einer in ihrer Potenz eingeschränkten

Vorläuferzelle oder postmitotischen Zelle ausdifferenziert (Gotz and Huttner 2005).

Ein lang etabliertes Model, welches davon ausging dass Neurone und Gliazellen im ZNS ihren Ursprung aus zwei unterschiedlichen Quellen beziehen, konnte durch Studien revidiert werden. Es konnte stattdessen bewiesen werden, dass identische Vorläuferzellen des ZNS zunächst Neurone und später Gliazellen produzieren (Culican et al. 1990; McKay 1997; Alvarez-Buylla et al. 2001). Dieser Prozess, bei dem aus undifferenzierten Zellen Neurone entstehen, wird als Neurogenese bezeichnet und die Bildung von Gliazellen entsprechend als Gliogenese. Somit besteht die VZ aus einem Mosaik unterschiedlich proliferierender Zellen, die für die Entstehung des zerebralen Kortex verantwortlich gemacht werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und in ihrer Potenz, sich in Gliazellen und unterschiedliche Subtypen von Neuronen zu entwickeln (McConnell 1995). Dabei sind die neokortikalen Stamm- und Vorläuferzellen durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, ihrer Lokalisation im Kortex, der Zellpolarität und der interkinetischen Zellkernwanderung voneinander abzugrenzen. In der Literatur wird von drei Stamm- und Vorläufertypen berichtet, die für die Neurogenese im Neokortex eine Rolle spielen (Hartfuss et al. 2001; Gotz and Huttner 2005).

### 1.2.2 Neuroepitheliale Zellen

Neuroepitheliale Zellen (NEZ) befinden sich nach dem Zusammenschluss des Neural-rohrs in der proliferativen VZ und bilden dort eine einreihige Zellschicht mit stark epithelialen Charakter aus, das als Neuro-epithelium bezeichnet wird (Malatesta et al. 2003). Diese Zellen erstrecken sich von der apikalen bis zur basalen Seite der VZ und sind über Tight junctions und Adherens junctions an der apikalen Seite mit einander fest verankert (Huttner and Brand 1997). Sie können im Telenzephalon der Maus ab E9/E10 anhand der Expression des intermedialen Filaments *Nestin* und dem ihm verwandten Antigen, das durch den Antikörper RC2 erkannt wird, identifiziert werden (Frederiksen and McKay



**Abb. 6:** Neuroepithelium

Die neuroepitheliale Zelle zeigt eine interkinetische Zellkernwanderung über die gesamte apikal-basale Länge, mit der G1-Phase am apikalen Ende, der S-Phase auf der basalen Seite und einer Rückkehr des Zellkerns zur apikalen Seite für die G2-Phase und die mitotische Zellteilung. Entnommen und modifiziert aus Götz und Huttner 2005.

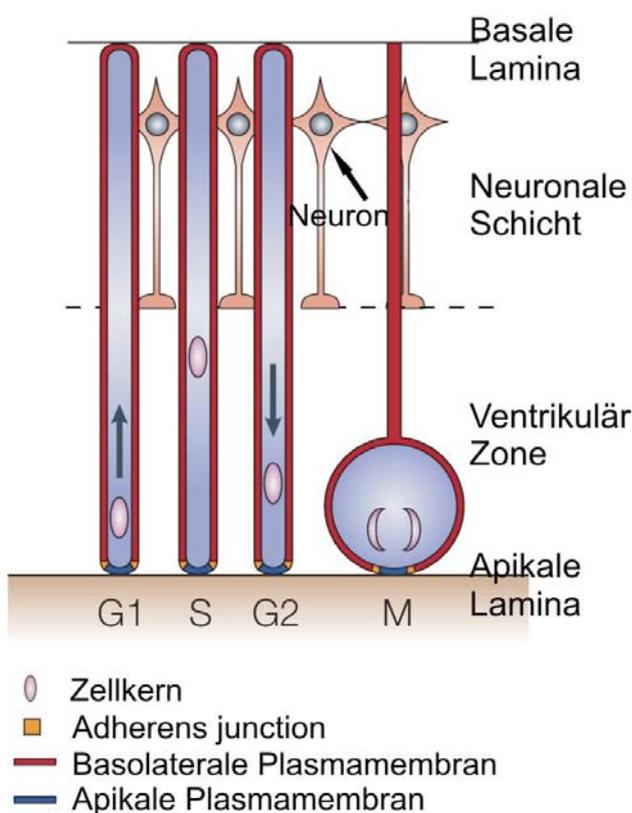
1988; Edwards et al. 1990). Interessanterweise zeigen neuroepitheliale Zellen eine interkinetische Zellkernwanderung über die gesamte Zytoplasmalänge, bei der sich der Zellkern während der G1-Phase von apikal nach basal bewegt, um während der S-Phase dort zu verweilen. Schließlich wandert der Zellkern in der G2-Phase zurück nach apikal, wo die Mitose stattfindet (Götz and Huttner 2005).

Während der frühen Hirnentwicklung, vor dem Beginn der Neurogenese, durchlaufen neuro-

epitheliale Zellen zunächst bevorzugt symmetrische Zellteilungen, so dass ihre Zahl stark zunimmt (Rakic 1995). Zu Beginn der Neurogenese vollführen sie unter einer Reduzierung ihrer apikalen/basalen Zellpolarität und der Mindereexpression von *Occludin*, einem Bestandteil von Tight Junctions, vermehrt asymmetrische Zellteilungen (Aaku-Saraste et al. 1996; Kosodo et al. 2004). Mit Hilfe von Zellkulturen, retroviralen Vektormarkierungen und *in vivo* Experimenten konnten Studien den neuroepithelialen Zellen die Fähigkeit nachweisen, sich in unterschiedliche Zelllinien entwickeln zu können (Frantz and McConnell 1996; Qian et al. 2000; McCarthy et al. 2001). Hierbei können durch asymmetrische Zellteilungen entweder ein postmitotisches Neuron und eine identische Tochterzelle oder eine weiter entwickelte und in ihrer Potenz eingeschränkte Vorläuferzelle, die sogenannte radiale Gliazelle (RGC) oder in einer geringen Zahl basale Vorläuferzellen mit einer identischen Tochterzelle entstehen (Huttner and Brand 1997; Kriegstein and Götz 2003). Somit ist ersichtlich, dass die zunächst als einzig im Neuralrohr vorkommenden neuroepithelialen Zellen entweder direkt oder indirekt für die Entstehung aller

Neurone und Gliazellen des zerebralen Kortex verantwortlich sind, wobei die Anzahl direkt entstehender postmitotischer Neurone durch die neuroepitheliale Zellen wiederum sehr gering ist und während der Neurogenese zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Malatesta et al. 2003; Anthony et al. 2004).

### 1.2.3 Radiale Gliazellen



**Abb. 7:** Radiale Gliazelle

Die radiale Gliazelle erstreckt sich mit langen Fortläufern über den gesamten Kortex von der apikalen bis zur basalen Seite. Entlang dieser wandern die neu entstandenen Neurone in die neuronale Zellschicht. Der Zellkern zeigt eine interkinetische Zellkernwanderung bis an die Grenze der Ventrikulären Zone mit der G1-Phase am apikalen Ende. Die S-Phase findet auf Höhe der neuronalen Schicht statt und der Zellkern bewegt sich für die G2-Phase und die mitotische Zellteilung zurück an die apikale Seite. Entnommen und modifiziert aus Götz und Huttner 2005.

Bereits kurz nach dem Beginn der Neurogenese entsteht ebenfalls in der VZ ein neuer Zelltyp, die radiale Gliazelle (RGC), die ihren Ursprung in der asymmetrischen Zellteilung der neuroepithelialen Zelle hat und mit dieser noch gemeinsame Marker wie *Nestin* und *RC2* exprimiert. Zu unterscheiden sind RGC vom Neuroepithelium durch ihre Astrozyten ähnliche Eigenschaften, wie z.B. durch das Erscheinen von Glykogengranulae und dem Expressieren von Astrozyten spezifischer Marker. Dazu zählen zum einen das brain-lipid-binding protein *BLBP* (Feng et al. 1994; Hartfuss et al. 2001), der astrozytäre Glutamat-transporter *GLAST* (Malatesta et al. 2000), das kalziumbindende Protein *S100β* (Vives et al. 2003),

das intermediäre Filament *Vimentin* (Schnitzer et al. 1981) und das

Adhäsionsprotein *Tenascin-C* (Gotz et al. 1997). Diese erscheinen in einer zeitliche Korrelation zueinander, so dass darüber die Möglichkeit besteht, ältere von jüngeren RGC zu unterscheiden, da zuerst *BLBP* und im später Verlauf der astrozytenspezifische Glutamatransporter *GLAST* und *vimentin* exprimiert werden (Anthony et al. 2004). Mit Hilfe von Untersuchungen zu Koexpressionen der Marker RC2, BLBP und GLAST konnte gezeigt werden, dass es sich je nach Region und Stadium der Entwicklung um andere Subpopulationen von RGCs handelt (Hartfuss et al. 2001). Es wird davon ausgegangen, dass die Expressionsveränderungen mit einer zunehmenden Einschränkung in der Differenzierungspotenz verknüpft sind (Calegari et al. 2005). Ergänzend ist anzumerken, dass bis heute keine Marker bekannt sind, mit denen direkt radiale Gliazellen von Astrozyten unterschieden werden können. Zusätzlich bieten radiale Gliazellen im Bezug auf ihre Zytokinetik ebenfalls eine weitere Besonderheit, denn anders als das Neuroepithelium sind die radialen Gliazellen nur über Adherens junctions mit der apikalen Seite der VZ verbunden und unterlaufen ähnlich den neuroepithelialen Zellen zwar auch eine interkinetische Zellkernwanderung, jedoch nicht über das gesamte Zellzytoplasma hinweg. Die Zellkernwanderung beschränkt sich von der apikalen bis an die basale Seite der VZ, wo der Kern bis einschließlich der S-Phase verbleibt und für die abzulaufende Mitose an die apikale Seite zurückkehrt. Die charakteristischen radial ausgerichteten, bis an die basal liegende MZ reichenden Zellfortläufer, werden bei der Zellkernwanderung ausgelassen (Gotz and Huttner 2005). Diese gelten vielmehr neu entstanden Neuronen als eine Art Leitstrang, an dem sie sich bis an ihren Zielort, den entsprechenden Laminae, entlang bewegen können (Rakic 1972; Hatten 1999). Nach Abschluss der Neurogenese und der Neuronenwanderung werden die RGCs in den meisten Hirnregionen zu Astrozyten und gehen somit verloren, weshalb ihnen in der Vergangenheit nur eine Funktion als Leitstruktur und Quelle glialer Zellen zugesprochen wurde (Cameron and Rakic 1991). Neue Studien konnten mit Hilfe von Zellkulturen, *in vivo* Zellimaging und genetischen Experimenten den Beweis erbringen, dass RGCs in vielen Regionen des ZNS direkt über asymmetrische Zellteilungen als Neuronen bildende Vorläuferzellen fungieren. Dies gilt auch für den dorsalen

Telenzephalon. Im Gegensatz dazu sind sie im ventralen Telenzephalon über die Bildung von basalen Vorläuferzellen indirekt an der Neuronenentstehung beteiligt (Malatesta et al. 2000; Noctor et al. 2001; Noctor et al. 2004). So war es mit Hilfe Fluoreszenz markierter RGC möglich, diese zu isolieren und zu kultivieren. Dabei entwickelten sich Klone, die sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Zellen enthielten. Die Zusammensetzung der Klone war vom Entwicklungsstadium abhängig, in dem die Zellen entnommen wurden. Entsprechend der Abfolge *in vivo*, konnten zum Zeitpunkt E14-16, zu dem im Kortex hauptsächlich Neurone generiert werden, vermehrt Neurone detektiert werden. Umgekehrt waren zum Zeitpunkt E18, in dem die Gliogenese einsetzt, hauptsächlich Gliazellen zu finden (Malatesta et al. 2000). Durch diese neuen Beobachtungen und die bestehenden molekularen Ähnlichkeiten, können RGC als eine in ihrer Produktion von weiteren Zelllinien eingeschränkte Vorläuferzelle gesehen werden, die schon im frühen Verlauf der Neurogenese die Produktion von Neuronen übernimmt und dadurch die neuroepithelialen Zellen in dieser Funktion ersetzt (Malatesta et al. 2003; Anthony et al. 2004).

#### 1.2.4 Basale Vorläuferzellen

Bereits zum Zeitpunkt E9,5 im Telenzephalon der Maus, am frühen Beginn der Neurogenese im ZNS, kommt es neben dem Erscheinen der RGCs zur Entstehung eines weiteren Vorläufersubtyp, der sogenannten basalen Vorläuferzelle (BVZ). Als Ursprungszellen dienen ihr sowohl die neuroepithelialen Zellen, als auch zum späteren Zeitpunkt die RGC (Haubensak et al. 2004; Miyata et al. 2004). Basale Vorläuferzellen besitzen zunächst noch Kontakt zur apikalen Seite der VZ. Doch sobald der Zellkern für die bevorstehende S-Phase basal gewandert ist, löst sich der apikale Zellkontakt und die Mitose findet, im Gegensatz zur den neuroepithelialen Zellen und den RGC, auf der basalen Seite der VZ statt. Ihre Lokalisation ist während der Neurogenese auf die stark proliferierende SVZ konzentriert, in der sie nur ein bis zwei proliferative Zellzyklen durchlaufen, um durch eine symmetrische Zellteilung zwei Neurone entstehen zu lassen (Miyata et al. 2004; Noctor et al.



<b>Eigenschaften</b>	<b>NEZ</b>	<b>RGC</b>	<b>BVZ</b>
Interkinetische Zellkernwanderung	+	+	-
Apikal-basale Polarität	+	+/-	-
Adherens junctions	+	+	-
Gap junctions	+	+	+/-
Tight junctions	+/-	-	-
Kontakt zur Basallamina	+	+	+/-
Nestin Expression	+	+	+
RC2 Expression	+	+	-
BLBP/GLAST/Vimentin Expression	-	+	-
Tbr2 Expression	-	-	+

**Tabelle Nr.1** Zusammenfassung wichtiger Unterscheidungskriterien zwischen dem Neuroepithelium (NEZ), radialen Gliazellen (RGC) und basalen Vorläuferzellen (BVZ).

### 1.3 Das *Gli3*-Gen und seine Rolle bei der Entwicklung des dorsalen Telenzephalons

Bei den Mitgliedern der *Gli*-Genfamilie handelt es sich um Zink-Finger-Transkriptionsfaktor kodierende Gene, die im Shh-Signalweg involviert und homolog zu *Cubitus interruptus* (Ci) in *Drosophila melanogaster* sind (Kalderon 1997; Ruiz i Altaba 1997). Zinkfinger sind DNA- und Proteinbindende Strukturen, die durch ein zentrales, in den meisten Fällen von zwei Cystein- und zwei Histidinresten (C2 /H2-Finger) gebundenes,  $Zn^{2+}$ -Ion gebildet werden und im Falle von der *Gli*-Transkriptionsfaktoren eine identische 9-bp DNA-Sequenz (-GGGTGGTCC-) erkennen, über die Zielgene reguliert werden können (Ruppert et al. 1990; Vortkamp et al. 1995). Die *Gli*-Genfamilie wird früh im Verlauf der Embryogenese in einem medial-lateralen Expressionsmuster in der Neuralplatte stark und im Neuralrohr schwach exprimiert. *Gli1* wird eine ventrale Lokalisierung im Telenzephalon zugewiesen, während *Gli2* und *Gli3* Transkripte vermehrt im dorsalen Telenzephalon vorgefunden werden (Grove et al. 1998). *Gli3* kommt unter der Abwesenheit von Shh in einer verkürzten Form vor und unterdrückt so weiter Transkripte von Shh im Zellkern. Ist Shh hingegen präsent, kommt es zur Transkription des *Gli3*-Proteins in seiner vollen Länge und dient so als Aktivator weiterer Transkriptionsprodukte (Ruiz i Altaba 1999). Für die Überführung vom Zytoplasma in den Zellkern soll vor allem die Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung und die dann mögliche proteolytische Spaltung verantwortlich sein (Vortkamp et al. 1995; Price and Kalderon 1999; Wang et al. 2000). Auf diese Weise ist der *Gli/Shh*-Signalweg für eine Reihe wichtiger Prozesse während der Entwicklung verantwortlich und spielt bei der Spezifizierung vieler Systeme und Organe eine wichtige Rolle, so z.B. des Neuralrohrs, der Schädelgesichtsstrukturen, den Extremitäten oder der Ausbildung der Lungen (Ding et al. 1998; te Welscher et al. 2002). Untersuchungen an *Gli1*<sup>-/-</sup> und *Gli2*<sup>-/-</sup> Mutanten zeigten Defekte bei der Entwicklung des kaudalen Neuralrohrs. Das Prosenzephalon blieb jedoch unbeeinflusst (Ding et al. 1998; Matisse et al. 1998).

Der Phänotyp der *Gli3*-Mutante *extra-toes* ( $Xt^J$ ), einer Mausmutante mit einer 51,5kb großen Deletion am 3'-Ende des Zink-Finger kodierenden Bereichs, gestaltet sich jedoch anders. Durch die Deletion kommt es zur Bildung einer Fusions-mRNA, die bis zur ersten Hälfte des ersten *Gli3* Zink-Fingers (1670 bp) kodiert und danach durch 293 bp eines bisher unbekanntes Gens verlängert wird (Büscher et al. 1998; Maynard et al. 2002). Während heterozygote Tiere bis auf eine mäßig ausgeprägte Polydaktylie unauffällig bleiben und eine *Gli3*-Expression von 50% aufweisen, zeigen homozygote Tiere Poly- und Syndaktylie aller Pfoten mit einer prä- und postaxialen Erweiterung der Pfoten mit bis zu 8 Zehen. Weitere Studien um die  $Xt^J$ -Mutante haben, neben dem Vorkommen einer gestörten Sinnesorgan- und Gesichtsschädelentwicklung, zusätzlich eine Ausbildung von Ödemen, eine Störung der Gehirnentwicklung und eine teilweise vorkommenden Exenzephalie beobachtet. Außerdem zeigt sich auch der Verlust der Riechkolben und der dorso-medialen Strukturen des Telenzephalons, einschließlich der Hippokampusanlage, des kortikalen Saums und des Plexus choroideus der beiden Seitenventrikel (Franz 1994; Grove et al. 1998; Theil et al. 1999).

Interessanterweise fehlt dieser  $XtJ/XtJ$ -Mutante die Expression von *Wnt*- und *Bmp*-Proteinen im dorso-medialen Telenzephalon, während in der Ventrikularzone eine gesteigerte ektopische Expression von *Wnt7b* zu beobachten ist (Grove et al. 1998; Theil et al. 1999; Theil et al. 2002; Theil 2005). Gleichzeitig ist in der  $Xt^J$ -Mutante eine Überexpression von *Fgf8* in der Kommissurenplatte zu verzeichnen (Theil et al. 1999; Aoto et al. 2002; Kuschel et al. 2003). Diese starke Überexpression von *Fgf8* zusammen mit dem Verlust der Expression von *Bmps* und *Wnts* wird als Hauptgrund für die vorliegende Ventralisierung des dorsalen Telenzephalons in betracht gezogen (Kuschel et al. 2003). Als ein weiterer Hinweis auf den komplexen Einbezug des *Gli3*-Gens in die Entwicklung des dorsalen Telenzephalons konnte eine starke Reduzierung der *Emx2*-Expression und der komplette Verlust der *Emx1*-Expression aufgezeigt werden (Theil et al. 1999; Tole et al. 2000). Dabei kommt es zu keiner Grenzbildung zwischen Dienzephalon und Telenzephalon mit einer gleichzeitigen Größenreduktion des Neocortex (Theil et al. 1999; Fotaki et al.

2006). Die Untergliederung des Telenzephalons in das Pallium und die basalen Ganglien ist hingegen nicht gestört, was sich durch deutlich abgrenzbare *Pax6* und *Dlx2* Expressionsdomänen zeigen ließ (Theil et al. 1999).

Die *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>*-Mutante weist außerdem eine gestörte Differenzierung der Präplatte in die sogenannte Marginalzone (MZ), die kortikale Platte (CP) und die Subplatte (SP) auf (Theil 2005), welche als ein Gerüst für die späteren sechs Laminae dienen. In der Mutante organisieren sich die schichtzugehörigen Neurone wellenartig in Klumpen und die Anzahl von Cajal-Retzius Zellen zeigt sich vermindert. Daneben finden sich in den *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>* Embryonen gravierende Abweichungen in der Organisation des Neuroepithels, mit ektopischen Mitosen, einer veränderten Zellpolarität sowie gestörter Ausbildung von Adhärenz Junctions (Theil 2005).

Die zentrale Bedeutung des Shh-Signalweges lässt sich somit nicht allein durch die evolutionäre Konservierung der einzelnen Komponenten und der Mechanismen der Signalübertragung verdeutlichen, sondern auch durch eine Vielzahl von beschriebenen Mutationen. Entsprechende Mutanten sind in allen Modellorganismen in ihrer Entwicklung schwer betroffen und finden teilweise ihre Entsprechungen in einer Vielzahl verschiedener menschlicher Erkrankungen wieder.

#### **1.4. Gemeinsame durch Mutationen im *Gli3*-Gen verursachte Krankheiten**

Neben den Beobachtungen an Mausmutanten für das *Gli3*-Gen, können auch am Menschen charakteristische Veränderungen im Bezug auf Mutationen im *Gli3*-Gen festgestellt werden. Das humane *Gli3*-Gen befindet sich auf Chromosom 7p13 und wird von einer 240 kb langen Sequenz kodiert. Die 15 Exone des *Gli3*-Gens werden in eine 8,5 kb lange mRNA transkribiert, die für ein Protein mit 1580 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 190 kD kodiert (Ruppert et al. 1990; Vortkamp et al. 1995). Zurzeit sind vier autosomal-dominante und ein autosomal-rezessives Krankheitsbild mit unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung bekannt, die durch Mutationen im humanen *Gli3*-

Gen begründet sind. Es handelt sich hierbei um das *Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom* [GCPS] (Vortkamp et al. 1991), das *Pallister-Hall-Syndrom* [PHS] (Kang et al. 1997), das *Acrocallosal-Syndrom* [ACS] (Schinzel 1979), die *Postaxiale Polydaktylie Typ A* [PAP-A] (Radhakrishna et al. 1997) und die *Präaxiale Polydaktylie Typ IV* [PPD IV] (Radhakrishna et al. 1999). Diese genannten Krankheiten haben nur wenige phänotypische Gemeinsamkeiten, sodass bisher eine genetische Verwandtschaft als unwahrscheinlich galt. Lediglich die Fehlbildungen der Extremitäten, speziell die Polydaktylie, ist Bestandteil aller dieser Syndrome. Erschwerend kommt hinzu, dass zwischen den betroffenen Familien sehr variable Ausbildungen klinischer Symptome vorkommen und die unspezifische Häufigkeit der Polydaktylie in über 25 weiteren Syndromen mit einer unspezifischen Häufigkeit des Hypertelorismus in über 100 weiteren Syndromen beobachtet wird (Winter and Tickle 1993; Biesecker 2002). Aufgrund dieser fehlenden Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und der unklaren Grenzen der phänotypischen Charakterisierung wurde vorgeschlagen, alle mit *Gli3*-Mutationen assoziierten Syndrome als *Gli3* Morphopathien zu bezeichnen (Radhakrishna et al. 1999). So konnte bei GCPS und PHS beobachtet werden, dass diese zwei unterschiedliche Phänotypen auf verschiedene Mutationsorte und -arten innerhalb des *Gli3*-Gens zurückzuführen sind. Erstens, ist die Art der Mutation des *Gli3*-Gens von GCPS zu PHS unterschiedlich. Bei GCPS handelt es sich um Translokationen, große Deletionen, Frameshift-, Missense- und Nonsense-Mutationen. Im Gegensatz dazu konnten bei PHS nur Frameshift- und Nonsensemutationen festgestellt werden (Johnston et al. 2005). Zweitens konnte eine Positionsabhängigkeit der Frameshift-Mutationen festgestellt werden. So bewirken Mutationen am 5'-Ende oder im Zink-Finger kodierenden Bereich ein dem GCPS zugeordnetes Phänotyp, während Mutationen am 3'-Ende oder des mittleren Drittel für den Zink-Finger kodierenden Bereich das dem PHS zugeordnete Phänotyp auslösen (Shin et al. 1999). Trotz dieser Erkenntnisse können bis heute nicht alle variablen Expressionen des Phänotyps erklärt werden.

Zusätzlich werden zu *Gli3* benachbarte Gene für die klinische Überschneidung zwischen GCPS und ACS für die Überlagerung unterschiedlicher Phänotypen

verantwortlich gemacht (Kroisel et al. 2001). Dieses Krankheitsbild wird als „GCPS contiguous gene syndrome“ (GCPS-CGS) bezeichnet und kann somit von anderen isolierten Syndromen unterschieden werden (Johnston et al. 2003). Eine Phänotyp-Vorhersage ist daher zurzeit aufgrund der Lage der Mutationen nicht möglich.

#### **1.4.1 Das Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom (GCPS, OMIM 175700)**

Das Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Krankheit, die sich durch Schädel- und Gesichtsdysmorphien, kombiniert mit Fehlbildungen der Extremitäten, auszeichnet. Die Diagnostik wird durch eine große Variabilität der Symptome, die sowohl inter- als auch intrafamiliär stark schwanken, erschwert. Zusätzlich können weitere Symptome wie Hernien, erhöhtes Knochenalter oder Entwicklungsstörungen des ZNS, wie Hypoplasie oder Agenesie des Corpus callosum auftreten. Begleitet werden diese Fehlbildungen oft mit einer reduzierten geistigen und mentalen Intelligenz (Duncan et al. 1979; Baraitser et al. 1983; Biesecker 2008). Dabei existieren für diesen Symptomkomplex, der erstmals 1926 vom schottischen Arzt David M. Greig beschrieben wurde, bis heute keine einheitlichen diagnostischen Kriterien, sondern vom National Institutes of Health (NIH) erstellte Richtlinien zur klinischen Beschreibung. Der beobachtete Hypertelorismus wird als eine Schädelanomalie mit vergrößertem Augenabstand und einem verbreiteten Nasenrücken charakterisiert. Von einer Makrozephalie wird gesprochen, wenn eine Überschreitung der 97. Perzentile des occipitofrontalen Kopfumfangs vorliegt. Weiterhin findet sich eine Syndaktylie vermehrt an dem 1. und 2. bzw. dem 3. und 4. Finger der Hand. An den Füßen sind meist die ersten drei Zehen betroffen. Dabei sind die Phalangen zusammengewachsen, wobei zwischen einer bindegewebigen und knöchernen Syndaktylie unterschieden werden kann. Die *Polydaktylie* wird hingegen gehäuft präaxial am Fuß beobachtet und postaxial an den Händen, wobei zwischen einem funktionstüchtigen extra Finger bzw. extra Zeh (Typ A) und einem funktionslosen häutigen Anhängsels (Typ B) unterschieden wird (Johnston et al. 2005; Biesecker 2008)

#### 1.4.2 Das Pallister-Hall-Syndrom (PHS, OMIM 146510)

Beim Pallister-Hall-Syndrom, welches das erste Mal 1980 von (Hall et al. 1980) an sechs Neugeborenen beschrieben wurde, handelt es sich ebenfalls um einen seltenen, autosomal-dominant vererbten Fehlbildungskomplex. Anhand genomweiter Analysen wurden Mutationen im *Gli3*-Gen als mögliche Ursache für das PHS angenommen und weiter untersucht, so dass zum einen Leserastermutationen des Zink-Finger Gens und diverse weitere Mutationen im *Gli3*-Gen für die Ausbildung eines PHS-Phänotyps verantwortlich gemacht werden konnten (Kang et al. 1997; Radhakrishna et al. 1999).

Die einzige symptomatische Gemeinsamkeit von PHS und GCPS liegt in einer zu beobachtenden *Polydaktylie*, die jedoch beim PHS typischerweise zentral oder postaxial zu finden ist und sich durch einen zusätzlich ausgebildeten Finger oder Zehe äußert. Zur weiteren Differentialdiagnose von PHS dient das sehr spezifische Merkmal einer zu 2/3 gespaltenen Epiglottis oder das *Hypothalamische Hamartom*, einer während der Embryonalentwicklung entstehenden tumorartigen Struktur im Hypothalamus, die nur selten maligne entartet. Die klinische Manifestation kann von symptomlos bis hin zu neurologischen Ausfällen, in Form von Epilepsien, reichen. Ergänzend können weitere Fehlbildungen in Form von Segmentationsstörungen der Lunge, Nierenmissbildungen mit ektopischen Uretermündungen und endokrine Störungen beobachtet werden. Die Varianz der Ausprägung ist jedoch auch bei PHS sehr unterschiedlich und kann zwischen einer milden bis hin zu einer letalen Form reichen (Kang et al. 1997; Johnston et al. 2005).

### 1.4.3 Acrocallosal-Syndrom (ACS, OMIM 200990)

Das Acrocallosal-Syndrom (ACS) ist eine seltene autosomal-rezessive Krankheit, die 1979 zum ersten Mal an einem vier Jahre alten Jungen beschrieben wurde (Schinzel 1979). Sie ist charakterisiert durch eine postaxiale Polydaktylie, Halluxduplikationen, Makrozephalie und den Verlust des Corpus callosum, einer Faserverbindung zwischen den beiden Hirnhemisphären. Meistens wird das ACS mit einer geistigen Unterentwicklung und weiteren Entwicklungsverzögerungen begleitet. Dabei wurde das ACS anfänglich nicht mit Mutationen im *Gli3*-Gen in Verbindung gebracht (Brueton et al. 1992), bis durch weitere Fallstudien ein Basenaustausch im letzten Exon von *Gli3* festgestellt und die Ausprägung eines ACS mit *Gli3* als ursächlich gezeigt wurde (Elson et al. 2002). Zusätzlich konnten bei weiteren Untersuchungen von 34 Patienten mit der Diagnose von GCPS, 7 als ACS-Patienten ausgemacht werden die gleichzeitig eine Deletionen im *Gli3*-Gen besaßen. Zeigten sich Deletionen die größer als 2 Megabasen waren, sprechen die Autoren von GCPS-CGS (Johnston et al. 2003). Darüber hinaus gibt es einen Bericht über eine Punktdeletion im *Gli3*-Gen, die ebenfalls zu ACS führt (Biesecker 2006).

### 1.4.4 Die Postaxiale Polydaktylie (PAP; MIM 174200)

Die Postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A) folgt einem autosomal-dominanten Erbgang. Die beiden Varianten (PAP-A/B) finden sich sowohl isoliert als auch kombiniert an Händen und Füßen. Kennzeichnend ist die Ausbildung eines weiteren kleinen Fingers bzw. einer weiteren kleinen Zehe. Im Gegensatz zu Typ A, bei dem ein funktionstüchtiger Finger/Zehe ausgebildet ist, kommt es im Fall der PAP-B lediglich zur Ausbildung eines postaxialen Hautanhängsels ohne Skelettelementen. Die Entdeckung von Mutationen im *Gli3*-Gen bei der Untersuchung einer Familie mit 15 betroffenen Individuen bestätigte schließlich *Gli3* als krankheitsverursachendes Gen (Radhakrishna et al. 1997). Einige Patienten bzw. Familien, in denen heterozygot eine *Gli3*-Mutation vorlag, zeigten Charakteristika von Typ A und B und wurden deshalb als Typ A/B

klassifiziert. In einer derartigen Familie mit verschiedenen Formen der Postaxialen Polydaktylie konnten zwei unterschiedliche Mutationen, bei denen jeweils ein Aminosäureaustausch stattfand, in *Gli3* identifiziert werden, die zu einem vorzeitigen Abbruch des Proteins führen bzw. eine hochkonservierte Aminosäure in der ersten Postzinkfinger-Domäne des Proteins verändern (Radhakrishna et al. 1999).

#### 1.4.5 Die Präaxiale Polydaktylie Typ IV (PPD-IV; MIM 174700)

Die Präaxiale Polydaktylie Typ IV folgt einem autosomal-dominanten Erbgang und ist durch Polydaktylien und Syndaktylien charakterisiert. Darunter wird das Vorhandensein eines extra Fingers bzw. einer extra Zehe auf der Seite des Daumens/Großzehe verstanden. Die Hände zeigen dabei eine nur schwach ausgeprägte Duplikation des Daumens und Syndaktylie zwischen den Fingern 3 und 4. Die Füße sind schwerer betroffen und zeigen vollständige Duplikationen des ersten und auch des zweiten Zehs und Syndaktylie zwischen allen Zehen. Untersuchungen Betroffener konnten das Vorliegen einer Leseraster-verschiebung im *Gli3*-Gen und einem damit verfrühten Syntheseabbruch des Proteins mit der präaxialen Polydaktylie in Verbindung bringen (Radhakrishna et al. 1999).

Manifestation	GCPS	PHS	ACS	PAP-A/B	PAP-IV	GCPS-CGS
Präaxiale Polydaktylie	+++		+++		+++	+++
Kutane Syndaktylie	+++		+++		++	+++
Ossäre Syndaktylie	++		+++		++	++
Makrozephalie	+++		+++			++
Hypertelorismus	++		+++			++
Geistige Unterentwicklung	+	+	+++			+++
Körpergröße reduziert		+	++			++
Postaxiale Polydaktylie	++	++	++	+++		++
Zentrale Polydaktylie		+++				
Hypothalamisches Hamartom		+++				
Gespaltene Epiglottis		++				

**Tabelle Nr.2** Zusammenfassung der klinischen Zeichen der mit *Gli3*-assoziierten Krankheiten; GCPS (Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom), PHS (Pallister-Hall-Syndrom), ACLS (Acrocallosal Syndrom), PAP-A/B (Postaxiale Polydaktylie Typ A/B), PPD- IV (Präaxiale Polydaktylie Typ IV) und GCPS-CGS (Greig Cephalopolysyndaktylie-Syndrom contignous gene syndrom)

## 1.5 Aufgabenstellung

Während der Entstehung des zerebralen Kortex spielen das Neuroepithel, die radialen Gliazellen und die basalen Vorläuferzellen als Quelle neu entstandener Neurone und Gliazellen eine besondere Rolle. Die verantwortlichen Gene bezüglich ihrer Proliferation und Differenzierung werden ihrerseits erst langsam entdeckt. In diesem Zusammenhang scheint der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Gli3*, der von Beginn der Neurogenese im dorsalen Abschnitt des Telenzephalons der VZ exprimiert wird, wesentlich daran beteiligt zu sein. Es konzentrierten sich frühere Arbeiten verstärkt auf die Rolle von *Gli3* in Bezug auf Regionalisierungsprozesse in der frühen Entwicklung des zerebralen Kortex, während noch wenig über den Einfluss von *Gli3* auf die kortikale Stammzellen bekannt ist. So konnten Untersuchungen an *Xt<sup>l</sup>/Xt<sup>l</sup>* Mäuseembryonen neben dem fehlgebildeten dorsalen Telenzephalon mit Verlust wichtiger Strukturen, zusätzlich eine reduzierte *Emx1/Emx2* als auch eine veränderte *Fgf8*, *Bmp4* und *Wnt7b* Expression aufweisen. Unter gleichzeitiger Beobachtung eines gestörten Gradienten neuronaler Differenzierung im zerebralem Kortex, konnte außerdem *Gli3* ebenfalls ein Effekt auf die apikale/basale Zellpolarität zugesprochen werden, welches für das Zellschicksal bezüglich ihrer weiteren Differenzierung und Potenz mitverantwortlich erscheint (Gotz and Huttner 2005). Gestützt auf diesen Beobachtungen wird vermutet, dass *Gli3* einen Einfluss auf eine regelhafte Funktion kortikaler Stammzellen ausübt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Gli3* bezüglich seiner Wirkung auf eine geordneten Generierung neuronaler Vorläuferzellen und deren weiterer Differenzierung, während der zerebralen Kortexentwicklung. Hierfür wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde auf molekularbiologischer Ebene mit Hilfe von Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierungen (ISH) die Expression von Vorläuferzell-spezifischen Markern des dorsalen Telenzephalons in den E10.5 bis E12.5 *Gli3* mutierten Embryonen untersucht. Anschließend wurden dieselben Analysen zur Charakterisierung der

Vorläuferzellen an E12.5 *Wnt7b*-Mutanten und der *Gli3/Wnt7b*-Doppelmutante wiederholt. Im zweiten Abschnitt wurde mit Hilfe von zellkulturexperimentellen Ansätzen das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von isolierten Neurosphären aus dem dorsalen Telenzephalon der *Gli3*-Mutante versus Wildtyp zum Zeitpunkt E12.5 untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tierexperimenteller Ansatz

#### 2.1.1 Tierstämme und Tierhaltung

Die Tierhaltung und Zucht erfolgte in der Tierversuchsanlage der Anatomie Tübingen. Als Versuchstiere wurden zum einen die *Gli3*-Mutante *extra-toe* ( $Xt^f/Xt^f$ ) aus dem C57B16/C3H Hintergrund mit einer Nullmutation für das *Gli3*-Gen verwendet und die für das *Wnt7b*-Gen mutierte Mausmutante bei der das *Wnt7b*-Gen durch eine lacZ-Bande ersetzt ist (Shu et al. 2002). Die Mäuse wurden in Gruppen von bis zu vier Tieren in klimatisierten Räumen mit einem 12h-12h-Hell-Dunkel-Zyklus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Für Versuche wurden Tiere im Alter von 6-16 Wochen, für Verpaarungen 8-14 Wochen verwendet.

#### 2.1.2 Verpaarung und Tiertötung

Zur Stammerhaltung wurden je ein bis zwei Weibchen ( $Xt^f/+$  oder  $Wnt7b^{+/-}$ ) dauerhaft mit einem Männchen ( $Xt^f/+$  oder  $Wnt7b^{+/-}$ ) gehalten, der Genotyp mit Hilfe einer PCR-Analyse festgestellt und die Tiere unter einer Diethylether Narkose mit Ohrmarkierungen versehen. Für anstehende Untersuchungen wurden jeweils zwei Weibchen ( $Xt^f/+$ ) mit einem Männchen ( $Xt^f/+$ ), zwei Weibchen ( $Wnt7b^{+/-}$ ) mit einem Männchen ( $Wnt7b^{+/-}$ ) und zwei Weibchen ( $Xt^f/+$ ) mit einem Männchen ( $Wnt7b^{+/-}$ ) verpaart und am nächsten Morgen auf Vaginalpfropfen untersucht. Der Tag des Auffindens eines Vaginalpfropfes wurde mit E0,5 der Schwangerschaft bezeichnet. Befanden sich die Embryonen im gewünschtem Entwicklungsstadium, wurde das Muttertier durch eine zervikale Dislokation getötet und die Embryonen aus dem Uterus entnommen. *Gli3*-Mutanten wurden anhand ihrer Morphologie des Telenzephalons und der Extremitäten vom Wildtyp unterschieden. Die Identifizierung der *Wnt7b*-Mutante bzw. der *Gli3/Wnt7b*<sup>-</sup>-Doppelmutante erfolgte mit Hilfe einer PCR (siehe 2.5.3).

## 2.2 Immunhistochemie

Bei dieser Methode wurde im ersten Schritt das Gewebe mit einem für das zu untersuchende Antigen spezifischen Primärantikörper inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde ein Sekundärantikörper hinzugefügt, der speziesspezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Diese Reaktion beruht darauf, dass Immunglobuline bestimmte Molekülstrukturen, ein sogenanntes Antigen, erkennen und an dieses binden können. Zur Detektion von Proteinen werden meist Immunglobuline der Klasse G (IgG) benutzt. Dabei stammen diese aus unterschiedlichen Spezies ab, meistens Maus oder Kaninchen, so dass unter Beachtung der Speziesspezifität Doppelfärbungen auf einem Objektträger bzw. einer Kulturlochplatte möglich sind.

### Verwendete Lösungen

- 10 × PBS

28,48 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck)

5,52 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Merck)

87,66 g/l NaCl pH 7,3

1,25 g/l KCl pH7

- 4 % PFA

100 ml 10 × PBS

800 ml  $\text{H}_2\text{O}$

auf 60° C erhitzen

40 g PFA (Sigma) und 1–2 ml 10 M NaOH unter dem Abzug zugeben

pH auf 7,4 einstellen

mit dd $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen

filtrieren und bei 4° C lagern

- Tris-BSA

0,1 % Albumin Fraktion V (Roth) in 1 × PBS lösen

### **2.2.1 Gewebepreparation für Antikörperfärbungen auf Kryostatschnitten**

Nach Entnahme von Embryonen bis zum E12.5 Stadium wurden die Köpfe in PBS gefüllten Schalen vom Torso abgetrennt und ü/N bei 4°C in 4% PFA fixiert. Nach kurzem waschen in PBS, wurden die Gehirne am nächsten Tag knapp über der Augenanlage präpariert, zur Entwässerung in 30% Sucrose/PBS (w/v) überführt und ü/N bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Gehirne in mit OCT gefüllten Einbetttschalen eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die immunhistochemischen Analysen von Neurosphären wurden pro Kulturflasche jeweils gut durchmischte 1,5 ml Kulturmedium entnommen. Um die runde Zellaggregatform möglichst zu erhalten, ließ man die Neurosphären absitzen. Nach Abnahme des Überstandes wurden 100µl OCT zum Zellpellet gegeben, vorsichtig mit einer Pipettenspitze durchmischt und direkt im Flüssigstickstoff eingefroren.

### **2.2.2 Anfertigung von Kryostatschnitten**

Anschließend wurden 16 µm dicke Schnitte bei -20°C an einem Kryostat (Leica CM 3050 S) angefertigt und diese auf SuperFrost Plus Objektträgern (R. Langenbrinck) kalt aufgenommen, an der Luft getrocknet und ü/N bei 4°C gelagert. Dabei wurde stets darauf geachtet, Gewebe von Geschwisterembryonen bzw. Geschwistertieren zu verwenden, um einen aussagekräftigen Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp ziehen zu können.

### **2.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryostatschnitten**

Bei embryonalem Gewebe wurden die Objekte zunächst 3 × 30 min in PBS gewaschen, um die Sucrose und das OCT zu entfernen. Anschließend erfolgte das Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch Inkubation mit 200 µl 10% Schafserum/PBS (v/v) bzw. 200 µl 0,1% Triton X-100 in 10% Schafserum/PBS (v/v), um zusätzlich das Gewebe zu permeabilisieren. Dabei schafft das nichtionische Detergens Triton X-100 Poren in der Zellmembran und ermöglicht so ein leichteres

Eindringen des primären Antikörpers. (siehe Tabelle Nr.3 S. 44) Nach 1 h wurde die Lösung durch vorsichtiges Abklopfen entfernt und durch 100 µl Antikörperverdünnung in 1% Schafserum/PBS (v/v) ersetzt. Die Inkubation erfolgte ü/N bei RT oder bei 4°C in einer luftdichten, mit benässten Papiertüchern ausgelegten Feuchtkammer. Im zweiten Schritt wurden die Präparate 3 × 30 min in PBS gewaschen, mit 100 µl des Zweitantikörpers (1:100 - 1:400) für bis zu 4 h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend ein für 3x20min in PBS gewaschen und sofort mit Moviol eingedeckelt. Bei einigen Primärantikörpern (*Tbr2*, *GLAST*) wurden die Objektträger vor der Fettstiftumkreisung für 5min in der Mikrowelle in 10 mM Natriumcitrat pH 6,0 erhitzt, um das Antigen zu Demaskieren, nochmals 2 x 10 min in PBS gewaschen und anschließend blockiert.

#### **2.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen**

Nach Erreichen des gewünschten Stadiums wurden die Zellen direkt in den Kulturlochplatten fixiert. Dazu wurde das komplette Differenzierungsmedium abgesaugt, durch eine adäquate Menge an 4% PFA ersetzt und ü/N bei 4°C fixiert. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS konnten die Zellen in 1x PBS bei 4°C gelagert werden.

Sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper wurden entsprechend in PBS / 0,1% BSA + 0,1% Triton verdünnt. Vor dem Aufbringen des primären Antikörpers wurden die Zellen mit PBS / 0,1% Triton für 30 min bei RT permeabilisiert, einmal in 1x PBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung aus 10% Schweineserum in PBS / 1% BSA für weitere 30min blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4°C ü/N. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal in 1x PBS gewaschen und mit Sekundärantikörper in Gegenwart von Dapi (1:5000; 200 ng/ml in dH<sub>2</sub>O) einem Zellkernspezifischen Fluoreszenzmarker, für 2Std bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop photographiert.

### 2.2.5 Bestimmung der Proliferationsrate mit BrdU

5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Thymidinanalogon, das während der S-Phase wie das strukturell verwandte Thymidin in die DNA eingebaut wird. Es diente somit zur Bestimmung der Proliferationsrate der Neurosphären. Der BrdU Einbau wurde mittels eines monoklonalen Anti-BrdU-Antikörpers immunhistochemisch bestimmt.

Für die Aufladung der Neurosphären, wurde BrdU (1:40) direkt ins Kulturmedium appliziert und die Zellen im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Neurosphären wie beschrieben (s. 2.2.1) in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühltem 70% EtOH + Glycin pH 2 (50 mM, Sigma) auf Eis für 20min fixiert. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS wurden die Neurosphären zur Anfertigung von Kryostatschnitten in OCT eingefroren. Diese wurden 3 mal für jeweils 5min in 1x PBS gewaschen bevor die Fettstift umkreisten Schnitte mit dem monoklonale Anti-BrdU-Antikörper (1:40 von Roche) im Inkubationspuffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1h in einer Feuchtkammer inkubiert wurden. Alle weiteren Schritte wie die Markierung mit dem Zweitantikörper und Eindeckeln erfolgten wie in 2.2.3 beschrieben.

Antikörper / (Wirtstier)	Inkubation	Verdünnung	Hersteller	Wirkung
<b>Primär-Antikörper</b>				
<i>BrdU</i> (Maus)	37 °C	1 : 40	DakoCytomation	Proliferationsmarker
<i>RC2</i> (Maus)	4 °C	1 : 50	DSHB	Neuroepitheliale Stammzellen + RGC
<i>Nestin</i> (Maus)	4 °C	1 : 100	Chemicon	Vorläuferzellen
<i>β-Tubulin</i> (Maus)	4 °C	1 : 1000		Neurone
<i>Tuj1</i> (Maus)	4 °C	1 : 100	Covance	Neurone
<i>Map2</i> (Maus)	4 °C	1 : 1000	Sigma	Neurone
<i>Tbr1</i> (Maus)	4 °C	1:2500	Chemicon	Neurone
<i>GFAP</i> (Kaninchen)	4 °C	1 : 200	Chemicon	Astrozyten
<i>CNPase</i> (Maus)	4 °C	1 : 200	Chemicon	Oligodendrozyten
<i>BLBP</i> (Kaninchen)	4 °C	1 : 2000	Chemicon	RGC
<i>GLAST</i> (Meerschein)	RT	1 : 5000	Chemicon	RGC
<i>Tbr2</i> (Kaninchen)	RT	1 : 2000	Chemicon	Basale Vorläuferzellen + junge Neurone
<i>Foxg1</i> (Kaninchen)	4 °C	1 : 100	Abcam	Spez. Marker des dorsalen Telenzephalons
<b>Sekundär-Antikörper</b>				
Anti-Meerschwein IgG Cy3	RT	1 : 200	Jackson Immuno	rote Fluoreszenz
Anti-Maus IgM Cy3	RT	1 : 100	Jackson Immuno	rote Fluoreszenz
Anti-Maus IgG Cy3	RT	1 : 400	Invitrogen	rote Fluoreszenz
Anti-Kaninchen IgG Cy3	RT	1 : 400	Invitrogen	rote Fluoreszenz
Anti-Maus IgG Alexa488	RT	1 : 500	Invitrogen	grüne Fluoreszenz
Anti-Kaninchen IgG Alexa488	RT	1 : 500	Invitrogen	grüne Fluoreszenz

**Tabelle Nr.3** Liste der verwendeten primär und sekundär Antikörper einschließlich der Verdünnungen

### 2.2.6 Zelltodanalyse mit Propidiumiodidmarkierung

Da Propidiumiodid (PI) durch die Plasmamembran toter Zellen, aber nicht durch die intakte Membran lebender Zellen eindringen kann und dort durch Interkalation die DNA im Zellkern anfärbt, diente es als Marker für apoptotische Zellen. Propidiumiodid wurde dabei 1:1000 direkt ins Kulturmedium appliziert und die Zellen für weitere 30min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Neurosphären in 1x PBS

gewaschen und in OCT eingefroren (siehe 2.2.1). Die angefertigten Schnitte konnten direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

### 2.2.7 Dokumentation und Bearbeitung von Immunfluoreszenzfärbungen

Die Färbungen konnten direkt im Anschluss mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200 Mikroskops unter verschiedenen Fluoreszenzfiltern untersucht und mit Hilfe des Programms AxioVision–AxioCam3.1. digitalisiert und dokumentiert werden.

Die Bearbeitung und Zusammenstellungen der aufgenommenen Bilder erfolgte anschließend mit Hilfe der Programme Adobe Photoshop 5.5 oder CoralDraw 11.

## 2.3 *In-situ* Hybridisierung

### 2.3.1 Durchführung

Zum Nachweis der mRNA in einem bestimmten Gens im Geweben wird eine markierte Sonde hergestellt, die eine komplementäre Sequenz zur nachzuweisenden mRNA hat.

Zur Durchführung einer *In-situ* erfolgte zuerst das Entfernen des Paraplasts durch Waschen in der folgende Alkoholreihe: 3 × 7 min. Xylol, 2 min. Xylol/EtOH (50% (v/v) EtOH abs./ 50% (v/v) Xylol ), 2 × 2 min 100% EtOH, je 1 min. 96%, 90%, 70% und 50% EtOH, 2 × 5 min. PBS.

Es folgte anschließende eine Inkubation in Proteinase K für 5 min. (400 µl Proteinase K (10 mg/ml) in 200 ml PBS ) und eine weitere Inkubation für 5 min in Glycin zur Inaktivierung der Proteinase (0,2% (w/v) Glycin in PBS ). Anschließend wurden die Präparate 2 × 5 min in PBS gewaschen und im darauf folgenden Schritt für 20 min in PFA/Glutaraldehyd nachfixiert (4% PFA + 0,2% (v/v) Glutaraldehyd ). Die Präparate wurden erneut für 2 × 5 min. in PBS gewaschen, die Objektträger anschließend soweit wie möglich getrocknet und die Objekte mit einem Fettstift (ImmEdge-Pen, Vector Laboratories Inc.) umrandet. Auf jeden Gewebeschnitt wurden 7,5 – 20 µl Hybridisierungslösung gegeben (je nach Größe des Schnitts) und in einer mit 50% Formamid/2 × SSC befeuchteten Kammer bei 70°C für 1 Stunde vorhybridisiert. Die Lösung wurde abgenommen und durch die gleiche Menge RNA-Sonde-haltige Hybridisierungslösung (~ 1ng/µl) ersetzt. (2,5 ml Formamid, 1,25 ml 20 × SSC pH

4,5, 50 mg Blocking Reagenz (Roche), 1 ml ddH<sub>2</sub>O, bei 65°C im Wasserbad lösen, 50 µl 0,5 M EDTA, 5 µl Tween-20, 50µl CHAPS (10%), 2µl Heparin (50 mg/ml), 100 µl frisch denaturierte (5 min bei 95°C) tRNA (50mg/ml) ).

Die Hybridisierung erfolgte wiederum bei 70°C ü/N. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde folgte eine Inkubation der Präparate für 2 × 15 min. bei 65°C in 50% Formamid/2 × SSC. Anschließend wurden die Schnitte 3 × 10 min, in PBT gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit 100µl B-Block-Lösung in einer mit H<sub>2</sub>O befeuchteten Kammer. Die Lösung wurde durch anti-DIG-Antikörper haltige B-Block-Lösung (1:1000 verdünnt, 20 µl pro Schnitt bei 2% (w/v) Blockingreagenz (Roche) 10% Schafserum (v/v) in PBT ) ersetzt und die Präparate ü/N bei 4 °C mit dem Antikörper inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen für 3 × 5 min in PBT entfernt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min in NTM. (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ) Anschließend wurden 200 µl Färbelösung (NBT/BCIP, 1:50 verdünnt in NTM) auf die Schnitte gegeben und nach ausreichender Farbentwicklung die Färbung durch kurzes Waschen in PBS gestoppt. Die Objekte wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt und ü/N getrocknet.

### **2.3.2 Dokumentation und Bearbeitung von in-situ Hybridisierungen**

Die Hybridisierungen konnten direkt im Anschluss mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200 Mikroskops mit Hilfe des Programms AxioVision–AxioCam3.1. digitalisiert und dokumentiert werden. Die Bearbeitung und Zusammenstellungen der aufgenommenen Bilder erfolgte ebenfalls anschließend mit Hilfe der Programme Adobe Photoshop 5.5 oder CoralDraw 11.

## **2.4 Zellkultur**

### **2.4.1 Kultivierung von Neurosphären**

Bei dieser Methode macht man sich zu Nutzen, dass neurale Stammzellen, die aus dem Gehirn isoliert werden, unter Zugabe von Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), ihre Fähigkeiten zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung nicht verlieren und sich in rundliche

Zellaggregate, sogenannte Neurosphären aneinander legen. Weiterhin ist es möglich, die Neurosphären gezielt unter EGF und FGF Entzug in Neurone und Gliazellen ausdifferenzieren zu lassen. Dadurch eignet sich diese *in vitro* Methode zum direkten Vergleich der Stammzelleneigenschaften von wildtypischen und *Gli3* mutierten Vorläuferzellen.

Für die sterile Kultivierung der Neurosphären war es notwendig, alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank durchzuführen. Durch sorgfältiges Reinigen der Arbeitsflächen und Werkzeuge mit 70% EtOH wurde einer eventuellen Kontamination durch Bakterien und Pilze vorgebeugt. Nur autoklavierte bzw. sterilisierte Präparierbestecke, Glaswaren, Pipettenspitzen und Lösungen wurden verwendet.

Präpariermedium:	HANK's BSS mit $Mg^{++}/Ca^{++}$ , 1% PS
Überführungsmedium:	HANK's BSS w/o $Mg^{++}/Ca^{++}$
Beschichtung:	0,1% L- Poly-L-Ornithine, Laminin/Fibronectin (je 20 $\mu$ g/ml)
Kulturmedium:	DMEM/F12, 1% PS, 1% L-Gluthamin, 1% N2 Supplement
Differenzierungsmedium:	DMEM/F12, 1% PS, 1% L-Gluthamin, 1% B27 Supplement, 2% oder 5% FCS (Foetal Calf Serum Gold)

#### **2.4.2 Isolierung und in Kulturenaufnahme von Vorläuferzellen aus dem dorsalen Telenzephalon von E12.5 Mäusen**

Für die Isolierung der Zellen musste das heterozygote Muttertier ( $Xt^J/+$ ) durch eine cervikale Dislokation getötet werden. Nachfolgend wurde das Tier an allen vier Extremitäten fixiert und die mit 70% EtOH desinfizierte Bauchdecke, ohne das Peritoneum zu eröffnen, sowohl nach kranial in medialer Linie, als auch mit zwei Schnitten nach lateral aufgeschnitten. Um Infektionen durch das Fell ausschließen zu können, wurde dieses ebenfalls fixiert und das Peritoneum nochmals desinfiziert. Erst jetzt wurden die sich im Uterus perlenschnurartig aufgereihten Embryos mit frischem Präparierbesteck vorsichtig vom Ovidukt abgetrennt und in eine Petrischale mit auf Eis gekühltem HANK'S BSS ( $Mg^{++}/Ca^{++}$ , 1% Penicillin/Streptomycin) Medium

transferiert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen unter dem Abzug und waren möglichst zügig durchzuführen, um eine hohe Zahl an überlebensfähigen Zellen zu gewährleisten.

Im ersten Schritt wurden die Gehirne isoliert und die Hirnhäute vorsichtig abgezogen. Danach wurde das Telencephalon mit den beiden Seitenventrikeln abgetrennt und unter Ausschluss der Hippokampusanlage nach außen aufgeklappt, so dass das dorsale Telencephalon (Neokortex) deutlich von der medialen und lateralen ganglionischen Eminenz (LGE) zu unterscheiden war. Somit konnte neokortikales Gewebe vom Paläokortex und den Eminenzen säuberlich abgetrennt werden und für jeden Embryo gesondert mit einer aufgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig angesaugt und in ein 0,5ml Eppendorftube auf Eis überführt werden. Dabei wurde ein möglichst geringes Volumen des  $Mg^{++}$  und  $Ca^{++}$  haltigem Präpariermediums überführt, um Beeinträchtigungen der nachfolgenden enzymatischen Behandlungen zu verhindern. Eine Zelltrennung erfolgte unter mehrmaligem kurzem Schütteln bei 37°C durch maximal 10 minütige Inkubation in HANK'S BSS Medium ohne  $Mg^{++}/Ca^{++}$ , dem 10µl/ml DNAse (5% Stock, Sigma) und 40µl/ml Trypsin (2,5% Stock, Sigma) zugesetzt waren. Sobald das Gewebe sedimentiert war, wurde die Trypsin-Reaktion mit 100-200µ FCS (Foetal Calf Serum Gold, Gibco) abgestoppt. Die Zellen konnten anschließend bei 200g für 5min abzentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde vorsichtig vom Überstand befreit und nochmals mit 0,5ml Kulturmedium gewaschen und bei 200g für 5min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands konnten die Zellen in 0,5ml Kulturmedium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert werden und gleichmäßig mit einem Volumen von 250µl auf die Vertiefungen (Wells) ausgesät werden. Die Kulturschalen waren zuvor für eine Stunde bei 37°C mit 0,1% Poly-L-Ornithine, Laminin (20µg/ml) und Fibronectin (20µg/ml) beschichtet und gleichfalls mit Kulturmedium gewaschen worden. Die Kulturschalen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank inkubiert. Die Zugabe von 1µl pro 1ml Kulturmedium EGF/FGF (20ng/µl) erfolgte täglich.

### 2.4.3 Kultivierung von Neurosphären

Die zu kultivierenden Neurosphären wurden in Zellkulturmultilochplatten oder Zellkulturplastikflaschen unterschiedlichen Volumens in Brutschränken bei 37 °C in einer humidifizierten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in bikarbonatgepuffertem

DMEM/F12 Kulturmedium gehalten. Dem Medium wurden 1% Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin(10mg/ml), 1% L-Glutamin (200mM) und 1% N2-Supplement (Gibco) zugesetzt. Die Zugabe von EGF und FGF (20ng/ $\mu$ l) erfolgte täglich und wurde dem Mediumvolumen angepasst.

Ein kompletter Mediumwechsel, als auch die Mehrfachpassagierungen, erfolgten alle drei bis fünf Tage, indem die Zellen in ein 15ml Falkontube überführt wurden. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten, wurde der Überstand mit einer Glaskapillare abgesaugt und das Zellpellet im frischem bei 37°C vorgewärmten Medium resuspendiert. Dabei erfolgte die Passagierung von beschichteten 96er Wells über 48er und 24er Wells in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen, um von dort für die einzelnen Differenzierungs- und Charakterisierungsversuche abgesammelt zu werden.

#### **2.4.4 Neurosphärendifferenzierung**

Um Neurosphären aus der Selbstreproduktion in die Differenzierung zu lenken, wurden die Zellen in Differenzierungsmedium 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin und B27 Supplement (Gibco) mit überführt. Zusätzlich wurden dem Medium je nach gewünschter Differenzierungsrichtung entweder 2% FCS (neuronale Differenzierung) oder aber 5% FCS (Gliadifferenzierung) zugesetzt. Auf die tägliche Zugabe von EGF/FGF wurde verzichtet.

Hierfür wurden jeweils 4-5ml Kulturmedium aus den 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen entnommen, bei 200g für 5min pelletiert und in frischem, bei 37°C vorgewärmtem Differenzierungsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig dicht auf vorbeschichtete 24er Kulturlochplatten ausplattiert (eine Stunde bei 37°C mit 0,1% Poly-L-Ornithine, Laminin (20 $\mu$ g/ml) und Fibronectin (20 $\mu$ g/ml)) und für 7 bzw. 14 Tagen unter täglicher Beobachtung und Versorgung mit frischem Differenzierungsmedium in Brutschrank bei 37°C und einer 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung gehalten. Nach Erreichen des gewünschten Stadiums, wurde die Kultur gestoppt. (siehe 2.2.4)

### **2.4.5 Lösen adhärenter Zellen**

Im Gegensatz zu in kulturgehaltenen Neurosphären, welche bevorzugt schwimmende runde Aggregate bildeten, setzten sich Neurosphären unter EGF/EGF Entzug ab und wurden adhärent. Um diese, nach gewünschter Differenzierungszeit, für RNA Gewinnung verwenden zu können, wurde das Differenzierungsmedium komplett abgesaugt und die Zellen mit 300µl (24er Wells) temperiertem (37 °C) 1x PBS (w/o Ca<sup>++</sup> u. Mg<sup>++</sup>) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 300µl Trypsin (0,5mg/ml)/EDTA (0,22mg/ml) und vorsichtigem Klopfen vollständig gelöst und das Trypsin wurde durch Zugabe von 800µl 5% FCS haltigem Differenzierungsmedium neutralisiert. Die im Medium suspendierten Zellen wurden in ein 15ml Falkontube überführt und in der Zentrifuge für 5min bei max. 200g pelletiert, so dass sie für die weitere RNA Isolierung verwendet werden konnten.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1 Genotypisierung von genetisch veränderten Embryonen und adulten Mäusen**

Der Nachweis des Transgens wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

#### **2.5.1.1 Isolierung von embryonalem Gewebe**

Zur Bestimmung des embryonalen Genotyps wurde für jeden Embryo getrennt entweder der Dottersack oder aber ein Teil der unteren Extremitäten säuberlich isoliert, in PBS gewaschen und in 1,5 Eppendorftubes auf Eis gelagert.

#### **2.5.1.2 Isolierung von adultem Gewebe**

Zur Genotypisierung von adulten Tieren wurden diese unter Abzug mit Diethylether betäubt, zur späteren Identifizierung eine Ohrmarkierung gestanzt und eine Mäuseschwanzbiopsie durchgeführt. Das isolierte Gewebe wurde ebenfalls in 1,5 Eppendorftubes auf Eis gelagert.

### **2.5.1.3 DNA Isolierung**

Anschließend wurden die Gewebeprobe in 200µl Lysepuffer bei 55°C für mindestens 4Std unter Schütteln verdaut, um die DNA zu isolieren. Mit Hilfe einer Inkubation bei 85°C für 45min wurde der Zellverdau beendet und die Proben konnten bei –20°C gelagert werden. (Lysepuffer ; DirectPCR- Tail Cat#101-T (Viagen) ;0,1 µg/µl Proteinase K (Roche) )

### **2.5.2 Gesamt-RNA für PCR-Analysen aus Neurosphären**

RNA-Moleküle können unterschiedliche Funktionen ausüben, wie z.B. genetische Information übertragen und mit Hilfe weiterer RNA-Moleküle diese in Proteine übersetzen. Dabei werden je nach Entwicklungsstadium und Bedarf entsprechend kodierende DNA-Abschnitte in mRNA transkribiert. Durch Gewinnung der Gesamt-RNA und deren Umschreibung in cDNA ist es somit möglich Einblick in die zeitabhängige Expression unterschiedlicher Gen-produkte zu erhalten.

#### **2.5.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Neurosphären**

Die Gewinnung von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Mini RNA-Isolation Kits (Qiagen). Dazu wurde jeweils 2-3ml Kulturmedium aus den Neurosphären-kulturflaschen entnommen, zweimal mit sterilem PBS auf 10ml aufgefüllt und bei 200G für 5min zentrifugiert. Zum Aufschluss der Zellen und zur Inaktivierung aller Proteine, vor allem der RNA abbauenden Enzyme, wurden die Zellpellets in 350µl RLT Puffer durch Vortexen gelöst und durch vorsichtiges Auf- und Abziehen mit Hilfe einer sterilen Spritze und Kanüle homogenisiert. Dem Homogenat wurden anschließend 350µl 70% EtOH zugefügt und die gesamten 700µl auf eine Anionenaustauschersäule aufgetragen. Nach 15 sekundiger Zentrifugation bei 8000g konnte der Durchlauf verworfen werden und die Säule wurde in mehreren Schritten durch Zentrifugieren mit dem RW1 und RPE Waschpuffer ausgewaschen. Anschließend konnte die RNA in 30µl DEPC Wasser eluiert werden.

Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration der präparierten RNA wurden photometrische Messungen bei 260 und 280nm durchgeführt. Dazu wurden von der

RNA 2µl mit 98µl DEPC Wasser verdünnt (Verdünnung 1:50) und Extinktionswerte gegen den Leerwert (H<sub>2</sub>O) gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Die RNA Konzentration lag mindestens über 0,15 und das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, welches ein Maß für die Reinheit der RNA-Proben ist, sollte zwischen 1,8-2,0 liegen.

### 2.5.2.2 DNase Verdau

Da die, auf diesem Weg, gewonnene RNA immer noch geringfügige Verunreinigungen durch genomische DNA enthalten kann, wurde noch ein zusätzlicher DNase Verdau nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Dabei wurden für 2µg RNA 20µl Ansätzen mit 2µl 10xPuffer und 2µl DNaseI und entsprechend DEPC Wasser hergestellt. Diese wurden für 15min bei RT inkubiert und anschließend unter Zugabe von 2µl 25mM EDTA pH8,0 bei 65°C für 10min Hitze inaktiviert.

### 2.5.2.3 Reverse Transkription

Um die Expression von Genen in den zu untersuchenden Neurosphären mittels PCR nachzuweisen, muss die isolierte mRNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Die Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase SuperscriptII (200U/µl) von Invitrogen. Diese synthetisiert unter Anwesenheit aller Nukleotide sowie des Oligo (dT)<sub>23</sub>-Oligonukleotids einen cDNA-Strang. Dabei wurden 40µl Reaktionsansätze aus 1µg RNA (10µl DNA-Verdaulösung, s. 2.5.2.2), 2µl Oligo d(pT)23 Primer (Sigma, 0,5µg/µl), 3µl dNTPs, 8µl 5xPuffer (Invitrogen) 3µl DTT (Invitrogen, 0,1M), 2µl RNase out (Q.BIOgene Rnase Inhibitor 40U/µl ) 2µl SuperscriptII (Invitrogen) und 10µl DEPC-H<sub>2</sub>O pipettiert und bei 42°C für 60min inkubiert.

Durch eine weitere Inkubation bei 70°C für 5 Minuten und auf Eis für 5 weitere Minuten wurde das Enzym inaktiviert. Die somit gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert und 2µl pro Polymerasenkettenreaktion (PCR) eingesetzt.

### 2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein Standardverfahren zur Vervielfältigung eines bekannten spezifisch DNA-Abschnitts. Das Prinzip dieser *in-vitro* Genamplifizierung beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei aufeinanderfolgenden Schritten: zuerst findet eine *Denaturierung* statt, bei der durch Erhitzen (94°C) die Doppelstrangstruktur der DNA aufgebrochen wird und die DNA somit frei für die *Oligonukleotid-Anlagerung (Annealing)* vorliegt. Das sog. *Annealing* läuft bei einer für das Oligonukleotid spezifischen Temperatur zwischen 50-68°C ab und rahmt den bekannten zu amplifizierenden Zielbereich am 5'- und am 3' Ende des Gegenstranges ein. Die eigentliche *Polymerasereaktion* findet bei einem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase bei 72°C statt. Hierbei wird von den freien 3'-OH-Enden der beiden Oligonukleotide unter Einbau von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) entlang der DNA-Matrize in 5'-3' Richtung ein komplementärer DNA-Abschnitt synthetisiert. Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte lässt sich der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell amplifizieren und die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen jeweils als Matrize für eine weitere DNA-Synthese.

#### 2.5.3.1 Durchführung

Als Matrize wurden jeweils 2µl (0,5µg/µl) DNA verwendet, die mittels Präparation von Mäuseschwanzspitzen oder aus Umschreibung von Neurosphären RNA in Erststrang cDNA (s. 2.5.2.3) gewonnen wurde. Als Kontrolle bei der Genotypisierung wurden positive Mäus-DNA Proben verwendet. Als Kontrolle für die cDNA-Qualität und die richtige Funktionalität der PCR wurde ein Ansatz mit einem GAPDH-Primerpaar verwendet. GAPDH (Glyceral-3-Phosphat-Dehydrogenase) ist ein Enzym, das bei der Glykolyse eine Rolle spielt und als Haushaltsgen in nahezu allen Zellen konstitutiv exprimiert wird. Zusätzlich wurde eine Mausehirn-DNA Probe als Positivkontrolle mitgeführt. Die einzelnen PCR-Programme wurden in einem Thermoblock (Primus 96plus, MWG-BIOTECH) durchgeführt.

Ein Standard-Reaktionsansatz (20 µl) einer Genotypisierung setzt sich wie folgt zusammen:

PCR- Ansatz	Xt <sup>J</sup>	Wnt7b
10x PCR Puffer (Roche)	2 µl	2 µl
dNTP (10mM)	1 µl	1 µl
DMSO	-	1 µl
Taq Polymerase (Roche)	0,2µl	0,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	11 µl	12.5 µl
DNA	2 µl	2 µl
Programm:		
Initiale	1 x 94°C für 2min	1 x 94°C für 2min
Denaturierung	35 Zyklen à : 94°C für 15sec	35 Zyklen à : 94°C für 1min
Denaturierung	62°C für 30sec	56°C für 1min
Annealing	72°C für 30sec	72°C für 1min
Extension		
Terminale	1 x 72°C für 5min	1 x 72°C für 5min
Extension	4°C für ∞	4°C für ∞
Bande	180bp für Wildtyp 580bp für Xt Allel	190bp für Wildtyp 350bp für Wnt7b Allel

**Tabelle Nr.4** Genotypisierung

Verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierungen:

Spezifität	Name	Einsatz (10mM)	Sequenz 5'- 3'
Xt	C3f	1µl	GGCCCAAACATCTACCAACACATAG
Xt	C3r	1µl	GTTGGCTGCTGCATGAAGACTGAC
Xt	XtJ580f	1µl	TACCCAGCAGGAGACTCAGATTAG
Xt	XtJ580r	1µl	AAACCCGTGGCTCAGGACAAG
Wnt7b	Wnt7bK01	0,5µl	CCGCAGCTGTCTATGGCGCAG
Wnt7b	Wnt7bK02	0,5µl	CACCAAACCTCCTATCCCAGGTC
Wnt7b	Wnt7bK03	0,5µl	GATCGATCTCGCCATACAGC

**Tabelle Nr.5** Oligonukleotide für die Genotypisierung

Verwendete Oligonukleotide für die Neurosphären-Analyse:

Primerpaar	Ausrichtung	Sequenz 5' → 3'	Annealing	Bande
Nestin	forward	AGTCAGAGCAAGTGAATGG	63°C	600bp
	reverse	AGAAACAAGATCTCAGCAGG		
Gli3	forward	TGGCTTGATTQTTACGAGAG	61°C	254bp
	reverse	TGTGTTCTGTTTTGGTGCTTG		
Wnt7b	forward	AGCCAACATCATCTGCAACAAGATT	63°C	626bp
	reverse	GCACCACCTCCACCTGCAC		
FoxG1	forward	GGGCAACAACCACTCCTTCTC	59°C	395bp
	reverse	GACCCCTGATTTTGATGTGTG		
Pax6	forward	GCTTCATCCGAGTCTTCTCCG	59°C	312bp
	reverse	CCATCTTTGCTTGGGAAATCC		
Ngn2	forward	GATGCCAAGCTCACGAAGAT	50°C	384bp
	reverse	GGAGACGAGAGAGGGAGACC		
Prox1	forward	TGTGATGAGCACCTGAGAGC	57°C	502bp
	reverse	GCTTGTTCTCAGCCATCTCC		
Dlx2	forward	AACCACGCACCATCTACTCC	58°C	181bp
	reverse	CCGCTTTTCCACATCTTCTT		
BLBP	forward	GGGTAAGACCCGAGTTCCTC	60°C	213bp
	reverse	ATCACCACCTTTGCCACCTTC		
GLAST	forward	GCCTATCCAGTCCAACGAAA	59°C	500bp
	reverse	TGGCAGAACTTGAGGAGGTC		
GFAP	forward	TTCTCCTTGTCTCGAATGA	60°C	233bp
	reverse	GGTTTCATCTTGGAGCTTCT		
Map2	forward	GCAGCAAGTGGTTGACTTGGCT	55°C	417bp
	reverse	GAGGAGTGCGGATGATGGCA		
GAPDH	forward	ACCACAGTCCATGCCATCAC	59°C	485bp
	reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

**Tabelle Nr.6** Oligonukleotide für die Neurosphären-Analyse

## 2.5.4 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit dem die negativ geladenen Nukleinsäurefragmente ihrer Größe nach, durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Als Trennmateriale für die DNA-Moleküle dient das Polysaccharid Agarose. Die DNA bildet in der Agarose-Matrix größenspezifische Banden, die mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

### 2.5.4.1 Durchführung

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1-2%iges Agarosegel aufgetragen. Dazu wurde die Agarose zunächst bis zur vollständigen Auflösung in TBE-Puffer aufgekocht, auf unter 70°C temperiert und in einen Gelträger mit einem Kamm, der Aussparungen in gewünschter Anzahl und Größe im Gel hinterlässt, gegossen. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Kamm vorsichtig entfernt, so dass sich die Kammern mit TBE-Puffer gefüllt haben. Die zu analysierenden Proben wurden anschließend mit 4µl Auftragspuffer versetzt und vorsichtig in die Taschen gefüllt. Zur Bestimmung der Fragmentlängen wurde zusätzlich ein Größenmarker (1Kb-Leiter, Gibco) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei 80 bis 110 Volt innerhalb einer Stunde. Die Schärfe der aufgetrennten Banden kann durch geringere Voltzahl und entsprechend längerer Laufzeit erhöht werden. Anschließend wurde das Gel zur Entwicklung für 10-15min in ein 1:5000 (1mg/ml) Ethidiumbromidbad gelegt.

#### Verwendete Lösungen

- 10 x TBE-Puffer

0,89M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS; Roth)

0,89M Borsäure (Roth)

0,5M EDTA (Merck)

## 2.6 Geräte und Technik

Mikroskop Zellkultur:	Zeiss Axiovert 25
Sterilbank:	Heraeus Herasafe
Zentrifuge:	Eppendorf Centrifuge 5810 R
Brutschrank:	Heraeus cytoperm 2
Wasserbad:	Mammert
Paraffinschneider:	Leica DSC2
Streckbad:	Meditel TFB 35
Kryostat:	Leica CM3050S
Binokular:	Zeiss stemi 2000
Licht:	Schott KL 1500 electronic
Schüttler:	Edmund Bühler KL2
Schnitttrockner:	Hybraid Shake'n'Stack
Zentrifuge:	Eppendorf Centrifuge 5414
-80° C Gefrierschrank:	Thermo Life Science Forma Scientific 700 LT Thermo Forma -86C ULT Freezer
Vortex:	Scientific Industries VortexGenie
Thermomix:	Eppendorf Thermomix comfort
PCR-Thermocycler:	MWG-Biotech Primus 96 <sup>plus</sup>
Geldokumentationssoftware:	Liscap Image Capture Software (Image Master VDS; Liscap Image Capture, Version 1.0, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
Zentrifuge:	Eppendorf Centrifuge 5415 D
pH-Messer:	InoLab WTW
Mikroskop:	Zeiss Axiovert 200 Olympus CH-2
CO <sub>2</sub> -Regeleinheit:	Zeiss CTI-Cotroller 3700 digital
Temp.-Regeleinheit:	Zeiss tempcontrol-37
Imaging-Software:	AxioVision LE Rel. 4.5
Fluoreszenzeinheit:	Zeiss ebq 100 isolated

### 3. Ergebnisse

Wichtige Erkenntnisse, die schon im Vorfeld dieser Arbeit gewonnen wurden, sind die fehlende apikale/basale Zellpolarität der kortikalen Vorläuferzellen während der kortikalen Hirnentwicklung in der *Gli3*-Mutante, der gestörte *Pax6* und *Emx* Expressionsgradient, sowie die gestörte Neurogenese (Theil 2005).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Neurone fokale Ansammlungen innerhalb des dorsalen Telenzephalons bilden und die Präplatte wellenartige Strukturen aufweist. In der *Gli3*-Mutante ist eine Überexpression von Fgf8 in der Kommissurenplatte zu verzeichnen (Theil et al. 1999; Aoto et al. 2002; Kuschel et al. 2003). Zusätzlich fehlt die Expression von *Wnt*- und *Bmp*-Proteinen im dorso-medialen Telenzephalon komplett, während in der Ventrikularzone des dorsalen Telenzephalons eine gesteigerte ektopische Expression von *Wnt7b* zu beobachten ist, die sich anhand von Immunfärbungen fleckenförmig darstellt (Grove et al. 1998; Theil et al. 1999; Theil et al. 2002; Theil 2005). Diese starke Überexpression von Fgf8 zusammen mit dem Verlust der Expression von Bmp und Wnt wird als Hauptgrund für die vorliegende Ventralisierung des dorsalen Telenzephalons in Betracht gezogen (Kuschel et al. 2003).

Um den Einfluss des *Gli3*-Gens auf die Entstehung und Differenzierung der radialen Gliazellen (RGC) und der basalen Vorläuferzellen näher zu charakterisieren wurde diese Dissertation in zwei experimentelle Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wurde auf molekularbiologischer Ebene mit Hilfe von Antikörperfärbungen und *in situ*-Hybridisierungen (ISH) die Expression von vorläuferzellspezifischen Markern des dorsalen Telenzephalons in den E10.5 bis E12.5 *Gli3* mutierten Embryonen untersucht. Anschließend wurden dieselben Experimente zur Charakterisierung der Vorläuferzellen an E12.5 *Wnt7b*-Mutanten und der *Gli3/Wnt7b*-Doppelmutante durchgeführt.

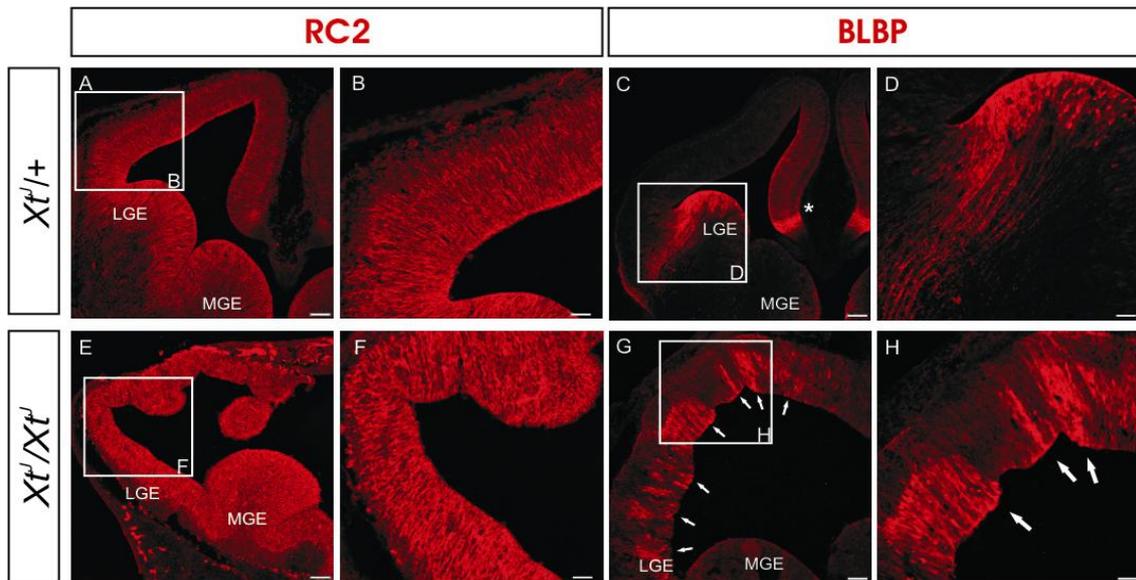
Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde mit Hilfe von zellkulturexperimentellen Ansätzen das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von isolierten Neurosphären aus dem dorsalem Telenzephalon der *Gli3*-Mutante versus Wildtyp untersucht.

### 3.1 Stamm- und Vorläuferzellen im dorsalen Telenzephalon der *Gli3*-Mutante

#### 3.1.1 Ektopische Expressionen der RGC-Marker bei E12.5

Da die normalen Gradienten der Neurogenese im Telenzephalon der *Gli3*-Mutante gestört sind, sollte der Einfluss des *Gli3*-Gens auf die RGC mit Hilfe von Antikörperfärbungen und ISH durchgeführt werden.

Für die Untersuchungen wurde zunächst der Zeitpunkt E12.5 ausgewählt, da zu einem späterem Zeitpunkt das dorsale Telenzephalon zu stark degeneriert ist (Theil et al. 1999), so dass keine verwertbaren Aussagen mehr möglich sind. Auf koronal angelegten Kryostatschnitten dienten *RC2*-Antikörper zur Detektierung von sowohl neuroepithelialen Zellen als auch von RGC, da dieser Marker von beiden Zelltypen exprimiert wird. Die Färbung zeigt dabei sowohl auf den Gewebeschnitten des Wildtyps- als auch der *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>*-Embryonen lange Fasern, die sich von der Ventrikularzone bis zur basalen Oberfläche erstrecken und einen radial orientierten Verlauf aufweisen. Die Anzahl und Verteilung der *RC2* exprimierenden Zellen scheint dabei nicht verändert zu sein (Abb. 9A,B,E,F). Weiterhin wurden *BLBP*- und *GLAST*-Antikörper sowie eine *tenascinC*-Sonde verwendet, da RGC zu Beginn ihrer Existenz hauptsächlich *BLBP* exprimieren und im weiteren Verlauf vermehrt auf eine *GLAST* und *tenascinC* Produktion umstellen. Dabei kann am Wildtyp sowohl für *BLBP* (Abb. 9C,D) als auch für *GLAST* (Abb. 10A) eine starke Expression an der Grenze zwischen ventralem zu dorsalem Telenzephalon und der kortikalen Hem-Region gezeigt werden. Es zeigen sich auch schwache Signale im lateralen Kortex und der Hippokampusanlage. Hier präsentieren sich diese positiven Zellen dicht aneinander gelagert mit charakteristisch langen Fasern von der Ventrikularzone bis kurz vor die basale Oberfläche. Der Vergleich mit der Mutante zeigt an dieser Stelle die ersten Unterschiede. Zwar können auch im dorsalen Telenzephalon der Mutante *BLBP*<sup>+</sup> und *GLAST*<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, doch bilden diese gruppierte Zellhaufen aus, ihre Fortläufer sind verkürzt und bedingt durch den Verlust des dorsomedialen Telenzephalons fehlt die komplette Expression beider Marker im kortikalen Hem.



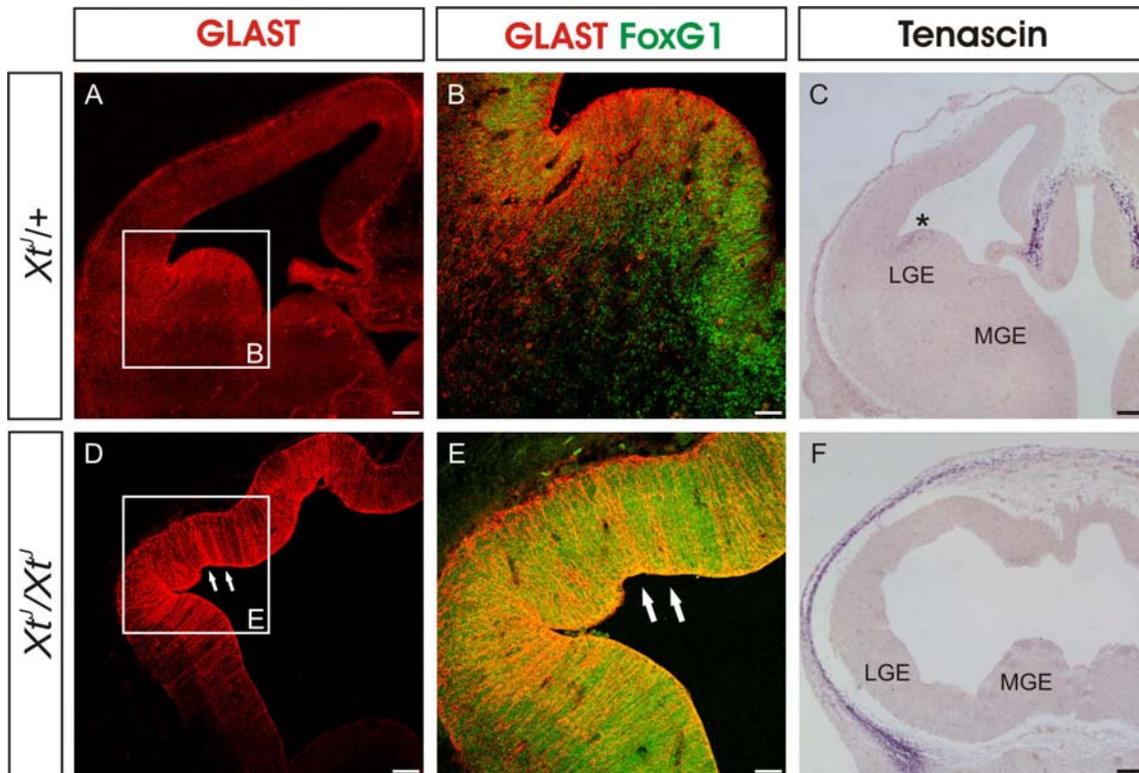
**Abb. 9:** Koronal geführte Kryostatschnitte durch das Telencephalon eines Wildtyps (A-D) und der *Gli3*-Mutante E12.5 (E-H) mit ektopischen Expressionsmustern für *BLBP*.

Übersichtsaufnahmen vom Wildtyp (A.) und der *Gli3*-Mutante (E.) zeigen keine Veränderung für *RC2* in sowohl neuroepithelialen Zellen als auch in RGC im Neokortex. B.+F. Die markierten Zellen weisen lange Fortläufer von der VZ bis an die MZ auf. C. Zeigt eine Übersichtsaufnahme im Wildtyp für *BLBP*, einen RGC spezifischen Marker, dessen Lokalisation auf den kortikalen Saum (\*), den lateralen Kortex und die LGE beschränkt bleibt. D. Zeigt in einer Vergrößerung der LGE die charakteristisch radial ausgerichteten Fasern. G. In der *Gli3*-Mutante zeigen sich stattdessen ektopische Gruppen *BLBP*<sup>+</sup> Zellen im Neokortex (Pfeile). H. Diese werden von unterschiedlich großen *BLBP*<sup>+</sup> Zellen voneinander getrennt. (MGE = mediale ganglionäre Eminenz, LGE = laterale ganglionäre Eminenz ) Balken A. C. E. G. 200µm. B. D. F. H. 50µm.

Im Neokortex, zwischen den *BLBP*<sup>+</sup>/*GLAST*<sup>+</sup> Zellen, zeigen sich unmarkierte freie Lücken (Abb. 9G,H, Abb. 10D). Da bereits im Vorfeld dieser Arbeit eine Einwanderung von Zellen des Diencephalon in den Telencephalon der *Xt*<sup>l</sup>/*Xt*<sup>l</sup> Mutante gezeigt werden konnte (Fotaki et al. 2006), dienten die Doppelfärbungen für *GLAST*/*FoxG1* (gelb) als Beweis für den telencephalischen Ursprung der ektopischen RGC, da *Foxg1* spezifisch im Telencephalon vorzufinden ist (Abb. 10B,E).

Anders verhält es sich mit dem später zum Vorschein kommenden RGC-spezifischen Marker tenascinC, der in der lateralen ganglionischen Eminenz (LGE) exprimiert wird und im Wildtyp mit Hilfe einer ISH detektiert werden konnte (Abb. 10C). In der *Gli3*-Mutante fehlt diese tenascinC-Expression gänzlich und ist nur noch im umliegenden Ektoderm vorzufinden (Abb. 10F). Zusammenfassend geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass ein Defekt in *Xt*<sup>l</sup>/*Xt*<sup>l</sup> Mutanten bei der gleichmäßigen Verteilung der RGC im Telencephalon vorliegen. An einigen Stellen kommt es zu einer ektopischen, verstärkten

Anhäufung von RGCs im Neokortex mit dazwischen liegenden und in ihrer Breite und Häufigkeit variierenden RGC-freien Lücken.



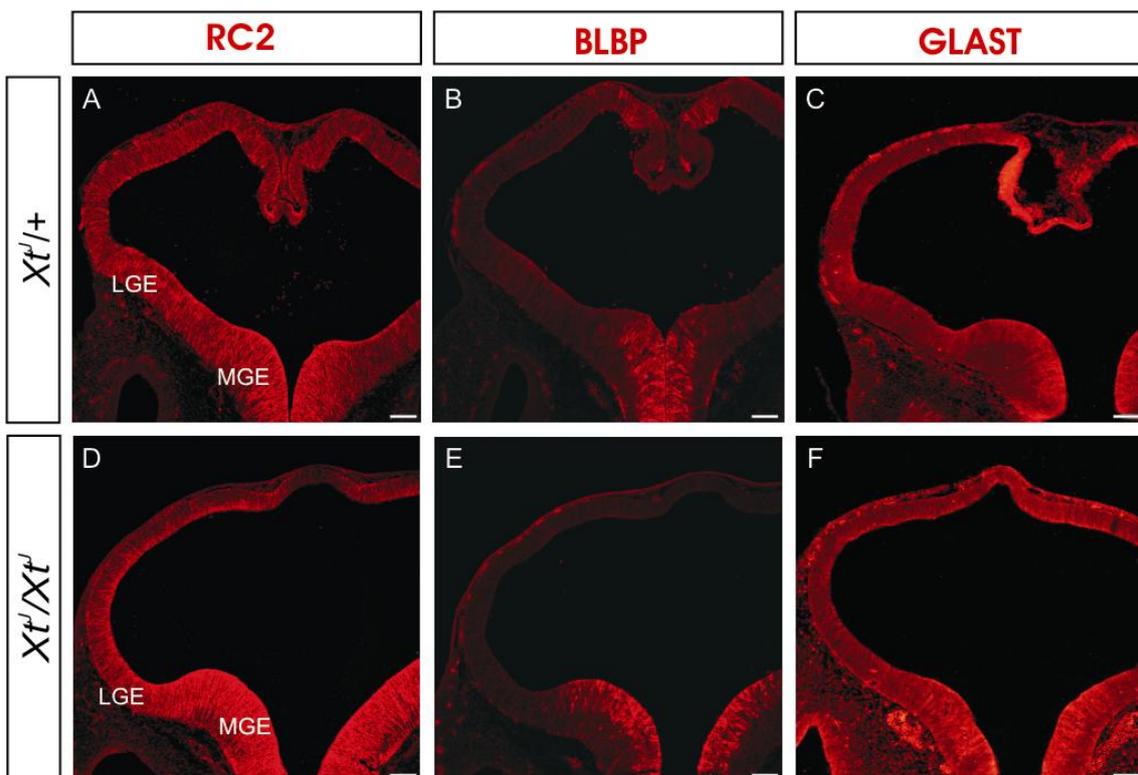
**Abb. 10:** Ektopische Expressionsmuster für  $GLAST^+$  und fehlende Signale für  $Tenascin^+$  RGC auf koronal geführten Kryostatschnitten durch das Telenzephalon E12.5

Übersichtsaufnahmen vom Wildtyp (A.) und *Gli3*-Mutante (D.) zeigen Veränderungen für  $GLAST^+$  RGC im Neokortex. Die sich normal im kortikalen Saum, dem lateralen Kortex und der LGE befindlichen RGC zeigen in der *Gli3*-Mutante eine ektopische Bildung (Pfeile) mit unterschiedlich großen  $GLAST$ -freien Lücken. B.+E. Doppelfärbung mit  $GLAST$  und *FoxG1*, einem telenzephalon-spezifischen Marker, zeigen die LGE und bestätigen den Ursprung der  $GLAST^+$  RGC aus dem Telenzephalon (Pfeil). C. *Tenascin* exprimierende RGC befinden sich im Wildtyp in der LGE (\*). F. In der *Gli3*-Mutante fehlt die *Tenascin* Expression komplett und ist lediglich im Ektoderm erhalten. (MGE = mediale ganglionäre Eminenz, LGE = laterale ganglionäre Eminenz) Balken A. B. D. E. 200 $\mu$ m. C. und F. 50 $\mu$ m.

### 3.1.2 Ektopische Expression von RGC-Markern bei E11.5 und E10.5

Um den genauen Beginn der ektopischen Clusterbildung/Zusammenlagerung der RGC im Rahmen der Ontogenese feststellen zu können, wurden zusätzliche Antikörperfärbungen für RC2, BLBP und  $GLAST$  zum Zeitpunkt E11.5 und E10.5 durchgeführt. Dabei konnte keine sichtliche Veränderung zwischen Wildtyp und *Gli3*-Mutante für  $RC2^+$  Zellen festgestellt werden. Die sich aus der Ventrikularzone bis zur apikalen Oberfläche radial erstreckenden

Fasern sind sowohl bei E11.5 als auch E10.5 deutlich sichtbar. Bei  $BLBP^+$  und  $GLAST^+$  Zellen verhält sich das anders. Zum Zeitpunkt E10.5 beschränkt sich die Expression beim Wildtyp auf die MGE und das dorsomediale Telenzephalon und fehlt bei der *Gli3*-Mutante im dorsomedialen Telenzephalon aufgrund struktureller Fehlbildungen (Abb.11). Interessanterweise sind erste Zeichen einer ektopisch clusterförmigen Expression jedoch erst bei E11.5 zu beobachten, so dass dieser Zeitpunkt als Beginn einer gestörten RGC Entstehung angesehen werden kann (s. Abb.14E,G).

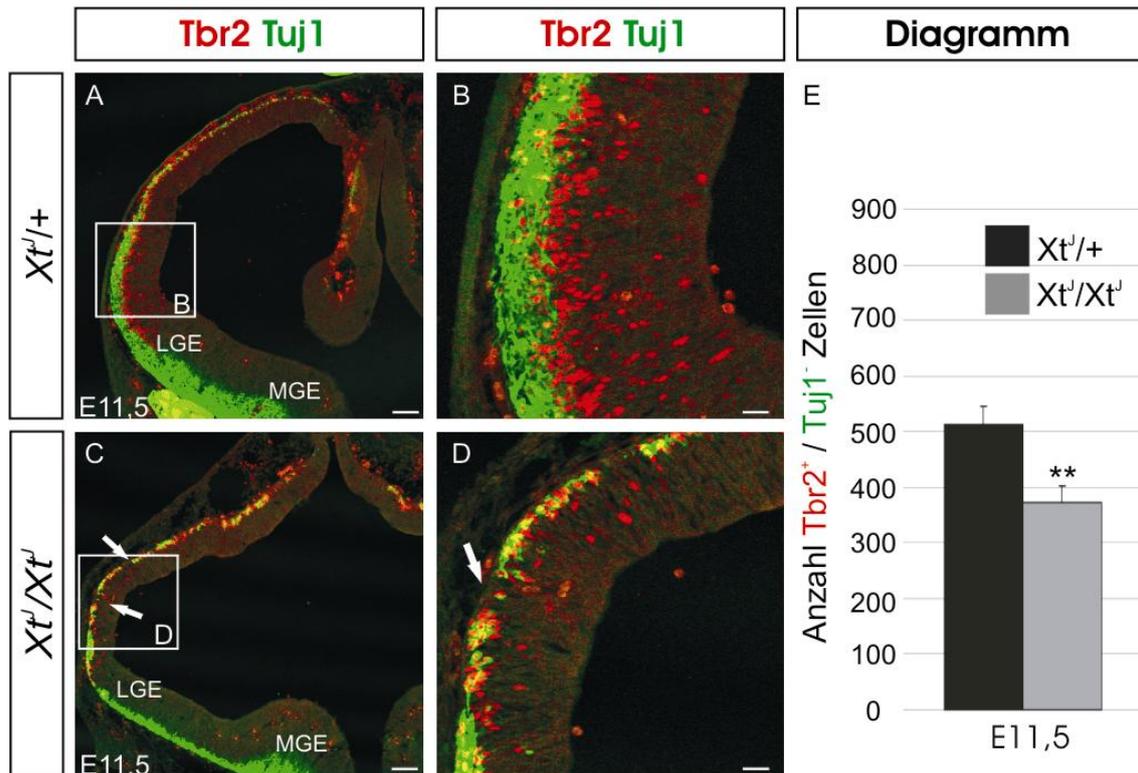


**Abb.11:** Analyse der *Gli3*- Mutante E10,5 mit RGC spezifischen Markern

Übersichtsaufnahmen der *Gli3*-Mutante (D.-F.) zeigen gegenüber dem Wildtyp (A.-C.) bezüglich der einzelnen RGC-spezifischen Marker *RC2*, *BLBP* und *GLAST* keinerlei Veränderungen. **A.+D.**  $RC2^+$  Zellen zeigen ihren typisch radial angeordneten Faserverlauf über den kompletten Neokortex von der MZ bis zur VZ. **B.+E** und **C.+F.** Sowohl *BLBP* als auch *GLAST* markierte Zellen zeigen keine ektopischen Anhäufungen, sondern beschränken sich in der Mutante auf den dorsomedialen Kortex und die MGE. Signale im kortikalen Saum sind durch die morphologischen Veränderungen im dorsomedialen Bereich des Telenzephalons nicht aufzufinden. (MGE = mediale ganglionäre Eminenz, LGE = laterale ganglionäre Eminenz ) Balken A.-F. 200 $\mu$ m.

### 3.1.3 Einfluss des *Gli3*-Gens auf die basalen Vorläuferzellen

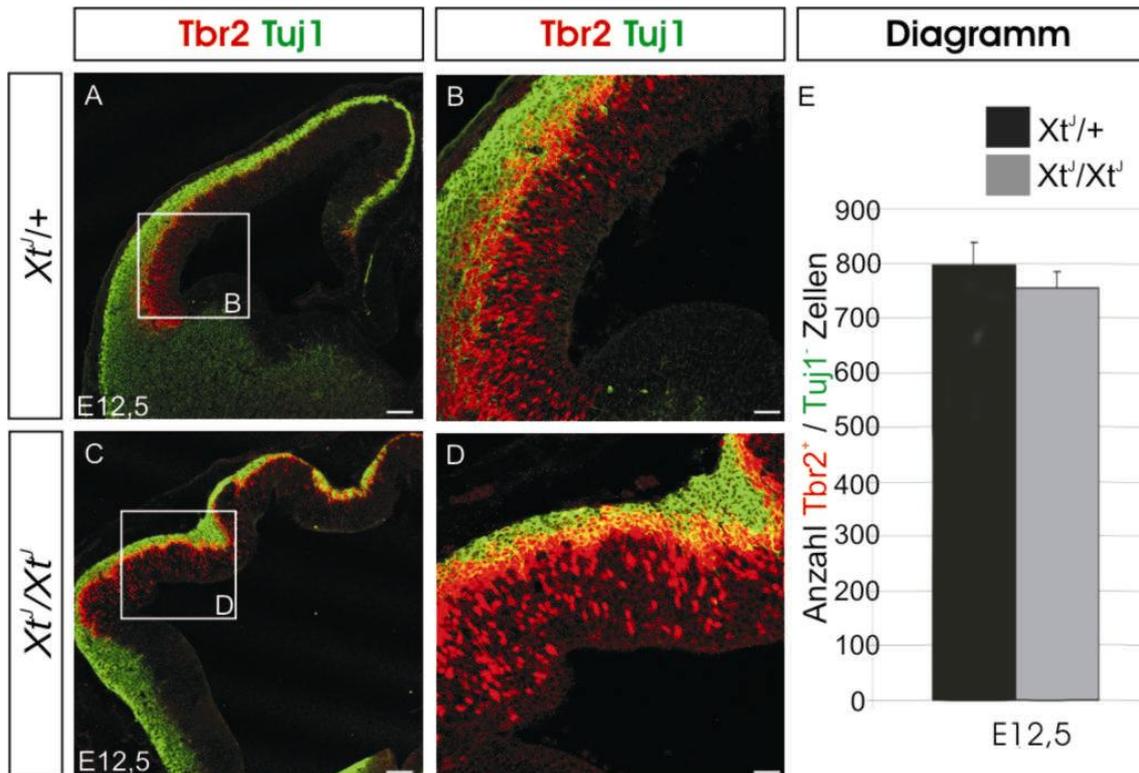
Anschließend stellte sich die Frage, ob das *Gli3*-Gen einen Einfluss auf die Bildung basaler Vorläuferzellen hat, einen weiteren neuronalen Vorläufertyp, der sich speziell in der SVZ befindet. Zur Markierung diente ein Antikörper gegen *Tbr2*. Da jedoch *Tbr2* sowohl von basalen Vorläuferzellen als auch gleichzeitig von jungen Neuronen exprimiert wird, wurden Doppelfärbungen mit einem Antikörper gegen *Tuj1* angefertigt. Dabei handelt es sich bei *Tuj1* um einen frühen Neuronenmarker, dessen Expression zum Zeitpunkt E11.5-12.5 vor allem auf die Präplatte beschränkt bleibt. Daher waren nur *Tbr2*<sup>+</sup>- und *Tuj1*-Zellen als basale Vorläuferzellen zu identifizieren und auszuzählen. Doppelfärbungen bei E11.5 zeigten im Wildtyp die rot markierten basalen Vorläuferzellen in der SVZ, mit der darüber liegenden dünnen Zellreihe aus grün markierten *Tuj1*<sup>+</sup> Neuronen. Diese erstreckten sich über die gesamte Präplatte, ohne Unterbrechungen aufzuweisen (Abb.12A,B). Bei der *Xt<sup>l</sup>/Xt<sup>l</sup>* Mutante zeigte sich dagegen eine ausgedünnte *Tuj1*<sup>+</sup> Zellreihe mit teilweise kleinen Unterbrechungen (Abb.12C,D Pfeil). Weiterhin war eine zwar kleine, aber dennoch signifikante Reduzierung von *Tbr2*<sup>+</sup> und *Tuj1*<sup>-</sup> basalen Vorläuferzellen im zerebralen Kortex zu beobachten. Diese basalen Vorläuferzellen traten nur vereinzelt in kleinen, sich zusammenlagernden Zellhaufen auf, die direkt der Präplatte anliegen und ansonsten über weite Strecken verloren gegangen sind (Abb.12C,D). So konnten aus der Auswertung von drei Embryonenpaaren auf jeweils drei vergleichbaren Kryostatschnitten 551 +/-33 basale Vorläuferzellen pro Gewebeschnitt beim Wildtyp im Vergleich zu 372 +/-30 Zellen pro *Gli3*-Mutante gezählt werden.



**Abb.12:** Untersuchung auf Einfluss des *Gli3*-Gens auf die basalen Vorläuferzellen bei E11.5

Als basale Vorläuferzellen gelten *Tbr2*<sup>+</sup> und *Tuj1*<sup>-</sup> Zellen. **A.** Übersichtsaufnahme mit koronaler Schnittführung durch das Wildtyp Telenzephalon E11.5. **B.** Mit *Tuj1* markierte Neurone bilden eine dünne Zellreihe in der MZ. Darunter befinden sich die rot markierten basalen Vorläuferzellen. **C.** In der Übersichtsaufnahme erscheint die *Tuj1* markierte Zellreihe in der MZ dünner. **D.** Zudem ist die *Tuj1*<sup>+</sup> Zellreihe an manchen Stellen unterbrochen (Pfeil). **E.** Vergleichende Auszählung bei E11.5 von drei Embryonenpaaren auf jeweils drei vergleichbaren Kryostatschnitten zeigte eine verminderte Anzahl an basaler Vorläuferzellen. MGE = mediale ganglionäre Eminenz, LGE = laterale ganglionäre Eminenz, \*\* =  $p < 0,001$ ) Balken A. C. 200µm B. D. 50µm

Weitere Doppelfärbungen zum Zeitpunkt E12.5 wiesen, sowohl beim Wildtyp als auch bei der *Gli3*-Mutante, eine dicker gewordene *Tuj1*<sup>+</sup> Neuronenschicht in der MZ auf (Abb.13A,C). Erstaunlicherweise konnte keine reduzierte Anzahl basaler Vorläuferzellen in der *Gli3*-Mutante beobachtet werden. Dieser Verlust scheint bei E12.5 fast vollständig aufgehoben zu sein, so dass man hier nicht mehr von einer Reduzierung oder Beeinflussung sprechen kann (Abb.13A+B, C+D). Eine Auszählung bestätigte diese Annahme mit 797±/40 basalen Vorläuferzellen pro Wildtypgewebeschnitt im Vergleich zu 753±/30 Zellen pro Mutantengewebeschnitt (Abb.13E).



**Abb.13:** Untersuchung auf Einfluss des *Gli3*-Gens auf die basalen Vorläuferzellen bei E12.5

Als basale Vorläuferzellen gelten *Tbr2*<sup>+</sup> und *Tuj1*<sup>-</sup> Zellen. **A. C.** Übersichtsaufnahme mit koronaler Schnittführung durch das Telenzephalon von E12.5 Wildtyp und *Gli3*-Mutanten. Die Zellreihe *Tuj1* markierter Neurone hat bei E12.5 an Dicke gewonnen. **B. D.** In der Vergrößerung kann die Verteilung der *Tbr2*<sup>+</sup> Zellen bis an die MZ heran beobachtet werden. Ihre Anzahl hat im Vergleich zu E11.5 sichtlich zugenommen. Manche Neurone exprimieren neben *Tuj1* auch *Tbr2* und erscheinen in der Aufnahme gelb und werden daher nicht zu den basalen Vorläuferzellen gezählt. **E.** Eine Auszählung von drei Embryonenpaaren auf jeweils drei vergleichbaren Kryostatschnitten bei E12.5 zeigt keine verminderte Anzahl an basalen Vorläuferzellen im Vergleich zum Wildtyp. Balken A. C. 200µm B. D. 50µm

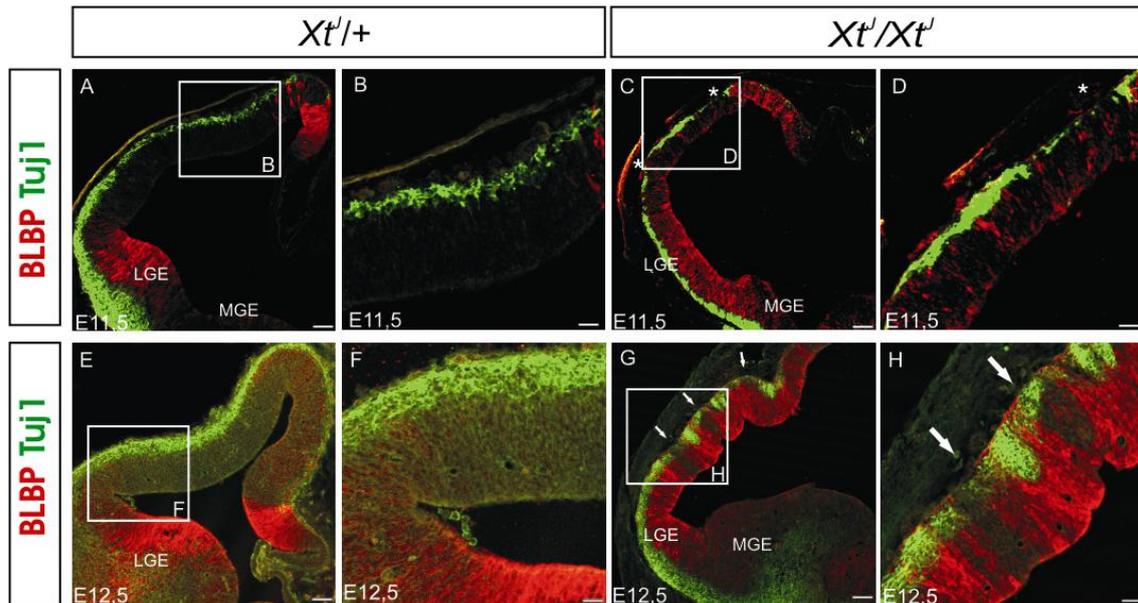
Bei E11.5 ist weitgehend eine reduzierte Anzahl an basalen Vorläuferzellen zu verzeichnen. Diese Reduzierung scheint bereits bei E12.5 aufgehoben zu sein, so dass diese zum späteren Zeitpunkt in der *Gli3*-Mutante kompensiert wird.

### 3.1.4 Einfluss ektopischer RGC auf die Ausbildung Tuj1<sup>+</sup> Neurone

Untersuchungen der *Gli3*-Mutante auf Tuj1<sup>+</sup> Neurone zeigten zum Zeitpunkt E11.5 eine dünner markierte Zellschicht in der MZ, als sie zum selben Zeitpunkt im Wildtyp ausgebildet ist. Zudem unterbrechen Tuj1 freie Abschnitte die geordnete Zellstruktur und lassen sie an manchen Stellen zackig und kantig erscheinen. Der nachfolgenden Frage, ob die vermehrte RGC-Expression eine Rolle für die Neurogenese spielt, wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-doppelfärbungen mit Antikörpern gegen BLBP und Tuj1 nachgegangen.

Da am E11.5 die ektopischen BLBP-Expressionen erst langsam zum Vorschein kommen, konnten genaue Zusammenhänge schwer festgestellt werden. Dennoch ließ sich an BLBP freien Stellen eine reduzierte bzw. komplett fehlende Tuj1<sup>+</sup> Zellzahl beobachten (Abb.14B,D). Anders verhält es sich hingegen zum Zeitpunkt E12.5. Zu diesem Zeitpunkt bilden die Tuj1<sup>+</sup> Zellen einen dichten, kontinuierlichen Zellsaum in der Präplatte aus, der sich von der Höhe der MGE über den gesamten Neokortex, bis auf die dorso-medialen Strukturen erstreckt (Abb.14E,G). In der *Gli3*-Mutante ist die Expression zwar auch über das gesamte Telenzephalon vorzufinden, jedoch sind vor allem im Neokortex vermehrt Stellen mit Unterbrechungen und Lücken zu beobachten. Wie Doppelfärbungen zeigen, scheinen diese Lücken vermehrt an Stellen fehlender BLBP Expression aufzutreten. Die traubenähnlichen Anhäufungen von Tuj1<sup>+</sup> Zellen unterschiedlicher Größe und Breite kommen stattdessen an Stellen einer BLBP Überexpression vor (Abb.14G,H).

Diese Doppelfärbungen weisen darauf hin, dass die Bildung Tuj1<sup>+</sup> Neuronencluster mit der ektopische BLBP Expression korreliert, jedoch kann anhand dieser Beobachtungen nicht sicher von einem kausalen Zusammenhang ausgegangen werden.



**Abb.14:** Doppelfärbungen mit *BLBP* und *Tuj1* an *Gli3*-Mutanten bei E11.5 und E12.5 mit koronaler Schnittführung des Telenzephalons

**A.+C.** Übersichtsaufnahmen von Wildtyp und *Gli3*-Mutante einer Doppelfärbung für *BLBP* und *Tuj1*. **B.+D.** Bei E11.5 bilden *Tuj1*+ Neurone eine dünne und durchgängige Zellreihe, wohingegen in der *Gli3*-Mutante *Tuj1*+ Zelllücken vorzufinden sind. Diese kommen verstärkt an Stellen ectopischer *BLBP* Expression vor (\*). **E.+G.** Bei E12.5 ist die *Tuj1*+ Zellreihe in der Präplatte deutlich stärker ausgebildet, doch zeigen sich in der Mutante neben den ectopischen *BLBP*<sup>+</sup> Zellgruppen im Neokortex auch hier Aussparungen und Lücken in der MZ (Pfeile). **F.+H.** In der Vergrößerung sind die *Tuj1* freien Stellen deutlich von traubenähnlichen Anlagerungen *Tuj1*+ Zellen zu unterscheiden. Dabei scheinen die *Tuj1* freien Lücken mit *BLBP* freien Stellen übereinzustimmen. (MGE = mediale ganglionäre Eminenz, LGE = laterale ganglionäre Eminenz) Balken A. C. E. G. 200µm. B. D. F. H. 50µm

### **3.2 Stamm- und Vorläuferzellen im dorsalen Telenzephalon der *Wnt7b*-Mutante**

#### **3.2.1 Untersuchung der Morphologie des dorsalen Telenzephalons**

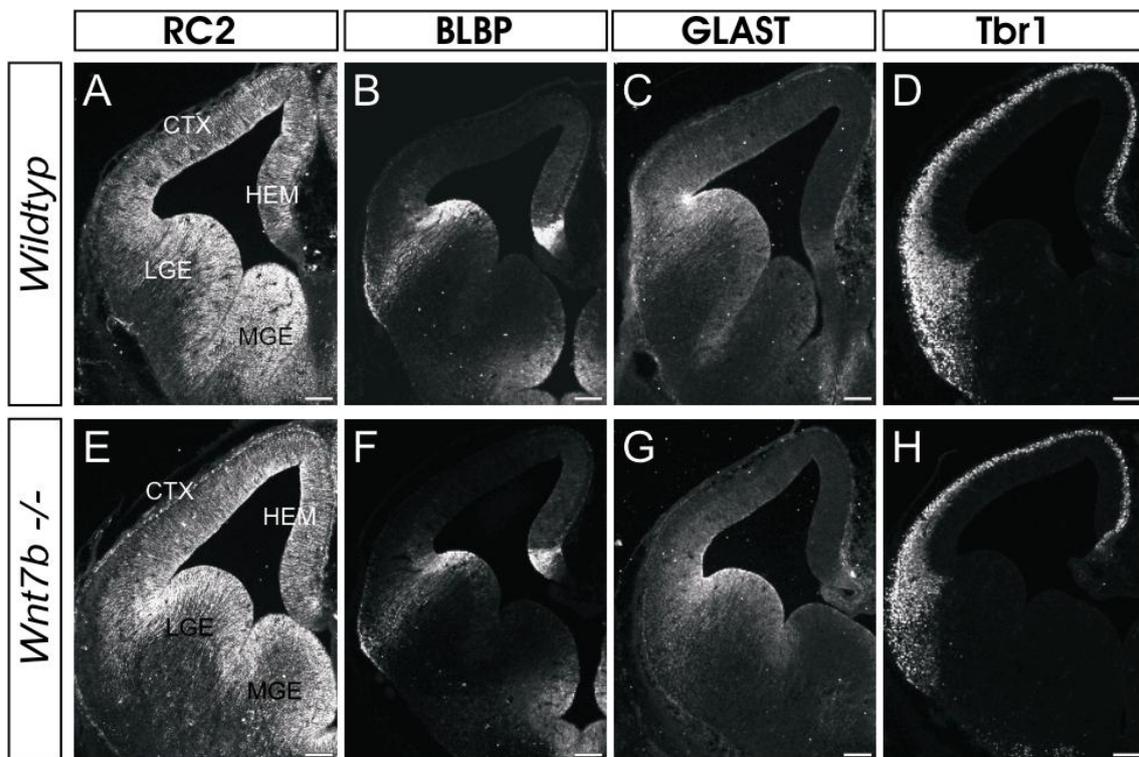
Da die ektopischen *Wnt7b* Expressionen im Neokortex der *Gli3*-Mutante (Theil 2005) Ähnlichkeiten mit der ektopischen RGC Expression aufweisen, stellte sich als nächstes die Frage, ob das *Wnt7b*-Gen als ein Grund für das ektopische Vorkommen RGC angesehen werden kann. Für diese Untersuchung diente eine *Wnt7b*-Mutante, ein Knock-out Tier, bei dem das *Wnt7b*-Gen durch ein *lacZ*-Reportergen ersetzt wurde (Shu et al. 2002). Um in den folgenden Untersuchungen mögliche Defekte durch das Fehlen des *Wnt7b*-Gens auszuschließen, wurden zunächst die Morphologie des Telenzephalons der *Wnt7b*-Mutante zum Zeitpunkt E12.5 im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dabei konnten keine offensichtlichen Abweichungen zum Wildtyp festgestellt werden. Die beiden anterior angelegten olfaktorischen Kolben sind vorhanden, eine deutliche Trennung der beiden Hemisphären entlang der rostro-kaudalen Achse ist erkennbar und die Größe der beiden Mesenzephalien ist entwicklungsentsprechend unverändert. Weiterhin sind im Schnitt durch die Querachse des Telenzephalons die beiden Ventrikel deutlich von einander getrennt und gleich groß. Zusätzlich sind alle wichtigen Strukturen wie die Hippokampusanlage, der Plexus Choroideus und auch die laterale und mediale Eminenz deutlich zu erkennen und zeigen verglichen mit dem Wildtyp keinerlei morphologische Veränderungen (Abb.15A,E).

#### **3.2.2 Untersuchung von RGC, basalen Vorläuferzellen und Neurone im dorsalen Telenzephalon**

Um eventuelle Veränderungen bezüglich der Expression von Vorläuferzellen auszuschließen, wurde das dorsale Telenzephalon der *Wnt7b*-Mutante nach der Verteilung von unterschiedlichen Klassen von Vorläuferzellen mit den

vorher erwähnten Markern untersucht (3.1.1). Die Analyse von Embryonen zum Zeitpunkt E12.5 zeigte keine Veränderungen, weder für die basalen Vorläuferzellen ( $Tbr2^+$ ) noch für die RGC ( $RC2^+, BLBP^+, GLAST^+$ ). Auch mit *Tbr1* zusätzlich markierte Neurone in der MZ zeigen eine regelmäßige, nicht vom Wildtyp abweichende Struktur (Abb.15).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Verlust des *Wnt7b*-Gens zu diesem Entwicklungszeitpunkt keinerlei Einfluss auf die kortikalen Vorläuferzellen des Neokortex ausübt.

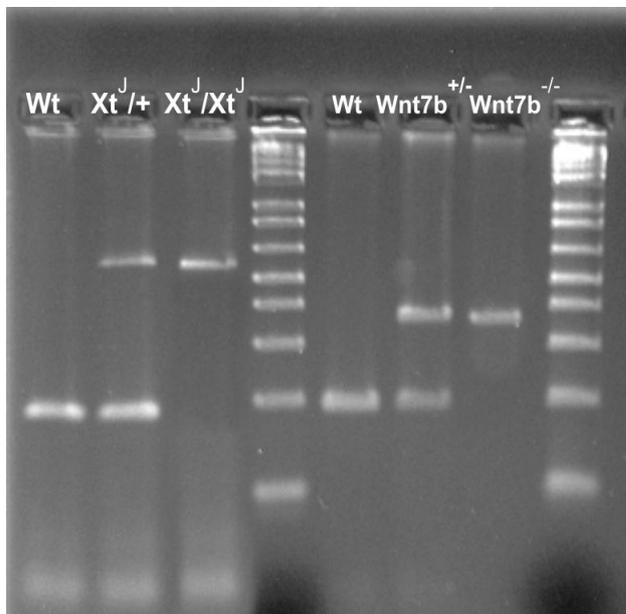


**Abb.15:** Analyse der *Wnt7b*-Mutante E12.5

**A.-H.** Übersichtsaufnahmen in koronaler Schnittrichtung des Telenzephalons. Die *Wnt7b*-Mutante zeigt gegenüber dem Wildtyp keine morphologischen Veränderungen. Der zerebrale Kortex (CTX), der kortikale Saum (HEM), als auch die laterale und mediale ganglionäre Eminenz (LGE + MGE) sind sichtbar ausgebildet. Immunfärbungen mit RGC-spezifischen Markern (*RC2*, *BLBP*, *GLAST*) und mit Neuronenexprimierenden Markern (*Tbr1*) zeigen keine ektopischen Expressionen und Veränderung im Laminierungsprozess. Balken A.-H. 200µm

### 3.3 Analyse des dorsalen Telenzephalons der $Xt^J/Xt^J/Wnt7b^{-/-}$ Doppelmutante

Begründet auf die vorangegangenen Untersuchungen (Theil 2005) entstand die Annahme, dass die beobachtete ektopische *Wnt7b*-Expression in der *Gli3*-Mutante zu einer ektopische BLP-Expression führt. Unter dieser Vorstellung sollte der Effekt durch das ausgeschaltete *Wnt7b*-Gen nicht mehr oder zumindest in abgeschwächter Form in der Doppelmutante vorzufinden sein. Daher wurde die Bildung RGC in einer  $Xt^J/Xt^J/Wnt7b^{-/-}$  Doppelmutante analysiert. Die Kombinationen aus Wildtyp,  $Xt^J/+$ ,  $Xt^J/Xt^J$  und  $Xt^J/Xt^J/Wnt7b^{-/-}$



**Abb.16:** Genotypisierung mit Hilfe einer PCR der *Gli3*- und *Wnt7b*-Mutante

Durch Biopsie gewonnene DNA wurde mit Hilfe spezieller Primerpaare auf den Genotyp untersucht. Dabei zeigt sich bei der *Gli3* Untersuchung eine Wildtypbande (Wt) von 180bp und für das *Xt* Allel von 580bp. Bei der *Wnt7b* Untersuchung entspricht die 190bp große Bande dem Wt und 350bp entsprechen dem *Wnt7b* Knockout.

große Bande charakterisiert wurde. Zeigten sich beide Banden, so handelte es sich um ein heterozygoten Tier. Gleichmaßen wurde mit der *Wnt7b*-Mutante verfahren, die durch eine Bande von 350bp charakterisiert wurde.

Embryonen wurden stets aus demselben Wurf verwendet. Mit dieser Aufschlüsselung war es möglich, entwicklungsbedingte Schwankungen zwischen den einzelnen Genotypen zum Zeitpunkt E12.5 auszuschließen und somit einen aussagekräftigen Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp zu ziehen. Die Überprüfung des Genotyps erfolgte mit Hilfe von PCR-Analysen (Abb.16).

Dabei konnte bei der Analyse der *Gli3*-Mutante eine Bande von 580bp gezeigt werden, während der Wildtyp durch eine 180bp

### 3.3.1 Morphologie der *Gli3/Wnt7* -Doppelmutante

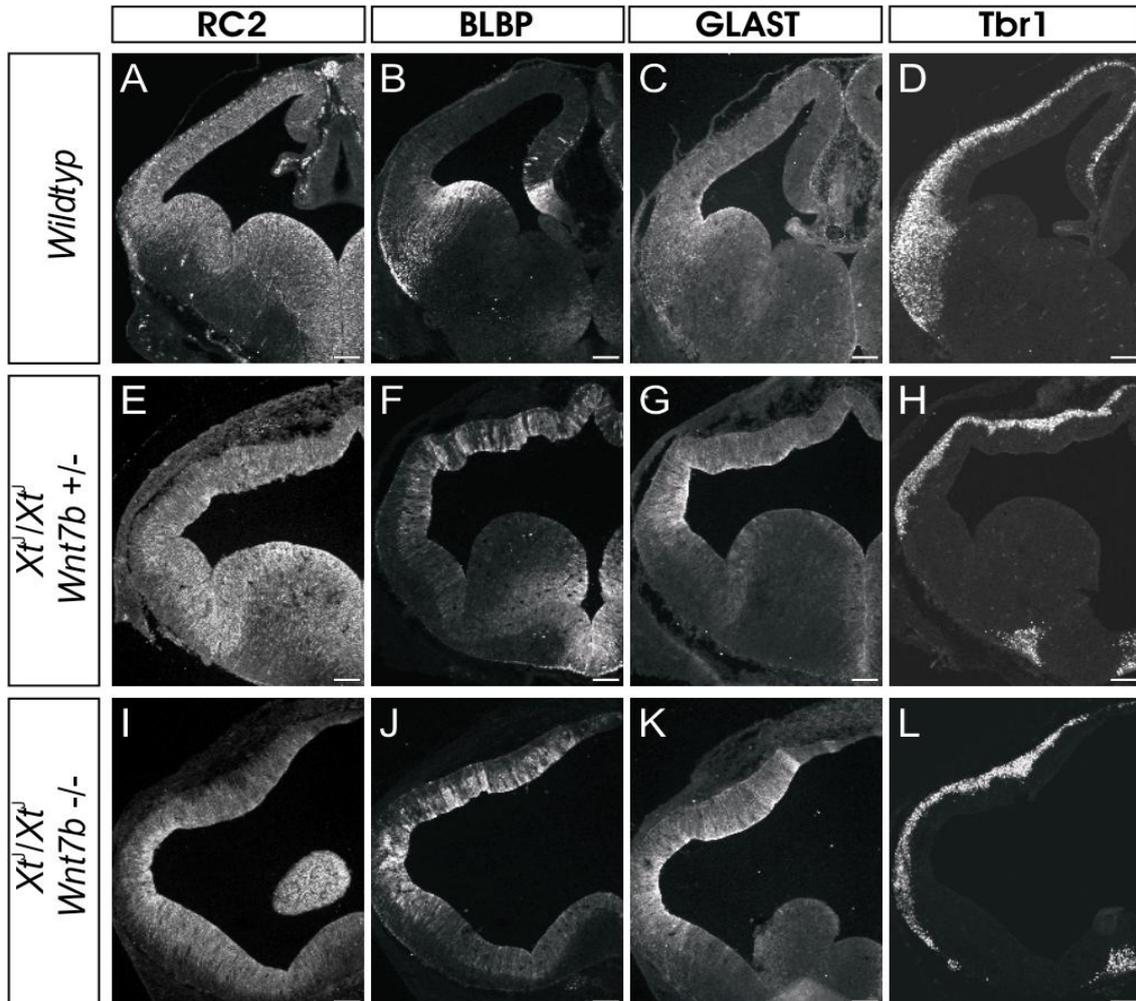
In Anlehnung an die morphologischen Veränderungen der *Gli3*-Mutante, zeigt die *Gli3/Wnt7b*-Doppelmutante dieselben Defekte. So fehlen die beiden anterior zu erwartenden olfaktorischen Kolben, eine deutliche Trennung der beiden Hemisphären entlang der rostro-kaudalen Achse ist nicht erkennbar, die beiden Ventrikel scheinen vergrößert und die Augenanlage ist missgebildet. Zusätzlich sind im Schnitt durch die Querachse des Telenzephalons die beiden Ventrikel nicht von einander getrennt und die dorsomediale Wand fehlt mit dem Verlust des Plexus Choroideus, des kortikalen Saums und der Hippokampusanlage.

Schlussfolgernd kann anhand dieser Beobachtungen der *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>/Wnt7b<sup>-/-</sup>* Doppelmutante ein der *Gli3*-Mutante morphologisch identischer Phänotyp zugeordnet werden.

### 3.3.2 Bestehende ektopische RGC-Marker Expressionen bei E12.5 in der *Gli3/Wnt7*-Mutante

Aufgrund des Fehlens der *Wnt7b* Expression in der Doppelmutante wurden die folgenden Untersuchungen unter der Annahme durchgeführt, dass in diesen Embryonen eine Reduzierung von ektopischen RGC Expressionen im dorsalen Telenzephalon zu beobachten ist. Dabei wurden die Immunfärbungen auf koronal angelegten Kryostatschnitten mit den schon bekannten, zuvor bei der *Gli3*-Mutante angewandten Antikörpern durchgeführt (3.1.1). Bezüglich des RC2 Antikörpers zeigte die *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>/Wnt7b<sup>-/-</sup>* Doppelmutante, wie die *Gli3*-Mutante zuvor, keine Veränderungen. Die radial angelegten Fasern erstrecken sich von der Ventrikularzone bis zur basalen Oberfläche in einer dichten Anordnung über den gesamten Neocortex (Abb.17A,E,I). Weiterhin können auch BLBP<sup>+</sup> und GLAST<sup>+</sup> Zellen verzeichnet werden, deren Verteilung sich ebenfalls durch die strukturelle Veränderung im Bereich des dorsomedialen Telenzephalons nur auf den Neocortex und die laterale Eminenz beschränkt. Es zeigte sich jedoch, dass in der Doppelmutante die ektopische BLBP<sup>+</sup> und

GLAST<sup>+</sup> Clusterbildung nicht aufgehoben ist, sondern im Gegenteil vermehrt Cluster auftreten, welche wiederum durch kleinere Lücken von einander getrennt sind. Dieser Effekt scheint bei der *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>* Mutante vergleichbar weniger stark ausgebildet zu sein.



**Abb17:** Bestehende ektopische Expressionen RGC in der *Gli3/Wnt7b*-Mutante E12.5  
Übersichtsaufnahmen in koronaler Schnittführung des Telenzephalons.

**A.-D.** Wildtyp mit RGC-spezifischen Markern (*RC2*, *BLBP*, *GLAST*) und mit dem neuronenspezifischen Marker (*Tbr1*). **E.+I.** Die *Gli3*-Mutante und die *Gli3/Wnt7b*-Doppelmutante zeigen keinen Unterschied bei der Anordnung der *RC2*<sup>+</sup> Zellen. **F.G.+J.K.** Beide Mutanten zeigen über den Neokortex verteilte ektopische Expressionen von *BLBP*<sup>+</sup> und *GLAST*<sup>+</sup> Zellen. Die unmarkierten Lücken zwischen den Zellanhäufungen scheinen in der Doppelmutante kleiner zu sein. Die Intensität der wellenartigen *BLBP*<sup>+</sup>/*GLAST*<sup>+</sup> Struktur nimmt in der Doppelmutante zu. **H.+L.** Beide Mutanten zeigen eine leicht gewellte Anordnung *Tbr1*<sup>+</sup> Neurone in der MZ, ohne eine deutliche Verbesserung gegenüber dem Wildtyp aufzuweisen. Balken A.-L. 200µm

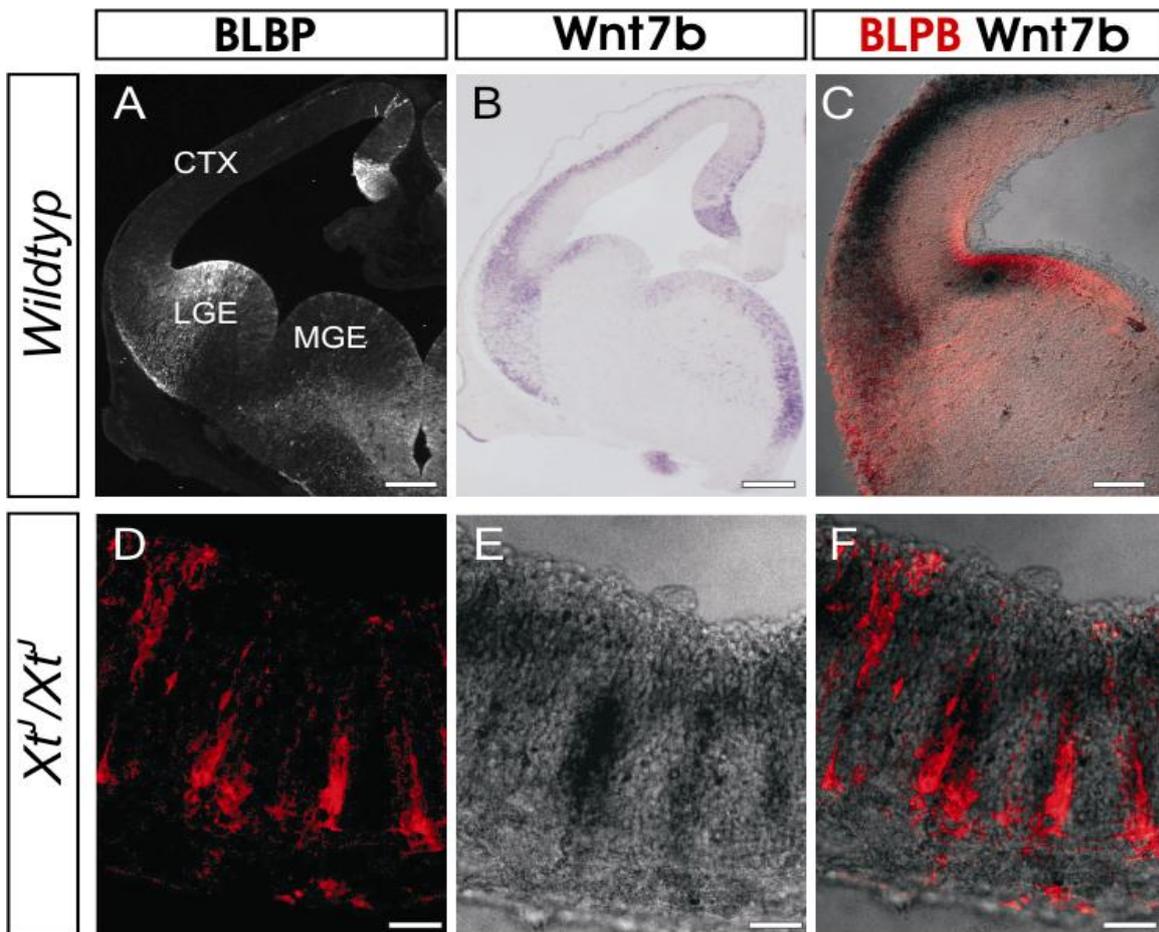
Die vorausgestellte Annahme, dass eine ektopische *Wnt7b* Expression ursächlich für eine Überexpression von *BLBP* ist, konnte somit widerlegt werden. Es zeigte sich stattdessen, dass ein Verlust von *Wnt7b* eine verstärkte

Bildung von BLBP<sup>+</sup> Zellen bewirkt (Abb.17B,F,J). Diese Beobachtungen weisen auf eine Zunahme von BLBP<sup>+</sup> Zellhaufen mit enger stehenden expressionsfreien Lücken statt einer eindeutigen Verbesserung der ektopischen BLBP/GLAST Expression hin. Dieser Befund legt nahe, dass ektopisches *Wnt7b* die Bildung ektopischer RGC unterdrückt.

### 3.3.3 Radiale Gliazellen exprimieren *Wnt7b*

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die ektopischen zusammengelagerten BLBP<sup>+</sup> Zellaggregate ebenfalls *Wnt7b* exprimieren, oder ob sie aus direkter Nachbarschaft zu den *Wnt7b*<sup>+</sup> Zellen entspringen. Hierfür wurden Doppelfärbungen mit Hilfe einer *Wnt7b*-Sonde und eines Immunantikörpers für BLBP angefertigt. In wildtypischen Embryonen zeigte sich eine Überlagerung von *Wnt7b* und BLBP im Bereich des kortikalen Saums, der Hippokampusanlage und der lateralen ganglionären Eminenz (Abb.18A,B). Weiterhin überlappten sich beide Signale an der kortikalen-striatalen Grenze. Beide Signale erscheinen mit einer ähnlichen Expression in den RGC, wie die Doppelfärbung von *Wnt7b* und BLBP verdeutlicht (Abb.18C). Wie in der Vergrößerung zu sehen ist, findet sich in der *Gli3*-Mutante eine wellenartige, zu Zellaggregaten zusammengelagerte Expression von sowohl BLBP<sup>+</sup> als auch *Wnt7b*<sup>+</sup> Zellen im Bereich des Neokortex. Dabei haben beide Signale ein sehr ähnliches Expressionsmuster (Abb.18D,E). Letztlich zeigt die Doppelfärbung eine Expression beider Marker der ektopisch in Clustern erscheinenden neokortikalen Vorläuferzellen des dorsalen Telenzephalons (Abb.18F) und bewies, dass es sich um dieselben Zellen handelt.

Diese Ergebnisse geben folglich Anzeichen für eine Expression von *Wnt7b* in radialen Gliazellen. Daher kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die RGC *Wnt7b* als Signalmolekül exprimieren.



**Abb.18:** *BLBP/Wnt7b* Ko-Expression in neokortikalen Vorläuferzellen des dorsalen Telenzephalons. Übersichtsaufnahmen in koronaler Schnittführung

**A.** Wildtyp mit dem RGC-spezifischen Marker *BLBP*, dessen Lokalisation auf den kortikalen Saum, den lateralen Kortex und die LGE beschränkt bleibt. **B.** ISH des Wildtyps für *Wnt7b* mit dessen charakteristischen Expression über die MGE und LGE einschließlich der Präplatte des Kortex und des kortikalen Saums. **C.** Überlagerung der ISH und Immunfärbung für *BLBP* und *Wnt7b*. **D+E.** *Gli3*-Mutante zeigt für *BLBP* und *Wnt7b* clusterförmige Anhäufungen im zerebralen Kortex (CTX). **F.** Die Überlagerung von ISH und Immunfärbung zeigt eine Ko-Expression der beiden Marker *BLBP* und *Wnt7b* der clusterförmig erscheinenden RGC. (MGE = mediale ganglionäre Eminenz, LGE = laterale ganglionäre Eminenz, ISH = *in situ* Hybridization) Balken A.+B 200µm, C 100µm, D-F 50µm

### 3.4 Analyse von Neurosphären des dorsalen Telenzephalons der *Gli3*-Mutante

Durch die vorangegangenen Analysen der  $Xt^f/Xt^f$  Embryonen konnte unter dem Verlust des *Gli3*-Gens eine vermehrte ektopische Bildung von RGC beobachtet werden, so dass im zweiten Abschnitt dieser Arbeit der Einfluss des *Gli3*-Gens auf das Differenzierungspotential kortikaler Vorläuferzellen untersucht werden sollte. Jedoch war durch die fortschreitende morphologische Degenerierung des Telenzephalons in der *Gli3*-Mutante solch eine Untersuchung *in vivo* nicht durchführbar, so dass Neurosphären aus dem Neokortex von Wildtyp und *Gli3*-Mutante zum Zeitpunkt E12.5 isoliert und in Kultur genommen wurden.

Bei dieser Methode macht man sich zu Nutzen, dass neurale Stammzellen, die in diesem Fall aus dem Gehirn isoliert wurden, unter Zugabe von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), ihre Fähigkeiten zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung nicht verlieren (Bez et al. 2003). Sie lagern sich zu rundlichen, frei schwimmenden Zellaggregaten zusammen, den sogenannten Neurosphären. Es ist möglich, Neurosphären gezielt unter EGF- und FGF-Entzug in Neurone und Gliazellen ausdifferenzieren zu lassen (Johe et al. 1996; Reynolds and Weiss 1996). Dadurch eignet sich diese *in vitro* Methode zum direkten Vergleich der Stammzelleneigenschaften von wildtypischen und *Gli3* mutierten Vorläuferzellen.

#### 3.4.1 Isolierung von Neurosphären aus der *Gli3*-Mutante

Bei dem Gewebe zur Isolierung von Neurosphären handelte es sich stets um Embryonen zum Zeitpunkt E12.5 des selben Muttertieres, um mögliche entwicklungsbedingte Unterschiede zu minimieren, mit dem Ziel eine gute Vergleichbarkeit zwischen Wildtyp und *Gli3*-Mutante gewährleisten zu können. Zur Unterscheidung zwischen Wildtyp und  $Xt^f/Xt^f$  Embryonen wurden die auffälligen makroskopischen Veränderungen bezüglich der Augenanlage, der

beiden zerebralen Hemisphären und der Polydaktylie ausgenutzt und zusätzlich mit einer PCR-Genotypisierung bestätigt.

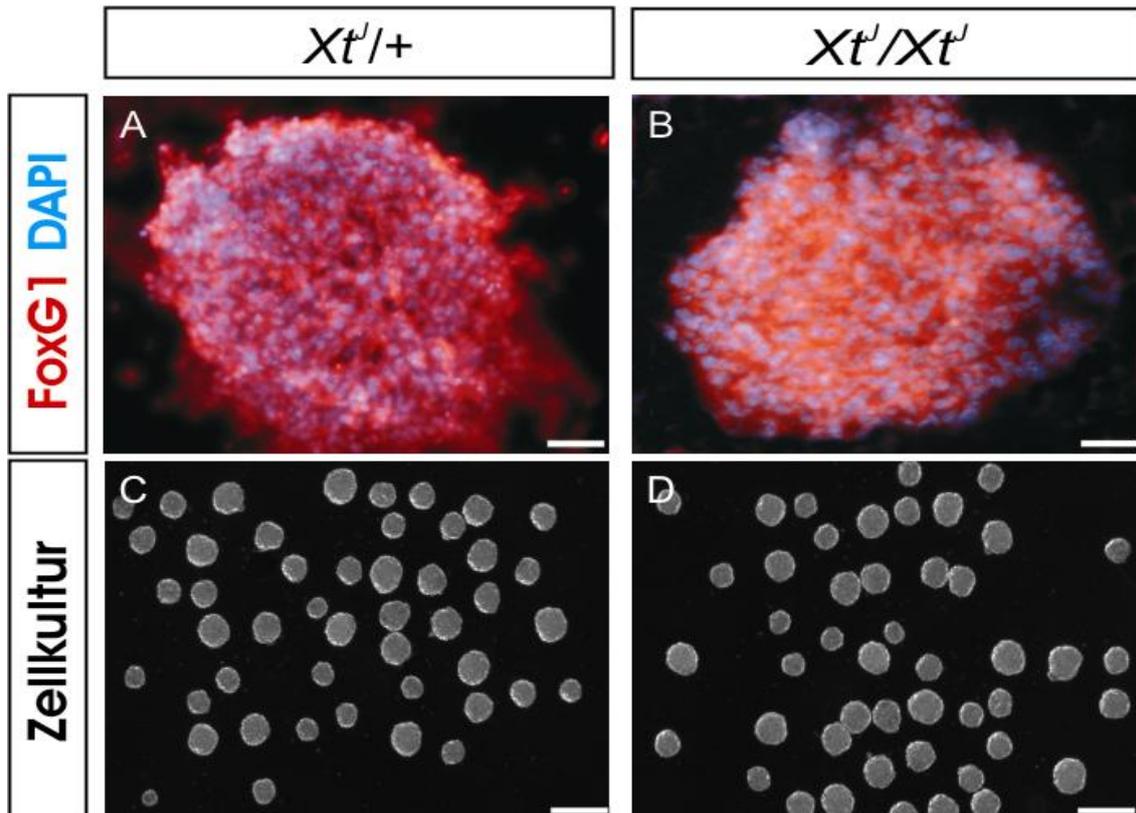
### **3.4.2 Kultivierung von Neurosphären aus der *Gli3*-Mutante**

Die zu kultivierenden Neurosphären wurden in Zellkulturmultilochplatten oder Zellkulturplastikflaschen unterschiedlichen Volumens in Brutschränken bei 37°C gehalten. Eine tägliche Begutachtung der Neurosphären unter dem Mikroskop bezüglich ihrer Anzahl, Form und Vitalität ließ einen guten Vergleich zu. Die *Gli3*-Mutanten Neurosphären weisen trotz der vorangezeigten massiven Veränderungen im Laminierungsprozess und in den ektopischen RGC-Marker Expressionen bezüglich ihrer Morphologie zum Wildtyp keinerlei offensichtliche Unterschiede auf. Sie bildeten unter täglicher bFgf/EGF Zugabe deutliche, im Wachstumsmedium schwimmende und voneinander klar abzugrenzende runde Zellaggregate und konnten somit gut in Kultur gehalten werden (Abb.19C,D).

### **3.4.3 Genexpressionanalyse von Neurosphären**

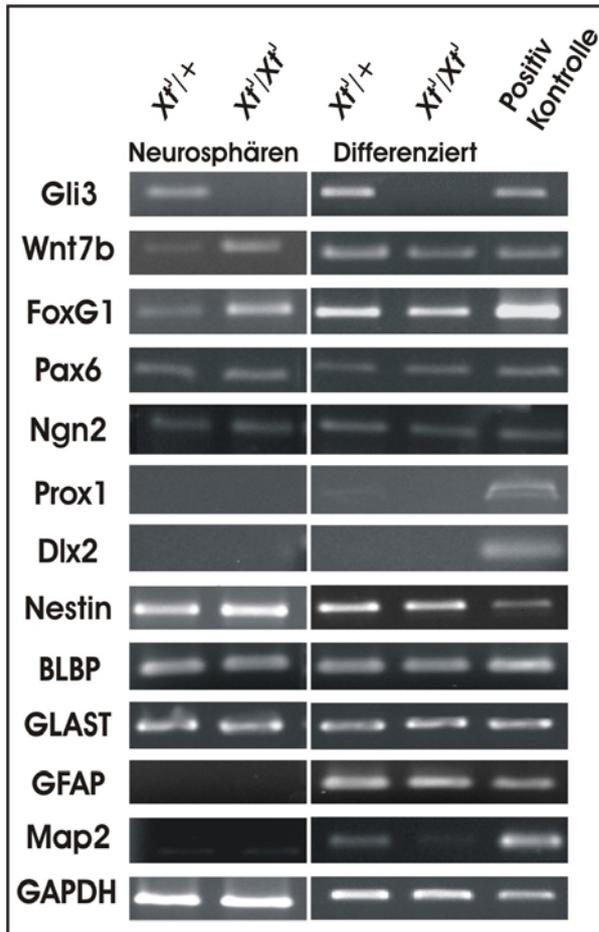
Da frühere Arbeiten in diesem Bereich zeigen konnten, dass im rostralen Abschnitt des dorsalen Telenzephalons vermehrt ventrale Marker exprimiert werden (Tole et al. 2000; Kuschel et al. 2003), und dass im kaudalen Abschnitt des dorsalen Telenzephalons Vermischungen mit Zellen aus dem Dienzephalon vorkommen (Fotaki et al. 2006), wurde schon bei der Gewinnung der Neurosphären darauf geachtet den weit rostralen und kaudalen Abschnitt des dorsalen Telenzephalons auszulassen. Bereits nach kurzer Zeit in Kultur wurden die Neurosphären mit Hilfe von Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen FoxG1 auf 16µm dicken Kryostatschnitten untersucht. FoxG1 ist im Neokortex für die regelhafte Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen verantwortlich und wird lediglich im dorsalen und ventralen Telenzephalon des Neuroepitheliums und den späteren Neuronen und Gliazellen dieser Region exprimiert und fehlt gänzlich im Dienzephalon (Tao and Lai 1992; Hanashima et al. 2002). Der Transkriptionsfaktor erscheint

sowohl im Wildtyp als auch in der *Gli3*-Mutante gleich stark und regelmäßig über die angeschnittenen Neurosphären verteilt und zeigt keinen Unterschied. Diese Beobachtung weist auf den telenzephalischen Ursprung dieser Zellen hin (Abb.19A,B).



**Abb.19:** Neurosphären in Kultur

**A.+B.** Immunfärbung mit *FoxG1*, einem Telenzephalon spezifischen Marker und *DAPI*, einem Zellkern darstellenden Marker, auf Kryostatschnitten aus in Kultur gehaltenen Neurosphären. Sowohl Wildtyp als auch Mutanten Neurosphären zeigen ein deutliches Signal. **C.+D.** In Kultur gehaltene Neurosphären bilden runde, schwimmende und deutlich voneinander zu unterscheidende Zellaggregate, ohne sich in ihrer Morphologie zum Wildtyp sichtlich zu unterscheiden. Balken A.B. 50µm C.D. 200µm, *DAPI* (blau) Zellkern spezifischer Marker.



**Abb.20:** Genexpressionsanalyse von Neurosphären

Die Analysen wurden mit in Kultur gehaltenen undifferenzierten und differenzierten Neurosphären zum 7. und 14.Tag durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde eine Mausshirn-DNA E12.5 verwendet. Untersuchungen mit *Gli3*-Primern zeigen mit dem Ausbleiben einer Bande, dass es sich um *Gli3*-mutierte Neurosphären handelt. Das *Wnt7b*-Signal ist bei undifferenzierten Neurosphären verstärkt und entspricht den Immunfärbungen auf Telenzephalon Kyrostatschnitten E12.5. Signale für *FoxG1*, *Pax6* und *Ngn2* sprechen den isolierten Neurosphären ihren Ursprung aus dem dorsalen Telenzephalon zu. Durch das Ausbleiben Diencephalon spezifischer Signale von *Prox1* und *Dlx2* ist eine Vermischung beider Bereiche ausgeschlossen. Der Stammzellmarker *Nestin*, sowie die RGC spezifischen Marker *BLPB* und *GLAST* werden über die gesamte Zeit, auch in ausdifferenzierten Zellkulturen exprimiert. Das erscheinen glialer Marker wie *GFAP* und neuronaler Marker (*Map2*) findet erst in differenzierten Zellen statt. Das *Map2*-Signal ist in der Mutante vermindert und entspricht der geringen *Map2*<sup>+</sup> Zellzahl in der Zellkultur. *GAPDH* diente bei jedem PCR-Ansatz als Kontrollgen.

Als eine zusätzliche Kontrolle für die nachfolgenden Experimente wurden PCR Genexpressionsanalysen mit spezifischen Oligonukleotiden zur Charakterisierung und Ursprungsbestimmung der isolierten Neurosphären durchgeführt.

Dabei wurde pro untersuchtes Gen, die spezifische und auf die Oligonukleotidenpaare bestimmte Annealingtemperatur bei jeweils 30 Zyklen verwendet. Zwischen Tag 7 und Tag 14 der Differenzierung konnten keine offensichtlichen Unterschiede in der Genexpression beobachtet werden. Als Positivkontrolle wurde isolierte DNA aus einem E12.5 Gehirn der Maus verwendet. Zusätzlich diente *GAPDH* (Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase) bei jedem PCR-Ansatz als Kontrollgen, da es ein Enzym ist, welches bei der Glykolyse eine Rolle spielt und als Haushaltsgen in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird. Erschien keine *GAPDH* Bande, galt diese PCR als nicht auswertbar und musste wiederholt werden.

Zunächst zeigen die Unter-

suchungen das Fehlen einer Bande für das *Gli3*-Gen und beweisen somit, dass es sich tatsächlich um Neurosphären der *Gli3*-Mutante handelt. *Wnt7b* scheint bei der Proliferation in der *Gli3*-Mutante stärker exprimiert zu sein. Diese Gegebenheit entspricht der Beschreibung einer wellenartigen Überexpression von *Wnt7b*, die mit Hilfe von ISH durch das Telenzephalon der *Gli3*-Mutante gewonnen wurde (Theil 2005). Bei den ausdifferenzierten Zellen sind für beide Genotypen deutliche, gleich starke *Wnt7b*<sup>+</sup> Banden zu erkennen und ein Unterschied nicht mehr vorzufinden. Als nächstes wurde die Expression von FoxG1 untersucht, welches für die regelhafte Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen im Neokortex verantwortlich ist. FoxG1 wird lediglich im dorsalen und ventralen Telenzephalon des Neuroepitheliums und den späteren Neuronen und Gliazellen dieser Region exprimiert und fehlt im Dienzephalon vollständig (Tao and Lai 1992; Hanashima et al. 2002). Die vorgefundenen FoxG1<sup>+</sup> Banden weisen somit sowohl den undifferenzierten als auch den differenzierten Neurosphären einen telenzephalischen Ursprung zu. Ergänzend wurde die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren *Pax6* und *Ngn2* untersucht. Während der Entwicklung des zerebralen Kortex besteht die Funktion von *Pax6* in einer Ausbildung von kortikalen Arealen (Bishop et al. 2000; Bishop et al. 2002). Zusätzlich ist *Pax6* ein direkter Aktivator von *Ngn2* und wird gemeinsam mit diesem im dorsalen Telenzephalon exprimiert (Bel-Vialar et al. 2007). *Ngn2* wird wiederum eine Rolle in der Zellentwicklung des Nervensystems zugesprochen, einschließlich der Differenzierung und Proliferation von Vorläuferzellen und der Ausbildung früher Neurone in der Präplatte des Neokortex (Schuurmans et al. 2004). Daher deuten die beiden Banden für *Pax6* und *Ngn2* sowohl für un- als auch für differenzierte Neurosphären einen Ursprung aus dem dorsalen Telenzephalon an. Mit der Untersuchung auf eine Expression von *Prox1* und *Dlx2* wurde auf eine mögliche Vermischung während der Präparation mit Zellen des Hippokampus bzw. des ventralen Telenzephalons kontrolliert. *Prox1* gilt als ein Gyrus dentatus Marker und spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Hippokampus (Pleasure et al. 2000). Bei *Dlx2* handelt es sich um einen Vorläufermarker des ventralen Telenzephalons, dessen Expression in der *Gli3*-Mutante eine ektopische

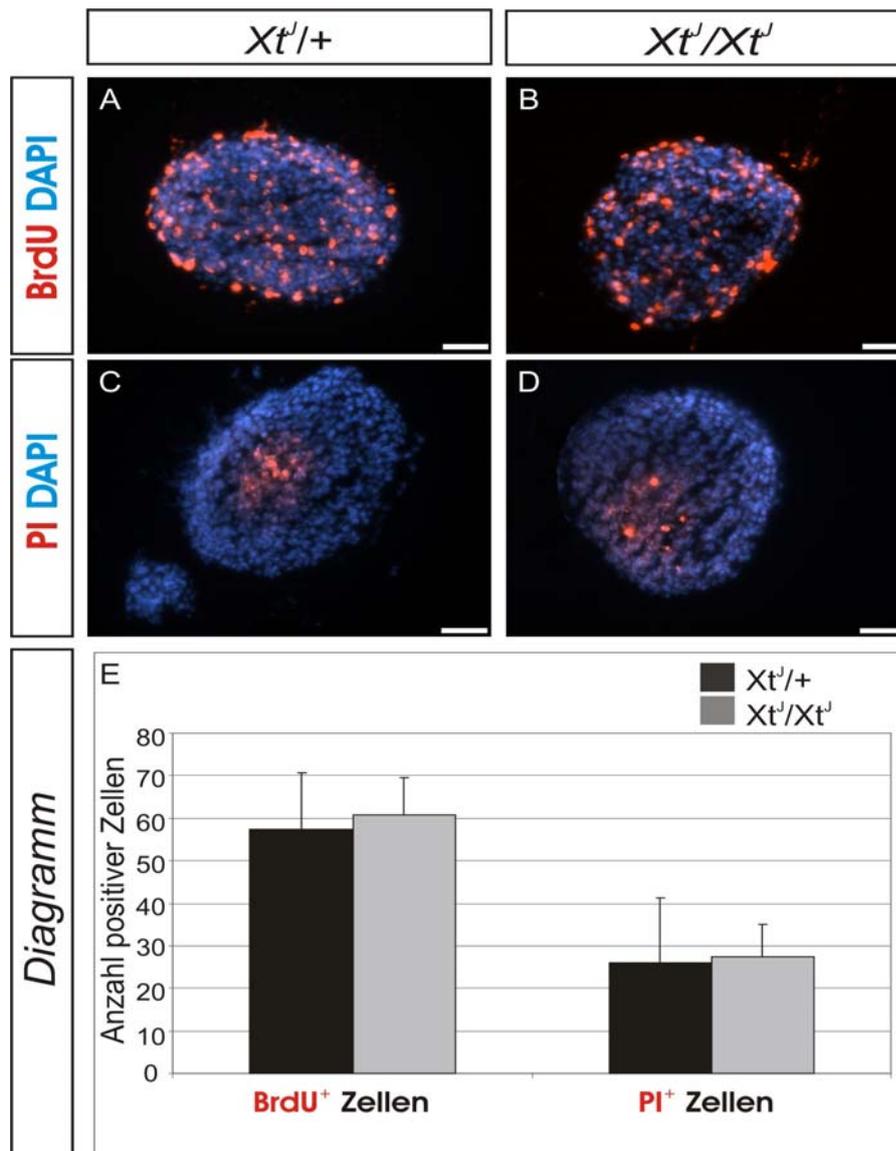
Überexpression der VZ im dorsalen Telenzephalon zeigte und daher für eine Ventralisierung des dorsalen Telenzephalon spricht (Kuschel et al. 2003). Die fehlende Expression von Prox1 und Dlx2 zeigt, dass die Neurosphären keine dorsomedialen Zellen oder Zellen des ventralen Telenzephalons enthalten. Insgesamt zeigen diese PCR Analysen ein Expressionsprofil für Neurosphären, das mit dem des Neokortex übereinstimmt und weisen daher auf eine saubere Präparation hin.

Als nächstes wurden die Neurosphären auf ihre Expression von Nestin, einem intermediären Filament, welches in Stammzellen des ZNS vorzufinden ist, untersucht (Gilyarov 2008). Nestin wird sowohl in den undifferenzierten Neurosphären als auch in der ausdifferenzierten Zellkulturen exprimiert und lässt auf ein weiteres Vorhandensein potenter Stammzellen unter Differenzierungsbedingungen zurückschließen. Entsprechend wurden auch die RGC spezifischen Genprodukte für BLBP und GLAST während der gesamten untersuchten Zeit exprimiert und zeigen keine Unterschiede auf (Hartfuss et al. 2001). Anders bei dem Astrozyten spezifischen Marker GFAP (Eng et al. 2000) und dem Neuronen spezifischen Marker Map2. Diese werden im undifferenzierten Zustand nicht exprimiert. Dies lässt darauf schließen, dass nur potente Stamm- und Vorläuferzellen im undifferenzierten Stadium der in Kultur gehaltenen Neurosphären zu finden sind, und dass es erst unter Entzug von bFgf/EGF zu einer Ausdifferenzierung in Neurone und Gliazellen kommt. Bereits 7 Tage nach Beginn der Differenzierung werden GFAP und Map2 exprimiert, wobei die GFAP<sup>+</sup> Banden gleich stark erscheinen und keine Unterschied zueinander aufzeigen. Das Map2-Signal ist jedoch in der *Gli3*-Mutante reduziert. Dies entspricht einer geringeren Map2<sup>+</sup> Zellzahl in der Zellkultur und gibt einen ersten Hinweis auf eine beeinträchtigte Bildung von Neuronen aus *Gli3* mutierten Neurosphären (Abb.20).

#### **3.4.4 Analyse der Proliferationsfähigkeit und Vitalität von Neurosphären**

Einer Veröffentlichung von Palma zufolge, der aus *Gli3*-mutantem Telenzephalon zum Zeitpunkt E14.5 und P0 Neurosphären isolierte und

charakterisierte, ist von einer reduzierten Proliferations- und Überlebensrate berichtet worden (Palma and Ruiz i Altaba 2004). Um Aufschluss über mögliche Veränderungen bezüglich der Proliferation bzw. dem Zelltod bei E12.5 zu gewinnen wurden Antikörperfärbungen gegen BrdU und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Bei BrdU handelt es sich um ein synthetisches Thymidin-analogon, das während der S-Phase wie das strukturell verwandte Thymidin in die DNA eingebaut wird. Es diene somit zur Bestimmung der Proliferationsrate der Neurosphären. Der BrdU Einbau wurde mittels eines monoklonalen Anti-BrdU-Antikörpers immunhistochemisch bestimmt. Dazu wurde BrdU direkt ins Kulturmedium appliziert und die Zellen im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Propidiumiodid dient als Marker für apoptotische Zellen, da es die Plasmamembran toter Zellen, aber nicht durch die intakte Membran lebender Zellen eindringen kann und dort durch Interkalation die DNA im Zellkern anfärbt. PI wurde dabei ebenfalls direkt ins Kulturmedium appliziert und die Zellen wurden für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert, gewaschen und entsprechend fixiert um direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet zu werden. Dabei zeigte sich nach einer 2 h langen Inkubation mit BrdU und dessen Einbau in alle sich in der S-Phase befindlichen Zellen kein signifikanten Unterschied zum Wildtyp ( $17.7 \pm 2.0\%$  BrdU<sup>+</sup> Zellen im Wildtyp,  $18.4 \pm 1.6\%$  in *Gli3*-Mutanten, n=9). Vielmehr lassen die Färbungen erkennen, dass sich die teilenden Zellen homogen über das gesamte Zellaggregat verteilen (Abb.21A,B). Ebenfalls keine Abweichung zum Wildtyp zeigen die auf Zelltod untersuchten und mit PI markierten Neurosphären. Es sind  $13.3 \pm 1.3\%$  (n=9) PI<sup>+</sup> Wildtypzellen zu  $14.0 \pm 0.8\%$  (n=9) PI<sup>+</sup> Mutantenzellen zu zählen (Abb.21C,D). Diese abgestorbenen Zellen wiederum sind vermehrt im Zentrum des Zellaggregates vorzufinden. Zusätzlich war es möglich die isolierten Neurosphären unter geeigneten Bedingungen, ohne Einbuße der Vitalität oder Morphologie, über mehrere Wochen zu kultivieren, .Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass *Gli3* zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Proliferationsrate und Vitalität der Neurosphären aus dem E12.5 dorsalen Telenzephalon ausübt (Abb.21E).

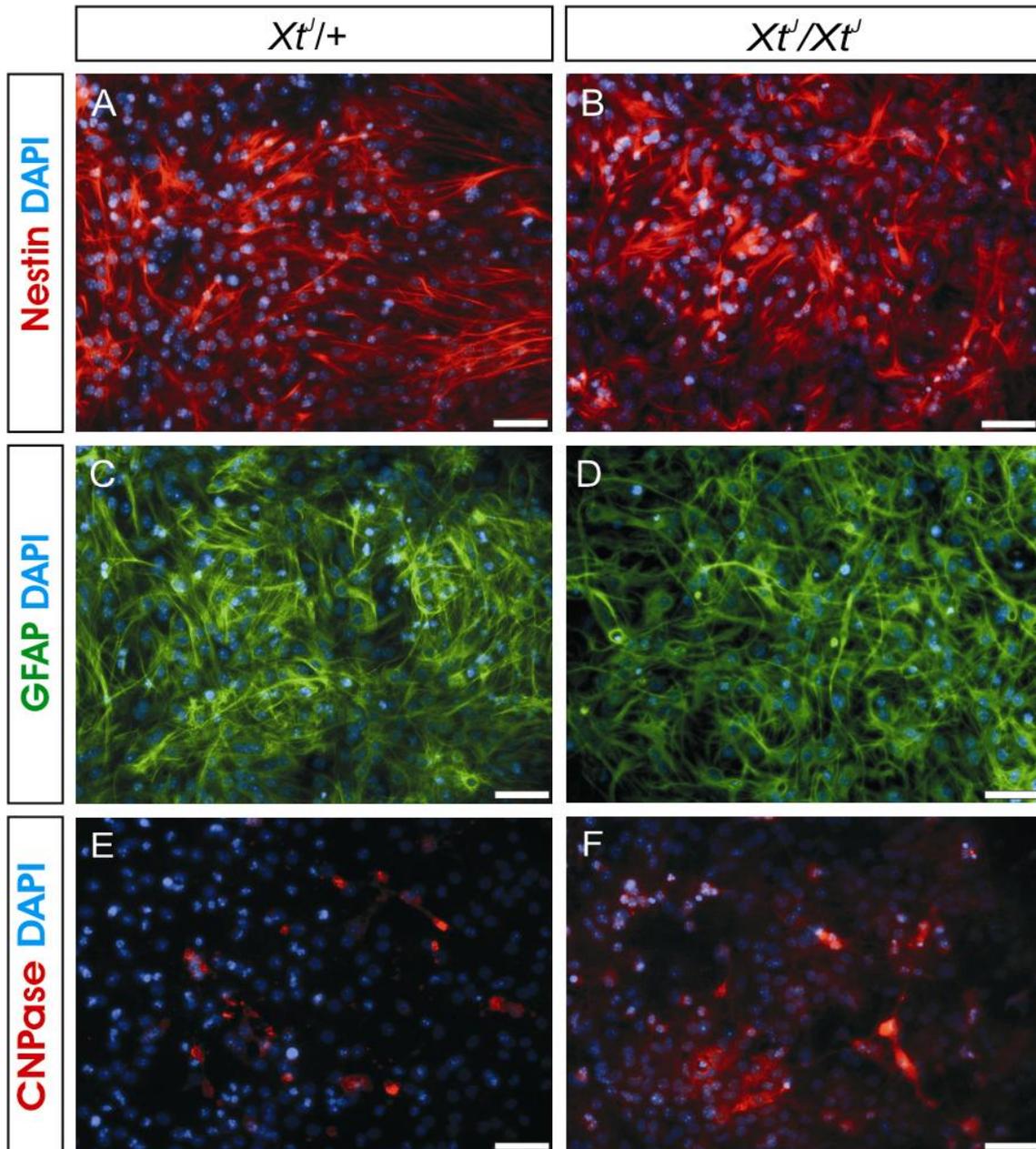


**Abb.21:** Keine Veränderungen bezüglich der Proliferationsfähigkeit und Vitalität

**A.+B.** Untersuchung der Proliferationsfähigkeit isolierter Neurosphären auf Kryostatanschnitten. Die *BrdU*<sup>+</sup> Zellen zeigen sowohl im Wildtyp als auch in der *Gli3*-Mutante eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Zellaggregat. **E.** Auszählungen *BrdU*<sup>+</sup> Zellen zeigten bezüglich der Proliferationsfähigkeit keine Unterschiede. **C.+D.** Untersuchungen des Zelltodes auf Kryostatanschnitten wiesen auf eine Anhäufung *PI*<sup>+</sup> Zellen in der Mitte der Zellaggregate. **E.** Auszählungen dieser *PI*<sup>+</sup> Zellen zeigten bezüglich dem Wildtyp keine Veränderungen (n=9). Balken A.-D. 50µm, *DAPI* (blau) Zellkern spezifischer Marker.

### 3.4.5 Gliale Differenzierung von Neurosphären

Durch die vorangegangenen Antikörperfärbungen aufgezeigten ektopischen RGC Expressionen im dorsalen Telenzephalon stellte sich als nächstes die Frage, ob die *Gli3*-mutanten Neurosphären, im Vergleich zum Wildtyp, das gleiche Potential besitzen sich in gliale Zellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) zu differenzieren. Um die Differenzierung in die gliale Zellrichtung voranzutreiben wurden die Neurosphären für jeweils 7 und 14 Tage unter Entzug von bFgf2 und EGF und unter der Zugabe von 2% bzw. 5% FCS kultiviert. Anschließend wurden nach Fixierung Antikörperfärbungen durchgeführt. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den Zellkulturen mit 2% FCS und denen mit 5% FCS feststellbar, so dass sich alle nachfolgenden Angaben auf 5%-haltige FCS Kulturen beziehen. Diese wurden zum einen mit einem Nestin-spezifischen Antikörper überprüft, ob nach Differenzierung noch Stamm- oder Vorläuferzellen vorhanden sind. Die Färbungen zeigten sowohl im Wildtyp als auch bei der Mutante Nestin<sup>+</sup> Zellen, die sich dicht aneinander liegend, mit mehreren breit gefächerten Zellfortläufern und einem deutlich, mit DAPI angefärbten, hervorgehobenen Zellkern präsentieren. Die Zelldichte schien bezüglich der Nestin<sup>+</sup> Zellen nicht verändert zu sein. Sie nahm jedoch am Tag 14 der Differenzierung sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante ab (Abb.22A,B). Als Markierung von differenzierten Astrozyten dienten GFAP-spezifische Antikörper. Auch hier konnte im direkten Vergleich kein Unterschied bezüglich der GFAP<sup>+</sup> Zellen festgestellt werden. Diese Zellen besitzen ebenfalls einen mit DAPI markierten und im Zellsoma zentral liegenden Zellkern. Mehrere Zellfortläufer ziehen in alle Richtungen und bildeten dadurch einen dichten Zellrasen, ihre Länge nahm dabei im Vergleich von Tag 7 auf Tag 14 zu (Abb.22C,D). Ferner wurden Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen CNPase angefärbt. Auch hier zeigten sich keinerlei Veränderungen in Form oder Zahl im Vergleich zum Wildtyp. Generell war die Zahl CNPase<sup>+</sup> Zellen deutlich kleiner als die der GFAP<sup>+</sup> Zellen (Abb.22E,F).



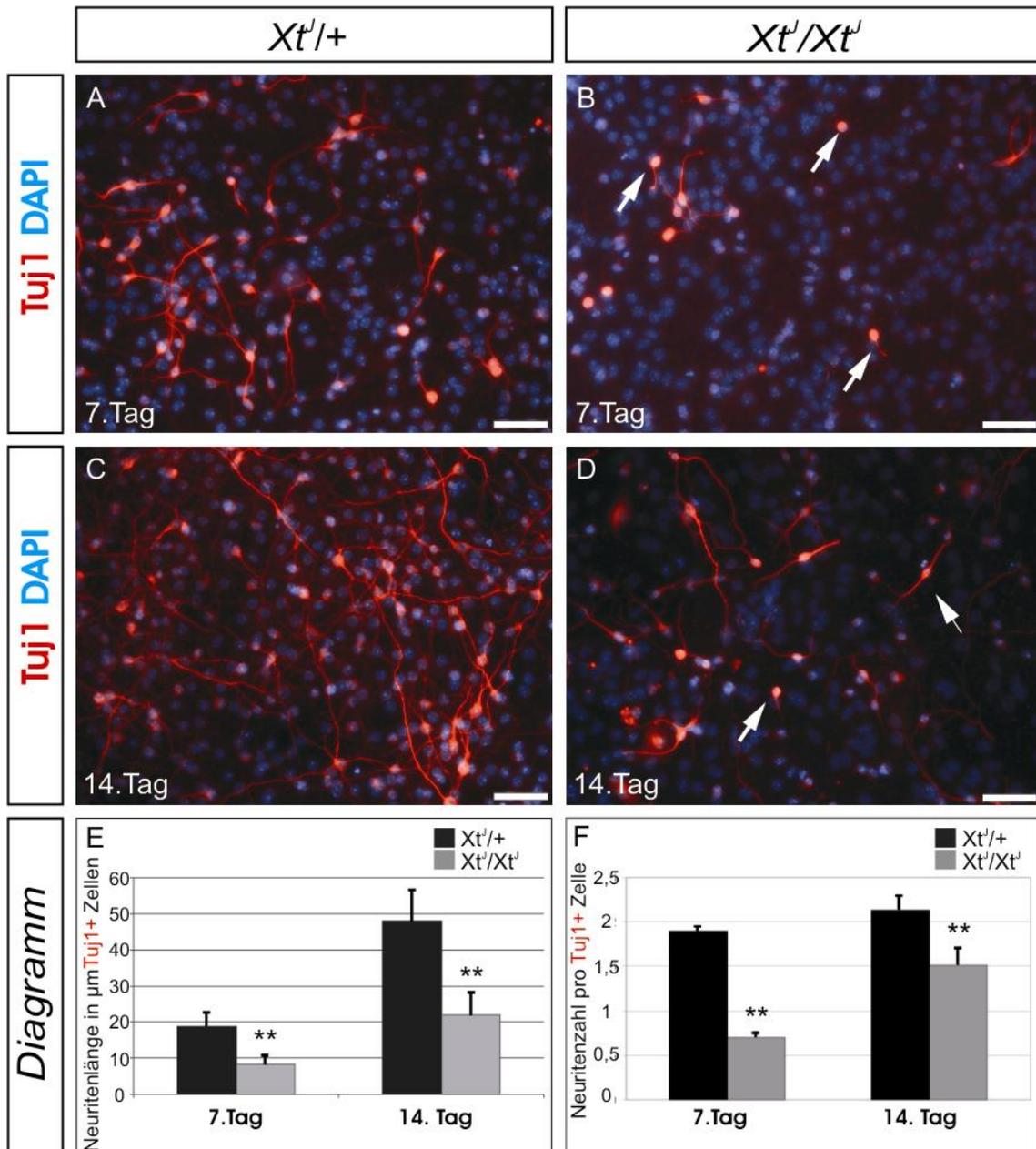
**Abb.22:** Zellkulturaufnahmen ausdifferenzierter Neurosphären in gliale Zellrichtung nach 14 Tagen

**A.+B.** Im Differenzierungsmedium wachsende Neurosphären zeigen ein gleich dichtes *Nestin*+ Signal, einem Stammzellen spezifischen Marker. Diese Zellen erscheinen mit einem großen, das Zellsoma ausfüllendem Zellkern (*DAPI*), langen dünnen Fortläufern und sind dem Wildtyp zahlenmäßig gleichgestellt. **C.+D.** In Astrozyten ausdifferenzierte Neurosphären erscheinen *GFAP*+ in Form eines dichten Zellrasens, der vor allem durch das verstrickte Netzwerk vieler einzelner Zellfortläufer charakterisierbar ist. Es können keine Unterschiede bezüglich des Wildtyps gezogen werden. **E.+F.** Die *CNPase*+ Oligodendrozyten zeigen in den mutierten Neurosphären keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Sie erscheinen mit einem klumpenhaften Zellsoma, dünnen, sehr kurzen Zellfortläufern und sind den Astrozyten zahlenmäßig unterlegen. Balken A.-F. 50µm, *DAPI* (blau) Zellkern spezifischer Marker

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung in Gliazellen nicht durch *Gli3* beeinflusst wird. Das Potential der Neurosphären, sich in Astrozyten als auch in Oligodendrozyten zu differenzieren, ist nicht vermindert.

### 3.4.6 Gestörte neuronale Differenzierung *Gli3*- Neurosphären

Bedingt durch die zuvor beobachtete ektopische Expression von RGC Markermolekülen im dorsalen Telenzephalon der *Gli3*-Mutante war die nächste Frage, inwieweit Neurosphären das Potential haben, sich in neuronale Zellen zu differenzieren. Dafür wurden die Neurosphären gleichfalls für jeweils 7 und 14 Tage unter Entzug von bFgf/EGF und unter Zugabe von 2% bzw. 5% FCS kultiviert. Anschließend wurden nach Fixierung, Antikörperfärbungen gegen  $\beta$ Tubulin (Tuj1) und Map2 durchgeführt, die spezifisch für Neurone sind. Dabei zählt Tuj1 zu den ersten neuronalen Markern, die während der kortikalen Entwicklung zu sehen sind und ist insbesondere in der Lage Axone zu markieren (Lee and Mihailoff 1990). Map2 wird hingegen im Zytoskelett von Dendriten gefunden und spielt eine wichtige Rolle bei deren Differenzierung (Ludin and Matus 1993; Belanger et al. 2002). Die hier beschriebenen Ergebnisse sind auf die 5%-haltigen FCS Kulturbedingungen bezogen, da diese die gleichen Resultate erbrachten, wie die Kultivierung unter 2% FCS. Bereits nach sieben Tagen konnten sowohl in der Wildtyp- als auch der Mutantenkultur Tuj1<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden. Allerdings war ihre Anzahl in der *Gli3*-mutanten Kultur reduziert. Auffällig waren auch die verminderten und verkürzten Axone. Diese Beobachtung wurde am Tag 14. der Differenzierung noch deutlicher. So ließen sich beim Wildtyp 364 $\pm$ 17.5 Tuj1<sup>+</sup> Zellen pro 24 Lochplatte im Vergleich zu *Gli3* Neurosphären 204.4 $\pm$ 17,4 Tuj1<sup>+</sup> Zellen finden. Beim einem weiteren Vergleich der Zellfortläufer des Wildtyps (Abb.22A,C) mit den Fortläufern der Mutante (Abb.23B,D) fiel auf, dass die *Xt<sup>l</sup>/Xt<sup>l</sup>* Neurone wenige, verkümmerte und deutlich dünnere Axone ausbildeten. Diesen ersten Eindruck konnten nachfolgende Auswertungen bestätigen, in denen ersichtlich wurde, dass im Durchschnitt jedes Wildtyp Neuron 2.1 $\pm$ 0.17 Axone mit einer Länge von 48.0 $\pm$ 8.7 $\mu$ m besaß, wohingegen Mutantenneurone im Durchschnitt 1.5 $\pm$ 0.2 Axone mit einer auf über die Hälfte reduzierten Länge von 22 $\pm$ 6.5 $\mu$ m aufwiesen (Abb.23E,F).

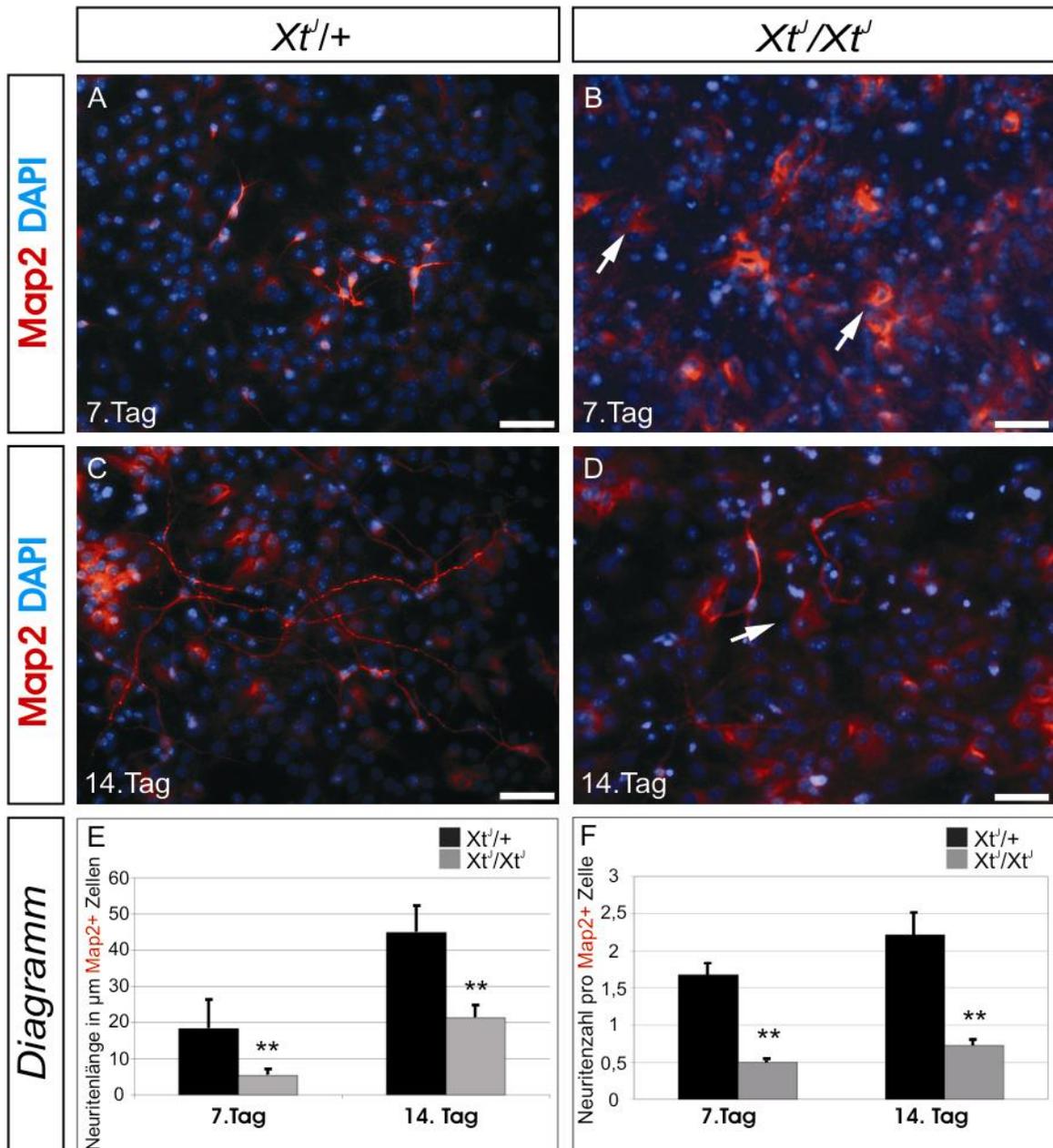


**Abb.23:** Gestörte neuronale Differenzierung in der *Gli3*-Mutante gezeigt an Tuj1<sup>+</sup> Zellen

**A.** Nach 7 Tagen im Differenzierungsmedium entwickelten sich aus den Neurosphären des Wildtyps Tuj1<sup>+</sup> Neurone mit deutlichen Zellfortläufern. **B.** *Gli3*-Mutanten Neurosphären entwickelten im selben Zeitraum weniger Tuj1<sup>+</sup> Neurone mit stark verkürzten bzw. fehlenden Zellfortläufern (Pfeil). **C.** Nach insgesamt 14 Tagen im Differenzierungsmedium nahm die Zahl an Tuj1 exprimierenden Neurone zu und ein weites Netzwerk aus langen Zellfortläufern, das sich in ihrem Verlauf weiter verzweigte, prägte das Bild. **D.** In der *Gli3*-Kultur lag die Zahl Tuj1<sup>+</sup> Zellen weit hinter dem Wildtyp zurück. Die Neurone bildeten wenige und deutlich verkümmerte, verkürzte Zellfortläufer aus (Pfeil), weshalb sich kein vergleichbares Netzwerk ausbilden konnte. **E.** Auszählungen Tuj1<sup>+</sup> Zellen bestätigen die verkürzten Zellfortläufer der Mutante in  $\mu\text{m}$  und Abhängigkeit zum Differenzierungstag. **F.** Weitere Auszählungen zeigen eine stark reduzierte Zahl an Zellfortläufern, die pro Tuj1<sup>+</sup> Zelle entspringen. Dabei bildeten am 7. Tag der Differenzierung wildtypische Neurone im Schnitt 1,89 Fortläufer, Neurone der Mutante bildeten im Vergleich dazu 0,54 Fortläufer pro Zelle \*\* =  $p < 0,001$ , Balken A.-D. 50 $\mu\text{m}$ , DAPI (blau) Zellkern spezifischer Marker .

Ähnlich deutliche Ergebnisse konnten auch bei den Map2<sup>+</sup> Zellen festgestellt werden. So war auch hier ihre Anzahl mit 86±8.4 Map2<sup>+</sup> Xt<sup>l</sup>/Xt<sup>l</sup> Zellen zu 274±29.6 Wildtyp Zellen um nahezu 66% reduziert. Bei höherer Vergrößerung (Abb.24 C,D) konnte man diese an ihrem groß erscheinenden, rot angefärbten Zellsoma und einem deutlich abgrenzbaren DAPI<sup>+</sup> Zellkern erkennen. Weiterhin fielen auch hier die wenigen, teilweise vollständig fehlenden und verkürzten, Dendriten ins Auge (Abb. 24 B,D), die im Wildtyp ein dichtes Netzwerk bildeten und zu allen Seiten auswuchsen. Im Schnitt besaß jedes Wildtypneuron 2.2±0.3 Fortläufer mit einer Länge von 44.9±7.5µm, wohingegen *Gli3* mutierte Neurone deutlich weniger Fortläufer (0.72±0.1) mit einer ebenfalls auf über die Hälfte reduzierten Länge von 21.3±3.7µm aufwiesen (Abb. 24E,F).

Diese Ergebnisse lassen die Folgerung zu, dass es bei der *Gli3*-Mutante zu einem Defekt der neuronalen Differenzierung kommt. Es werden zwar Neurone gebildet, diese sind jedoch in ihrer Gesamtzahl reduziert. Weiterhin unterliegen sie morphologischen Veränderungen, sichtbar an der reduzierten Axonenzahl pro Zelle und zum anderen an den verkürzten Axonen, deren Fähigkeit zur Ausbildung eines Dendritenbaumes eingeschränkt ist.

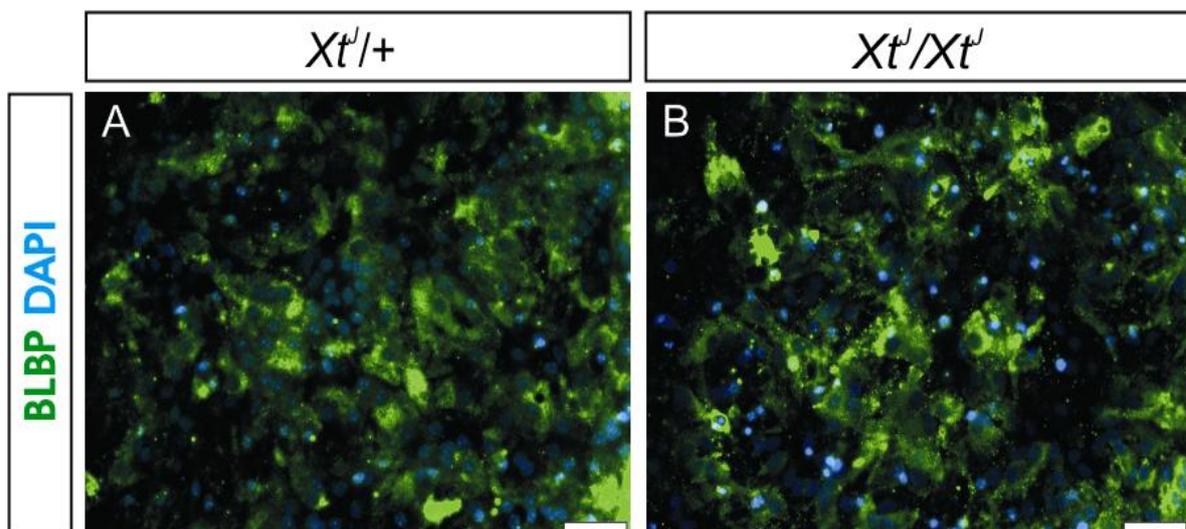


**Abb.24:** Gestörte neuronale Differenzierung in der *Gli3*-Mutante gezeigt an  $Map2^{+}$  Zellen

**A.** Diese Aufnahme zeigt eine Ansammlung 7 Tage alter  $Map2^{+}$  Neurone mit kurzen Zellfortläufern, die sich aus Wildtyp Neurosphären differenziert haben. **B.** *Gli3*-Mutanten Neurosphären bilden im selben Zeitraum weniger  $Map2^{+}$  Neurone mit stark verkürzten bzw. größtenteils fehlenden Zellfortläufern (Pfeil). **C.** 14 Tage alte  $Map2^{+}$  Neurone nehmen an Zellmasse zu und bilden zunehmend längere Zellfortläufer, die wiederum ein Netzwerk ausbilden. **D.** Dieses Netzwerk fehlt den in der Zellzahl stark reduzierten  $Map2^{+}$  Neurone aus *Gli3*-Neurosphären, da sie fast keine Zellfortläufer ausbilden (Pfeil). **E.** Auszählungen mehrerer Zellkulturlochplatten bestätigen deutlich verkürzte Zellfortläufer in der Mutante in Abhängigkeit zum Differenzierungstag, wobei am 14. Tag die Fortläuferlänge bis auf die Hälfte verkürzt ist. **F.** Dieses Diagramm zeigt eine stark reduzierte Zellfortläuferzahl pro  $Map2^{+}$  Zelle. Während wildtypische Neurone im Schnitt bis zu 2,2 Fortläufer ausbilden, kommen die *Gli3*-Neurone auf lediglich 0,7 Fortläufer. \*\* =  $p < 0,001$ , Balken A.-D. 50 $\mu$ m, DAPI (blau) Zellkern spezifischer Marker.

### 3.4.7 Erhöhte RC2<sup>+</sup> Vorläuferzellzahl in ausdifferenzierten Neurosphären

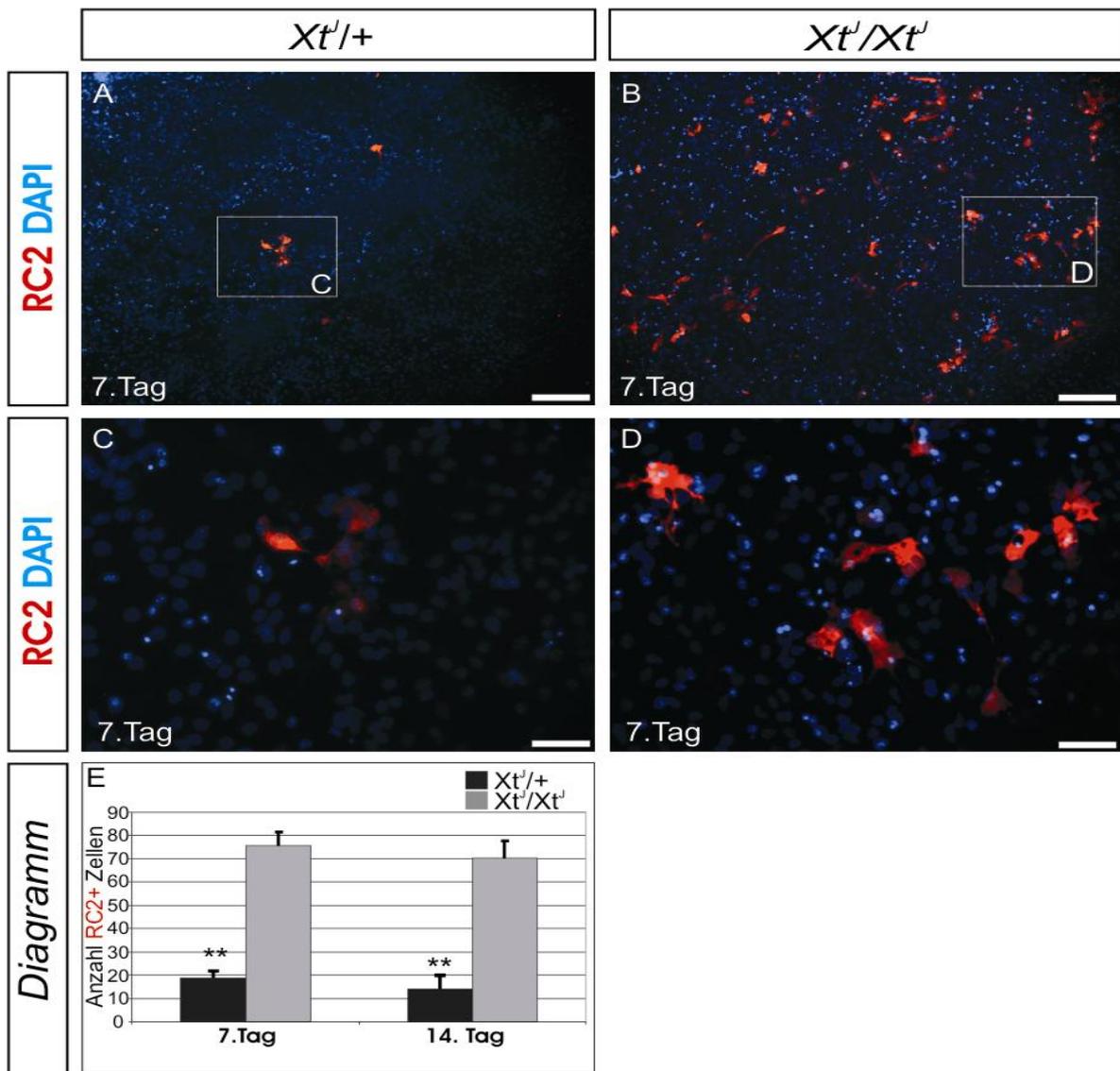
Aufgrund der reduzierten Zahl an Neuronen unter neuronalen Differenzierungsbedingungen, stellte sich die Frage, ob eine reduzierte oder vermehrt neurale Vorläuferzellzahl vorhanden ist. Schließlich konnten vorab in der *Gli3*-Mutante ektopische RGC Expressionen festgestellt werden, so dass unter identischen Differenzierungsbedingungen, wie sie für die Gliogenese als auch für die Neurogenese angewendet wurden, Antikörperfärbungen für BLBP<sup>+</sup> und RC2<sup>+</sup> Zellen durchgeführt wurden. Nach 7 als auch 14 Tagen zeigten sowohl Wildtyp als auch Mutante ähnliche Vorkommen von BLBP<sup>+</sup>Färbungen. Das Zellsoma war mit dem mittig liegenden DAPI<sup>+</sup> Zellkern gut zu erkennen. Die BLBP<sup>+</sup> Zellen bildeten ein verstricktes Netzwerk untereinander aus und ließen dadurch einen dichten Zellrasen entstehen. Eine Auszählung der Zellen war dadurch nicht möglich (Abb.25).



**Abb.25:** Zellkulturaufnahme ausdifferenzierter BLBP<sup>+</sup> Zellen nach 14 Tagen

**A+B.** Die grün dargestellten BLBP<sup>+</sup> Zellen erscheinen sowohl im Wildtyp als auch in der *Gli3*-Mutante in einem dichten Netzwerk. Dabei ist das Zellsoma mit dem zentral liegenden blauen DAPI<sup>+</sup> Zellkern deutlich zu erkennen und es lassen sich kurze Ansätze von Fortläufern beobachten. Allerdings kann aufgrund der hohen Dichte keine offensichtliche Veränderung gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. A.B. 50µm

Anders ist es hingegen bei den RC2<sup>+</sup> Zellen. In beiden Zellkulturen konnten RC2<sup>+</sup> Zellen mit einem auffällig dicken Zellsoma, einem randständigem DAPI<sup>+</sup> Zellkern und mehreren kleinen Zellfortläufern beobachtet werden (Abb.26).



**Abb.26:** Erhöhte Anzahl  $RC2^+$  Zellen in der Differenzierungskultur aus *Gli3*-Neurosphären

**A.** Die Übersichtsaufnahme mit 5facher Vergrößerung zeigt wenige rot markierte,  $RC2^+$  exprimierende Zellen auf einem mit DAPI (blau) gefärbten Hintergrund. Dabei kann es sich sowohl um neuroepitheliale Vorläuferzellen als auch um RGC handeln. **C.** Unter Vergrößerung lassen sich zwei dieser Zellen mit einem ovalen Zellsoma und randständigem Zellkern erkennen. Die Fortläufer sind kurz und sehr fein dargestellt. **B.** Die Übersichtsaufnahme zeigt hindessen eine erhöhte Anzahl  $RC2^+$  Zellen. **D.** In der Vergrößerung scheinen sie in ihrer Morphologie nicht gestört zu sein. **E.** Auszählungen zum 7. und 14. Differenzierungstag zeigen eine deutliche Überproduktion an  $RC2^+$  Zellen in der *Gli3*-Kultur. Pro Kulturplatte sind im Wildtyp etwa 19  $RC2^+$  Zellen vorzufinden, die *Gli3*-Neurosphären produzieren hingegen in der selben Zeit bis zu 74  $RC2^+$  Zellen. \*\* =  $p < 0,001$ , Balken A.B. 200 $\mu$ m C.D. 50 $\mu$ m, DAPI (blau) Zellkern spezifischer Marker.

Doch schon nach sieben Tagen in Kultur waren hier große Unterschiede zu verzeichnen. Während in der wildtypischen Kultur vereinzelt liegend  $RC2^+$  Zellen (18 $\pm$ 2,6 (n=7)) zu sehen waren, fand man in der Mutantenkultur, dichter

zusammenliegend, im Durchschnitt  $75,7 \pm 6,0$  ( $n=7$ ) Zellen. Diese Beobachtung setzte sich auch am Tag 14 der Zellkultur fort, so dass auch hier weniger  $RC2^+$  Zellen in der wildtypischen Zellkultur ( $14 \pm 5,3$  ( $n=6$ )), im Vergleich zur Mutantenkultur sichtbar waren ( $70,3 \pm 7,7$  ( $n=6$ )).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich somit deuten, dass zwar keine Veränderungen für  $BLBP^+$  Vorläuferzellen zu sehen sind, doch dass  $RC2^+$  Zellen in der Mutante vermehrt produziert werden und/oder sich nicht weiter differenzieren können und als Vorläuferzellen bestehen bleiben.

## 4. Diskussion

Unser Gehirn besteht aus Milliarden von Neuronen, Verbindungen und einer Fülle von Gliazellen, wobei der Neokortex von Säugetieren zu den komplexesten Struktur zählt. Daher wurden in den letzten Jahren verstärkt Untersuchungen vorangetrieben die Mechanismen zu verstehen, die zur Bildung einer solchen Struktur führen. Die neu aufkommende Bedeutung von radialen Gliazellen als neuronale Vorläuferzellen, deren zunehmende Charakterisierung und die mögliche Unterscheidung von basalen Vorläuferzellen, hat das Bild der kortikalen Stamm- und Vorläuferzellen enorm verändert (Culican et al. 1990; McKay 1997; Alvarez-Buylla et al. 2001; Hartfuss et al. 2001; Gotz and Huttner 2005). Dennoch ist das Wissen bezüglich der Gene und Moleküle, die für eine geordnete Ausbildung und regionale Differenzierung von RGCs verantwortlich sind, sehr gering. Schließlich kommt diesen molekularen Mechanismen nicht nur die Bedeutung für die geregelte Bildung der unterschiedlichen Zelltypen des zerebralen Kortex zu, sie sind auch an der Bildung einer korrekten Anzahl von neuronalen und glialen Zelltypen beteiligt. Daher wurde in dieser Arbeit die Rolle des *Gli3*-Zinkfinger-Transkriptionsfaktors bezüglich dieser Prozesse untersucht.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit konnte mit Hilfe von ISH und Fluoreszenzfärbungen unter dem Verlust von *Gli3*, eine erhöhte ektopische Expression von RGC Markern im zerebralen Kortex von *Gli3* mutierten Embryonen zeigen, die eine ektopische Koexpression mit *Wnt7b* aufweisen und sich zu klumpenartigen Ansammlungen anlagerten. Dieser Phänotyp war unter zusätzlichem Verlust von *Wnt7b* in der *Gli3*-Mutante verstärkt ausgeprägt. In diesen Embryonen zeigte sich eine nahezu durchgehend ektopische Expression von RGC Markern im zerebralen Kortex. Abschließend konnte im zweiten experimentellen Abschnitt dieser Arbeit bei *Gli3* mutierten Neurosphären eine reduzierte Anzahl an produzierten Neuronen mit einer verminderten Ausbildung an Neuriten festgestellt werden. Gleichzeitig verbleiben die *Gli3* mutierten Neurosphären vermehrt im RGC-Stadium, so dass von einem beeinträchtigten neuronalen Differenzierungspotential auszugehen ist.

#### 4.1. Ektopische Expression RGC spezifischer Marker im Neokortex der *Gli3*-Mutante

Bereits frühere Studien konnten *Gli3* eine Funktion während der Musterbildung und Regionalisierung des Telenzephalons zeigen. So ist bekannt, dass in *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>* Mäuseembryonen wichtige Strukturen des dorsalen Telenzephalons fehlen, die Expression von *Emx1/Emx2* wie auch *Pax6* reduziert ist und eine veränderte Expression von *Fgf8*, *Bmp4* und *Wnt7b* aufweisen (Theil et al. 1999; Tole et al. 2000; Kuschel et al. 2003; Fotaki et al. 2006). Jedoch richteten diese Arbeiten den Fokus nicht auf die Rolle von *Gli3* in der Beeinflussung und Steuerung der Produktion von kortikalen Vorläuferzellen, obwohl von ersten Hinweisen auf eine gestörte Neurogenese in der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante zum Zeitpunkt E11.5 berichtet wurde (Theil 2005). Daher wurde in dieser Arbeit, mit Hilfe weiterer Analysen, einer möglich defekten Neurogenese nachgegangen. Es konnten bereits für die basalen Vorläuferzellen zum Zeitpunkt E11.5 die ersten Unterschiede festgestellt werden. Die Anzahl *Tbr2<sup>+</sup>* basaler Vorläuferzellen ist in der *Gli3*-Mutante deutlich reduziert. Es ist bekannt, dass eine verstärkte *Tbr2* Expression in Wildtypembryonen mit einer schwächeren Expression des dorsalen *Pax6* Gradienten einhergeht (Englund et al. 2005). So wird *Pax6* zunächst im Neuroepithelium der VZ stark exprimiert und beeinflusst so die Proliferation der neuroepithelialen Vorläuferzellen. Wenn sich zum Zeitpunkt E14,5 die SVZ ausbildet, wird die *Pax6* Expression jedoch in den Zellen dieser Schicht abgeschaltet und das Aufkommen des T-box Transkriptionsfaktors *Tbr2* kann beobachtet werden (Caric et al. 1997; Land and Monaghan 2003; Schuurmans et al. 2004; Englund et al. 2005). Vorangehende Untersuchungen der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante konnten diesbezüglich einen gestörten *Pax6*-Gradienten aufzeigen (Kuschel et al. 2003; Theil 2005), so dass die reduzierte Anzahl *Tbr2<sup>+</sup>* basaler Vorläuferzellen in der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante möglicherweise in diesem Zusammenhang gesehen werden kann. Schließlich zeigen *Pax6* Knockout-Mäuse im lateralen Kortex des Telenzephalons, der Region mit der höchsten *Pax6* Expression, einen Verlust von *Tbr2<sup>+</sup>* basalen Vorläuferzellen (Quinn et al. 2007). Jedoch zeigt sich in der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante bereits zum Zeitpunkt E12.5 im

vergleich zum Wildtyp keine Abweichungen mehr, so dass von einer kompensierenden Überproduktion der basalen Vorläuferzellen auszugehen ist. Der Mechanismus und die Bedeutung dieser Beobachtungen konnte jedoch aufgrund der erheblichen phänotypischen Veränderungen des Neokortex der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante zum späteren Zeitpunkt nicht weiter nachgegangen werden und die Untersuchung denkbarer Auswirkungen auf die Kortextentwicklung war nicht möglich. Vergleichende Analysen der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante versus der *Pdn*-Mutante, einer Mausmutante mit einem abgemildertem *Gli3*-Phänotyp, können eventuelle Auswirkungen auf die basalen Vorläuferzellen zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt aufklären.

Anders verhält es sich unterdessen bei den radialen Gliazellen. Es kann bereits zum Zeitpunkt E11.5 eine erhöhte Bildung von BLBP<sup>+</sup> und GLAST<sup>+</sup> RGC im Neokortex festgestellt werden, dessen Überexpression sich zum Zeitpunkt E12.5 verstärkt. Diese entstammen dem Telenzephalon, wie die Doppelfärbungen für GLAST/FoxG1 zeigen und widerlegen so die Annahme, dass diese Zellen aus dem Dienzephalon eingewandert sind (Fotaki et al. 2006). Somit kann *Gli3* in die Liste weiterer Transkriptionsfaktoren wie *Emx2*, *Pax6*, *Tbr2* oder *Hes 1* und *5* aufgenommen werden, welche alle eine Rolle in der Entstehung und Produktion von RGC spielen und sich gegenseitig beeinflussen. So ist z.B. bekannt dass *Emx2*, in einem gegenläufigen kaudal-medialen Gradienten zu *Pax6* exprimiert wird und die Anzahl von Vorläuferzellen stimulieren kann, eine symmetrische Zellteilung begünstigt und Vorläuferzellen mit der Fähigkeit ausstattet, sich in multiple Zelllinien zu differenzieren, die sowohl Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten beinhalten (Bishop et al. 2000; Heins et al. 2001). Ähnlich verhält es sich mit *Pax6*, das bevorzugt in einem rostral-lateralen Gradienten für die Differenzierung der Vorläuferzellen Sorge trägt (Heins et al. 2002; Haubst et al. 2004; Englund et al. 2005). Untersuchungen zu *Hes 1* und *Hes 5* konnten zudem zeigen, dass der Verlust dieser Gene zu einer frühzeitigen Differenzierung von neuroepithelialen Zellen in Neurone führt und es bei RGC ebenfalls zu einer einseitigen, verfrühten Produktion von Neuronen kommt (Hatakeyama et al. 2004). Doch anders als bei diesen Transkriptionsfaktoren,

kommt es in der *Gli3*-Mutante zu keiner globalen Auswirkung auf die Produktion von RGC. Sie äußert sich vielmehr durch eine lokal begrenzte, clusterförmige Überproduktion BLBP<sup>+</sup> und GLAST<sup>+</sup> RGC. Diesen Zellen konnte zudem eine Koexpression mit *Wnt7b* nachgewiesen werden, was Vermuten lässt, dass BLBP und *Wnt7b* in der Lage sind, sich gegenseitig zu beeinflussen.

#### 4.2 BLBP und seine Bedeutung während der kortikalen Entwicklung

Die doppelte Rolle radialer Gliazellen, sowohl als Leitstruktur für wandernde kortikale Neurone, als auch als neuronale Vorläuferzelle zu fungieren, ließen die Vermutung nach gemeinsamen Signalen aufkommen. Diesen Signalen wird eine Rolle in der Entstehung von RGC und Neuronen als auch in der Steuerung neuronaler Zellwanderung zugesprochen. Bedingt durch die Tatsache, dass entlang der RGC wandernde Neurone in der Lage sind deren Morphologie und Proliferation zu beeinflussen (Hatten 1985), wurde zuerst der Fokus auf eine Fülle von Neuronen exprimierten Signalen, Zelloberflächen-antigenen und Molekülen gerichtet, wie z.B. auch dem Notch-Signalweg (Gaiano et al. 2000; Gaiano and Fishell 2002; Patten et al. 2003). Beim Notch/Delta Signalweg handelt es sich um einen Signaltransduktionsweg, durch den Zellen auf äußere Signale reagieren können und z.B. durch die laterale Inhibition beeinflusst werden. Die Bindung des Liganden Delta an den Rezeptor Notch führt zur proteolytischen Abspaltung der intrazellulären Notch Domäne, die anschließend in den Zellkern wandert. Dort findet eine Interaktion mit CBF1 statt, einem Transkriptionsfaktor.

Doch im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen ist bisher wenig über die Aktivierung von Genen in RGC über den Notch/Delta Signalweg bekannt. Ein Kandidat hierfür ist z.B. das „brain lipid-binding protein“ (BLBP), ein Gen das dynamisch in RGC durch an ihnen entlang wandernden Neuronen reguliert wird und zum Zeitpunkt vermehrter Neuronenproduktion die höchste Expressionsrate aufweist (Feng et al. 1994; Kurtz et al. 1994; Feng and Heintz 1995). In dieser Arbeit dient BLBP als ein Marker früh gebildeter RGC. BLBP zählt zu einer großen Familie hydrophober Proteine, die als „fatty acid binding

proteins“ (FABP) bezeichnet werden, in unterschiedlichen Regionen des Körpers vorkommen und der Aufgabe nachgehen das Zellwachstum und die Differenzierung zu regulieren (Ross 1993; Owada et al. 1996). Untersuchungen mit Antikörpern gegen BLBP konnten einen Nachweis sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern erbringen und sprechen BLBP die Fähigkeit zu an Liganden binden zu können, um über eine Wechselwirkung mit Zellkernrezeptoren die Transkription verschiedener Produkte zu beeinflussen (Feng et al. 1994). Weiterhin konnte durch das blockieren von BLBP mit Hilfe von Antikörperexperimenten gezeigt werden, dass die gliale als auch neuronale Differenzierung *in vitro* unter dem Verlust von BLBP nicht mehr stattfindet und BLBP somit als Vermittler zwischen neuronalen und glialen Signalen agiert. Der Verlust von BLBP verhindert ein Auswachsen von Zellfortläufern der RGC in Kultur und es konnte zudem eine fehlende neuronale Zellwanderung entlang dieser verkürzten Fortläufer beobachtet werden, während die RGC Proliferation jedoch nicht beeinflusst ist (Feng et al. 1994). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für BLBP im Zusammenhang mit Schwannzellen beobachtet werden (Miller et al. 2003). Dabei kann normalerweise eine Koexpression von *Pax6* und BLBP in neuroepithelialen Vorläuferzellen beobachtet werden. Fehlt die Expression von *Pax6*, wie z.B. in der *Pax6<sup>Sey/Sey</sup>*-Mutante, so ist die BLBP Expression stark reduziert. Weiterhin konnte anhand funktionaler Knockouts von BLBP gezeigt werden, dass neuroepitheliale Vorläuferzellen in ihrer Proliferation gestört sind und vermehrt in die neuronale Differenzierung übergehen. Unterdessen führt eine ektopische Induktion von *Pax6* zu einer deutlichen Zunahme der BLBP Expression in diesen Zellen, so dass diese Beobachtungen BLBP als ein Zielgen von *Pax6* erscheinen lassen (Arai et al. 2005). Als ein möglicher Interaktionspartner für dieses Zusammenspiel aus neuronalen und glialen Signalen wird Notch vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von BLBP während der Entwicklung vom Transkriptionsverstärker CBF1 abhängig ist. Gleichzeitig konnten Untersuchungen an Knockoutmäusen für den Notch1 und Notch3 Rezeptor eine deutlich reduzierte BLBP Expression feststellen (Anthony et al. 2005). Außerdem wird nach Aktivierung von Notch1 eine verstärkte Expression von

RGC im embryonalen Mäusekortex beobachtet (Gaiano et al. 2000). Nach einer Überexpression von Notch1 zum Zeitpunkt E14,5 in kortikalen Vorläuferzellen zeigen diese ebenfalls eine zunehmende radiale Morphologie mit gesteigerter BLBP Expression (Li et al. 2008).

Diese Erkenntnisse machen BLBP somit zu einem ZNS-spezifischen Zielgen des Notch-Signalweges und zeigt dadurch eine vermittelnde Rolle in der Differenzierung von RGC zu Neuronen und deren Zellwanderung entlang der radialen Zellfortläufer auf, ein Vorgang, der wichtig für eine geordnete Entwicklung der einzelnen kortikalen Schichten des Kortex ist. Vorangegangene Analysen konnten zum Zeitpunkt E14,5, eine gestörte Laminisierung des zerebralen Kortex in der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante aufzeigen. Die VZ erscheint wellenartig desorganisiert und *Pax6<sup>+</sup>* Zellen erscheinen außerhalb dieser Zone. Weiterhin lagern sich *Map2<sup>+</sup>* als auch *Tbr1<sup>+</sup>* Neurone zu Clustern zusammen und sind nicht in der Lage die einzelnen Zellschichten auszubilden. So fehlen die klar voneinander zu unterscheidende Marginalzone, die Kortikalplatte sowie die Subventrikulärplatte in der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante (Theil 2005).

#### **4.3 Ektopische Expression RGC spezifischer Marker im Neokortex der *Gli3/Wnt7b*-Doppelmutante und der Einfluss von *Wnt7b***

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte eine ektopische *Wnt7b* Expression in kortikalen Vorläuferzellen der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante festgestellt werden. Jene präsentiert sich unregelmäßig und tritt in einer wellenartigen, gestreiften Form auf (Theil 2005). Diese Arbeit zeigt im zerebralen Kortex der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante, dass die ektopische wellenartige BLBP/GLAST Expression mit der Überexpression von *Wnt7b* übereinstimmt, und dass die RGC beide Signale koexprimieren. Hiernach wurde zunächst vermutet die ektopische *Wnt7b* Expression sei für das vermehrte Vorkommen RGC verantwortlich. Daher wurden aufgrund des Fehlens der *Wnt7b* Expression in der *Gli3/Wnt7b*-Doppelmutante und unter der Annahme einer Reduzierung von ektopischen BLBP und GLAST Expressionen, weitere Analysen bezüglich RGC angestellt.

Widererwartend konnte jedoch, statt einer Abnahme der ektopischen RGC Expression, eine zunehmende Bildung BLBP<sup>+</sup> und GLAST<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden. Somit kann *Wnt7b* eine neue Rolle zugesprochen werden, hemmend auf die Produktion von RGC zu wirken. Schließlich wird *Wnt7b* in Wildtypembryonen in einem gegenläufigen Gradienten zu BLBP/GLAST in der Ventrikularzone und dem dorso-medialen Telenzephalon exprimiert. Im kortikalen Saum findet hingegen eine überlappende Expression statt, während im dorso-lateralen Telenzephalon nur eine schwache *Wnt7b* Expression gefunden werden kann. Zusätzlich zeigt sich noch eine starke Expression in differenzierten Neuronen (Kim et al. 2001; Theil 2005). Interessanterweise konnte eine ektopische *Wnt7b* Expression in vorhergehenden Studien zum Zeitpunkt E11.5 festgestellt werden und korreliert mit hier beobachteten ektopischen BLBP<sup>+</sup>/GLAST<sup>+</sup> Expressionen dieser Arbeit (Theil 2005).

Dabei ist bereits bekannt, dass abhängig vom Entwicklungszeitpunkt, der kanonische *Wnt*-Signalweg als eine steuernde Instanz für die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen im zerebralen Kortex agiert. So besitzen *Wnt*-Signale zum Zeitpunkt E8-E10 einen mitogenen Effekt auf die steigende Anzahl kortikaler Vorläuferzellen, während später die Differenzierung im Vordergrund steht (Lee et al. 2000; Chenn and Walsh 2002; Chenn and Walsh 2003; Backman et al. 2005; Hirsch et al. 2007). Dennoch konnten Untersuchungen zur Überexpression von *Wnt7b* der *Gli3*-Mutante keine Aktivierung von Conductin zeigen, einem direkten Zielgen des kanonischen Signalwegs (Lustig et al. 2002) und lässt rückschließend vermuten, dass dieser Signalweg in der Mutante inaktiv ist (Theil 2005). Dessen ungeachtet ist aber zusätzlich bekannt, dass *Wnt*-Signale in der Lage sind mit Notch/Delta Signalen zu interagieren um auf diese Weise auf die Entstehung von RGC Einfluss nehmen zu können (Arias 2002; Anthony et al. 2005; Mizutani et al. 2007). Es gibt zwar noch weitere bekannte Faktoren, die einen Einfluss auf die BLBP Expression nehmen können, wie beispielsweise *Reelin*, dem ebenfalls eine Rolle in der Induktion eines RGC Phänotyps mit einer Steigerung der BLBP Expression zukommt (Hartfuss et al. 2003). Doch haben frühere Untersuchungen der *Xt<sup>l</sup>*-Mutante eine reduzierte Anzahl *reelin*<sup>+</sup> Cajal-Retzius

Zellen gezeigt. Diese präsentieren sich im Kortex zu Clustern zusammengelagert und mit einer deutlich verminderten *Reelin* Expression (Theil 2005). Gleichzeitig lässt sich in der *Gli3*-Mutante eine verstärkte Anzahl BLBP<sup>+</sup> Zellen erkennen, die zudem eine Überexpression von *Wnt7b* aufzeigen. Es konnte mit Hilfe von BLBP und Tuj1 Antikörpern in Doppelfärbungen gezeigt werden, dass es an Stelle einer ektopischen BLBP Expression zu einer traubenförmigen Zusammenlagerung Tuj1<sup>+</sup> Neurone in der Präplatte kommt. Diese werden von Tuj1<sup>-</sup> Stellen spaltengleich unterbrochen und korrelieren mit BLBP freien Bereichen. Diese Beobachtungen lassen somit an eine Interaktion zwischen dem Notch/Delta-Signalweg und dem kanonischen *Wnt*-Signalweg bei der BLBP Regulation denken. Zusätzlich zeigt sich während der späteren Entwicklung eine zunehmende Neurogenese nach in utero Elektroporation eines *Wnt7b* Konstruktes (Theil, zur Veröffentlichung eingereicht). Diese Beobachtung entspricht den Berichten vergangener Studien, die zeigen konnten, dass ebenfalls durch die Aktivierung des Notch-Signalweges über *Wnt*-Proteine eine verstärkte Neurogenese in postnatalen Vorläuferzellen stattfindet (Hirsch et al. 2007).

Somit kann *Gli3*, abhängig vom Entwicklungszeitpunkt durch eine kontrollierte Unterdrückung des *Wnt7b*-Signals, eine neue vermittelnde Rolle zugesprochen werden. *Gli3* kann zum einen Einfluss auf die Entstehung von RGC im zerebralen Kortex nehmen, zum anderen kann es auch einen Effekt auf die neuronale Differenzierung ausüben.

#### **4.4 Einfluss von *Gli3* auf die Proliferation und Differenzierung in Kultur gehaltener Neurosphären**

Entgegen dem Bericht einer Studie, dass keine *Gli3* defiziente Neurosphären aus dem E15,5 und E18,5 Kortex gewonnen werden können (Palma and Ruiz i Altaba 2004), gelang im Rahmen dieser Arbeit die Kultivierung von Neurosphären unter Verwendung des E12.5 dorsalen Telenzephalons. Diese in Kultur gehaltenen, rundlichen Zellaggregate zeigten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und *Gli3*-Mutante bezüglich Proliferation und

Morphologie auf. Dieses Ergebnis lässt sich mit der fortschreitenden, morphologischen Degenerierung des Telenzephalons in der *Gli3*-Mutante nach E12.5 erklären (Theil et al. 1999), bei der die Strukturen des *Gli3*-mutanen Telenzephalons weitgehend zerstört wird.

Die aus dem dorsalem Telenzephalon isolierten Neurosphären zeigen eine regelrechte Bildung von Astrozyten und Oligodendrozyten unter Differenzierungsbedingungen auf, so dass von einer funktionsfähigen Gliagenese gesprochen werden kann. Anders jedoch verhält es sich mit der Neurogenese. *Gli3* defiziente Neurosphären bildeten zwar  $\text{Map2}^+$  und  $\text{Tuj1}^+$  Neurone aus, doch war ihre Anzahl gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. Diesbezüglich erschienen die wenigen Neurone in ihrer Morphologie gestört und präsentierten sich mit einer verminderten Anzahl von Neuriten, die wiederum in ihrer Länge deutlich verkürzt und in ihrer Fähigkeit, einen normalen Dendritenbaum aufzubauen, gestört waren. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Anzahl  $\text{RC2}^+$  RGC unter Kulturbedingungen beobachtet werden.

Der Verlust von *Gli3* scheint daher die Neurogenese nicht komplett zu stören, sondern übt vielmehr einen Einfluss auf eine geregelte Differenzierung von Vorläuferzellen in Neurone aus. Dadurch kommt es zu einer Anhäufung von RGC, die nicht mehr in der Lage sind funktionsfähige Neurone zu produzieren.

Als Mögliche Ursache für diesen Differenzierungsdefekt kann zum einen eine gestörte Zellpolarität sein. Diese spielt bei der Entscheidung einer Vorläuferzelle in der Proliferation zu bleiben oder in die Neurogenese zu wechseln eine wichtige Rolle und ist von zusätzlicher Bedeutung zwischen einer symmetrischen und einer asymmetrischen Zellteilung umzuschalten (Gotz and Huttner 2005). Eine mögliche Kontrolle der Zellpolarität wird dabei Adhäsionsmolekülen zugesprochen, wie z.B.  *$\beta$ -catenin*, das sowohl am kanonischen Wnt-Signalweg beteiligt ist, aber auch in „Adherens junctions“ vorkommt und dort Zelladhäsionsmoleküle der Cadherinproteinfamilie verknüpft (Aberle et al. 1996; Aberle et al. 1997; Das et al. 2002; Le Borgne et al. 2002). Frühere Studien konnten zeigen, dass eine Überexpression an  $\beta$ -catenin die Anzahl RGC auf Kosten basaler Vorläuferzellen steigert, während ein Verlust von  $\beta$ -catenin eine reduzierte Vorläuferanzahl mit erheblichen strukturellen

Fehlbildungen und einer gestörten Zellwanderung verursacht (Chenn and Walsh 2002; Chenn and Walsh 2003; Machon et al. 2003; Machon et al. 2007; Wrobel et al. 2007). Normalerweise findet sich eine angereicherte Expression von  $\beta$ -catenin an der apikalen Seite der neuroepithelialen Vorläuferzellen. In der  $Xt^J$ -Mutante ist diese Lokalisation jedoch nicht sichtbar, sondern erscheint über die gesamte Zelloberfläche der neuroepithelialen Vorläuferzellen ektopisch verstreut (Theil 2005). Bei der Untersuchung weiterer Proteine wie ZO-1 und Par-3, die normalerweise an der apikalen Seite vorzufinden und an der Kontrolle der Zellpolarität beteiligt sind (Izumi et al. 1998; Lin et al. 2000), zeigt die  $Xt^J$ -Mutante ebenfalls ein reduziertes bzw. nicht mehr vorhandenes Signal. So erscheinen ZO-1 und Par-3 normalerweise in der Nähe von Adherens junctions netzartig über das Zytoplasma verstrickt, während in der  $Xt^J$ -Mutante wiederum keine deutliche Struktur erkennbar ist (Theil 2005). Zudem ist in kortikalen Vorläuferzellen der  $Xt^J$ -Mutante eine reduzierte Numb Expression an der apikalen Zellseite bekannt. An der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, als auch an Mäusen, konnte gezeigt werden, dass Numb für eine asymmetrische Zellteilung während der Entwicklung des zerebralen Kortex wichtig ist (Shen et al. 2002; Yu et al. 2003). Darüber hinaus führt eine Überexpression von Numb zu einer gesteigerten Neurogenese, während Knockout-Mäuse für Numb eine verminderte Neurogenese aufweisen (Zilian et al. 2001).

Diese Beobachtungen zeigen mit dem Verlust unterschiedlicher, in der Kontrolle der apikal/basalen Zellpolarität involvierter Proteine einen möglichen Grund für die gestörte Neurogenese der in Kultur gehaltenen Neurosphären.

#### 4.5 Reduzierte Expression der *NeuroD*-Genfamilie in der *Gli3*-Mutante

An diese Arbeit anknüpfende und weiterführende Experimente konnten neue Einblicke in weitere mögliche Mechanismen gewinnen, die für die beobachteten Defekte verantwortlich sein könnten (Theil, zur Veröffentlichung eingereicht). So konnte mit Hilfe von Mikrochipanalysen, RT-PCR und *in situ* Hybridisierung zum ersten Mal zeigen werden, dass Mitglieder der *NeuroD*- Genfamilie veränderte Genexpressionen im *Gli3*-defizienten, dorsalen Telenzephalon aufweisen. Es zeigt sich eine reduzierte *NeuroD2* und *NeuroD6* Expression in der *Gli3*-Mutante, während *NeuroD* im Kortex im Vergleich weniger stark reduziert erscheint. Bei diesen Faktoren handelt es sich um basisch Helix Loop Helix Transkriptionsfaktoren (bHLH). Diese Klasse von Transkriptionsfaktoren ist für eine geordnete Entstehung und Differenzierung unterschiedlichster Gewebearten während der Embryogenese verantwortlich, wie z.B. der Hämatopoese (Porcher et al. 1996), Differenzierung von Hautzellen (Li et al. 1995) oder der Neurogenese (Schwab et al. 2000; Schneider et al. 2008). Zahlreiche Experimente zeigten mit Hilfe einer ektopischen Überexpression von *NeuroD* einen regulatorischen Einfluss auf die Neurogenese, die neuronale Differenzierung (Lee et al. 1995; Liu et al. 2000; Chae et al. 2004) und die Neuritogenese (Cho et al. 2001; Uittenbogaard and Chiaramello 2002; Uittenbogaard and Chiaramello 2004). Die Expression von bHLH Transkriptionsfaktoren der *NeuroD*-Familie werden im Kortex in einem sich fast vollständig überlappenden Muster vorgefunden. Dies lässt zu der Annahme führen, dass die jeweiligen Familienmitglieder eine kompensierende Funktion bei Verlust eines der anderen Transkriptionsfaktoren besitzen (Schwab et al. 1998). In Knockout-Tieren für einzelne *NeuroD*-Gene konnten relativ milde Veränderungen festgestellt werden. Es zeigte sich unter Verlust von *NeuroD* ein Verlust des Stratum granulosum im Gyrus dentatus, einer wichtigen Struktur des Hippokampus. Als Grund konnte eine gestörte Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen in diesem Bereich aufgezeigt werden (Liu et al. 2000). In Anlehnung an die gestörte Neurogenese und das vermehrte Aufkommen RGC aus *Gli3*-mutanten Neurosphären, die in dieser Arbeit gezeigt

werden, konnten andere Zellkulturexperimente von Retinazellen aus *NeuroD* defizienten Mäusen ähnliche Beobachtungen feststellen. Unter Verlust von *NeuroD* wurde ebenfalls eine gestörte Neurogenese mit einer reduzierten Anzahl von Interneuronen und einer vermehrten Produktion von Gliazellen gezeigt. Gleichzeitig war es durch eine ektopische Expression von *NeuroD* möglich, die Gliogenese zu stoppen (Morrow et al. 1999). Analysen von Knockout-Mäusen für *NeuroD2* zeigten indessen eine fehlende axonale Verknüpfung zwischen Thalamus und Kortex, einschließlich einer gestörten Reifung von synaptischen Verbindungen (Ince-Dunn et al. 2006).

Einen Zusammenhang zwischen *Gli3* und bHLH Faktoren der NeuroD Familie konnte auch in Analysen am Froschmodel *Xenopus laevis* aufgezeigt werden. So ist neben der Beobachtung, dass *Gli3* für die Bildung primärer Neurone während der Neurogenese benötigt wird, zusätzlich gezeigt worden, dass *Gli3* durch eine ektopische Aktivierung neuronaler bHLH Signalwege für eine neuronale Differenzierung notwendig ist (Brewster et al. 1998; Nguyen et al. 2005). Gestützt auf diese Beobachtungen kann die veränderte *NeuroD*-Genexpression in der *Xt<sup>J</sup>*-Mutante für die beobachteten Differenzierungsdefekte verantwortlich gemacht werden. Dabei kann durch die komplementäre Expression der *Gli3*- und *NeuroD*-Gene in kortikalen Vorläuferzellen bzw. kortikalen Neuronen nur von einer indirekten Interaktion zwischen beiden Genen ausgegangen werden. Es ist bekannt, dass eine korrekte Expression von *NeuroD* nur unter einer Expression von Vorläuferzelleigenen proneuronalen Genen stattfinden kann, wie z.B. *Ngn1* und *Ngn2* (Lin et al. 2004). Frühere Untersuchungen von *Xt<sup>J</sup>*-Embryonen zum Zeitpunkt E12.5 konnten eine reduzierte Expression von *Ngn2* entlang der dorsomedialen Linie und einen Verlust im rostralen Abschnitt des Telenzephalons zeigen (Kuschel et al. 2003). Diese Abschnitte wurden jedoch unter der Präparation des Neokortex für die Zellkultur ausgelassen, so dass *Ngn2* mit Hilfe von PCR Analysen in dieser Arbeit detektiert werden konnte. Daher ist durchaus denkbar, dass *Gli3* in der Lage ist, die Funktion proneuraler Proteine über Ko-Faktoren oder negative Regulatoren zu lenken. Hinsichtlich dieser Proteine gibt es eine Vielzahl möglicher Kandidaten, wie z.B. *Sox4* und *Sox11*, zwei HMG-Domänen

Transkriptionsfaktoren. Diese werden in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und sind in der Kontrolle einer regelhaften Neurogenese involviert (Cheung et al. 2000; Sock et al. 2004). Sie sind ebenfalls in der Lage, die Transkription von weiteren bHLH Faktoren zu aktivieren (Bergsland et al. 2006). Gleichfalls kann *Gli3* jedoch über alternative Signalwege auf die *NeuroD*-Transkripte Einfluss nehmen. Daher ist es von großem Interesse diese Faktoren aufzudecken, um einen detaillierten Einblick in die verantwortlichen Mechanismen einer regelrechten Differenzierung kortikaler Neurone zu gewinnen. Darüber hinaus müssen Zellkulturexperimente von *Gli3/Wnt7b*-mutanten Neurosphären zeigen, ob wie zu erwarten, ein erhöhtes RGC Aufkommen unter Zellkulturbedingungen zu beobachten ist.

## 5. Zusammenfassung

Der zerebrale Kortex zählt bei Säugetieren zu einem der komplexesten Systeme und ist das Zentrum unserer Wahrnehmung, unseres Denkens, Fühlens und Handelns. Während der Entstehung des zerebralen Kortex spielen das Neuroepithel, die radialen Gliazellen und die basalen Vorläuferzellen als Quelle neu entstandener Neurone und Gliazellen eine besondere Rolle. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde von ersten Anzeichen einer gestörten Neurogenese in der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante zum Zeitpunkt E11.5 berichtet, jedoch nicht ausreichend untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Gli3* eine wesentliche Beteiligung an der Kontrollierung einer geordneten Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen gezeigt werden. Zunächst wurde auf molekularbiologischer Ebene in *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>* Embryonen mit Hilfe von Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierungen eine ektopische, wellenartige Expression von *BLBP<sup>+</sup>* und *GLAST<sup>+</sup>* radialen Gliazellen nachgewiesen. Aufgrund der zusätzlich beobachteten Koexpression von *Wnt7b* in diesen Vorläuferzellen des dorsalen Telenzephalons, konnten weiterführende Untersuchungen einer *Xt<sup>f</sup>/Xt<sup>f</sup>/Wnt7b<sup>-/-</sup>* Doppelmutante zeigen, dass *Wnt7b* in der Lage ist die Bildung ektopischer radialer Gliazellen zu unterdrücken. Als einen möglichen Mechanismus, der bereits im Rahmen anderer Studien in Zusammenhang mit einer geordneten Differenzierung radialer Gliazellen gezeigt werden konnte, ist die Interaktion zwischen *Wnt7b* mit Notch/Delta Signalen anzunehmen. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit konnte mit Hilfe von isolierten Neurosphären aus dem dorsalen Telenzephalon der *Gli3*-Mutante eine gestörte Neurogenese beobachtet werden. Radiale Gliazellen bleiben vermehrt im Vorläuferstadium, während sich weniger Neurone ausbilden. Diese zeigen zudem eine gestörte Neuritenbildung, mit verkürzter bzw. fehlender Axon- und Dendritenausbildung.

Zusammenfassend sprechen diese Resultate *Gli3* eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer normalen Neurogenese des zerebralen Kortex zu. Diese Störung kann einerseits mit dem bereits in früheren Untersuchungen gezeigten Verlust einer apikal/basalen Zellpolarität der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante erklärt werden und ist ein möglicher Grund für die gestörte RGC Bildung. Andererseits konnten neuere Untersuchungen der *Xt<sup>f</sup>*-Mutante eine reduzierte *NeuroD*-Expression zeigen, die ebenfalls ausschlaggebend für die gestörte Neurogenese sein kann.

## 6. Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- Aaku-Saraste, E., A. Hellwig and W. B. Huttner (1996). "Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis." Dev Biol **180**(2): 664-79.
- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert and R. Kemler (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." Embo J **16**(13): 3797-804.
- Aberle, H., H. Schwartz and R. Kemler (1996). "Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function." J Cell Biochem **61**(4): 514-23.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo and A. D. Tramontin (2001). "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells." Nat Rev Neurosci **2**(4): 287-93.
- Anderson, D. J. (2001). "Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual." Neuron **30**(1): 19-35.
- Anthony, T. E., C. Klein, G. Fishell and N. Heintz (2004). "Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system." Neuron **41**(6): 881-90.
- Anthony, T. E., H. A. Mason, T. Gridley, G. Fishell and N. Heintz (2005). "Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells." Genes Dev **19**(9): 1028-33.
- Aoto, K., T. Nishimura, K. Eto and J. Motoyama (2002). "Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud." Dev Biol **251**(2): 320-32.
- Arai, Y., N. Funatsu, K. Numayama-Tsuruta, T. Nomura, S. Nakamura and N. Osumi (2005). "Role of Fabp7, a downstream gene of Pax6, in the maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex." J Neurosci **25**(42): 9752-61.

- Arias, A. M. (2002). "New alleles of Notch draw a blueprint for multifunctionality." Trends Genet **18**(4): 168-70.
- Assimacopoulos, S., E. A. Grove and C. W. Ragsdale (2003). "Identification of a Pax6-dependent epidermal growth factor family signaling source at the lateral edge of the embryonic cerebral cortex." J Neurosci **23**(16): 6399-403.
- Bachler, M. and A. Neubuser (2001). "Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development." Mech Dev **100**(2): 313-6.
- Backman, M., O. Machon, L. Mygland, C. J. van den Bout, W. Zhong, M. M. Taketo and S. Krauss (2005). "Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon." Dev Biol **279**(1): 155-68.
- Baraitser, M., R. M. Winter and E. M. Brett (1983). "Greig cephalopolysyndactyly: report of 13 affected individuals in three families." Clin Genet **24**(4): 257-65.
- Bel-Vialar, S., F. Medevielle and F. Pituello (2007). "The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord." Dev Biol **305**(2): 659-73.
- Belanger, D., C. A. Farah, M. D. Nguyen, M. Lauzon, S. Cornibert and N. Leclerc (2002). "The projection domain of MAP2b regulates microtubule protrusion and process formation in Sf9 cells." J Cell Sci **115**(Pt 7): 1523-39.
- Belloni, E., M. Muenke, E. Roessler, G. Traverso, J. Siegel-Bartelt, A. Frumkin, H. F. Mitchell, H. Donis-Keller, C. Helms, A. V. Hing, H. H. Heng, B. Koop, D. Martindale, J. M. Rommens, L. C. Tsui and S. W. Scherer (1996). "Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly." Nat Genet **14**(3): 353-6.
- Bergsland, M., M. Werme, M. Malewicz, T. Perlmann and J. Muhr (2006). "The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11." Genes Dev **20**(24): 3475-86.

- Bez, A., E. Corsini, D. Curti, M. Biggiogera, A. Colombo, R. F. Nicosia, S. F. Pagano and E. A. Parati (2003). "Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization." Brain Res **993**(1-2): 18-29.
- Biesecker, L. G. (2002). "Polydactyly: how many disorders and how many genes?" Am J Med Genet **112**(3): 279-83.
- Biesecker, L. G. (2006). "What you can learn from one gene: GLI3." J Med Genet **43**(6): 465-9.
- Biesecker, L. G. (2008). "The Greig cephalopolysyndactyly syndrome." Orphanet J Rare Dis **3**: 10.
- Bishop, K. M., G. Goudreau and D. D. O'Leary (2000). "Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6." Science **288**(5464): 344-9.
- Bishop, K. M., J. L. Rubenstein and D. D. O'Leary (2002). "Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex." J Neurosci **22**(17): 7627-38.
- Bohner, A. P., R. M. Akers and S. K. McConnell (1997). "Induction of deep layer cortical neurons in vitro." Development **124**(4): 915-23.
- Brewster, R., J. Lee and A. Ruiz i Altaba (1998). "Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation." Nature **393**(6685): 579-83.
- Briscoe, J. and J. Ericson (2001). "Specification of neuronal fates in the ventral neural tube." Curr Opin Neurobiol **11**(1): 43-9.
- Brueton, L. A., K. A. Chotai, L. van Herwerden, A. Schinzel and R. M. Winter (1992). "The acrocallosal syndrome and Greig syndrome are not allelic disorders." J Med Genet **29**(9): 635-7.
- Bulchand, S., E. A. Grove, F. D. Porter and S. Tole (2001). "LIM-homeodomain gene Lhx2 regulates the formation of the cortical hem." Mech Dev **100**(2): 165-75.
- Büscher, D., L. Grotewold and U. Rütger (1998). "The Xt-J allele generates a Gli3 fusion transcript." Mammal. Genome **9**: 676-78.

- Calegari, F., W. Haubensak, C. Haffner and W. B. Huttner (2005). "Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development." J Neurosci **25**(28): 6533-8.
- Cameron, R. S. and P. Rakic (1991). "Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis." Glia **4**(2): 124-37.
- Cappello, S., A. Attardo, X. Wu, T. Iwasato, S. Itohara, M. Wilsch-Brauninger, H. M. Eilken, M. A. Rieger, T. T. Schroeder, W. B. Huttner, C. Brakebusch and M. Gotz (2006). "The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface." Nat Neurosci **9**(9): 1099-107.
- Caric, D., D. Gooday, R. E. Hill, S. K. McConnell and D. J. Price (1997). "Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6." Development **124**(24): 5087-96.
- Chae, J. H., G. H. Stein and J. E. Lee (2004). "NeuroD: the predicted and the surprising." Mol Cells **18**(3): 271-88.
- Chang, B. S., F. Duzcan, S. Kim, M. Cinbis, A. Aggarwal, K. A. Apse, O. Ozdel, M. Atmaca, S. Zencir, H. Bagci and C. A. Walsh (2007). "The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **144B**(1): 58-63.
- Chenn, A. and C. A. Walsh (2002). "Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors." Science **297**(5580): 365-9.
- Chenn, A. and C. A. Walsh (2003). "Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice." Cereb Cortex **13**(6): 599-606.
- Cheung, M., M. Abu-Elmagd, H. Clevers and P. J. Scotting (2000). "Roles of Sox4 in central nervous system development." Brain Res Mol Brain Res **79**(1-2): 180-91.
- Chiang, C., Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal and P. A. Beachy (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function." Nature **383**(6599): 407-13.

- Cho, J. H., I. S. Kwon, S. Kim, S. H. Ghil, M. J. Tsai, Y. S. Kim, Y. D. Lee and H. Suh-Kim (2001). "Overexpression of BETA2/NeuroD induces neurite outgrowth in F11 neuroblastoma cells." J Neurochem **77**(1): 103-9.
- Crossley, P. H., S. Martinez, Y. Ohkubo and J. L. Rubenstein (2001). "Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles." Neuroscience **108**(2): 183-206.
- Culican, S. M., N. L. Baumrind, M. Yamamoto and A. L. Pearlman (1990). "Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes." J Neurosci **10**(2): 684-92.
- Dai, P., H. Akimaru, Y. Tanaka, T. Maekawa, M. Nakafuku and S. Ishii (1999). "Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3." J Biol Chem **274**(12): 8143-52.
- Das, G., J. Reynolds-Kenneally and M. Mlodzik (2002). "The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the Drosophila eye." Dev Cell **2**(5): 655-66.
- DeSilva, U., G. D'Arcangelo, V. V. Braden, J. Chen, G. G. Miao, T. Curran and E. D. Green (1997). "The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7." Genome Res **7**(2): 157-64.
- Ding, Q., J. Motoyama, S. Gasca, R. Mo, H. Sasaki, J. Rossant and C. C. Hui (1998). "Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice." Development **125**(14): 2533-43.
- Dou, C. L., S. Li and E. Lai (1999). "Dual role of brain factor-1 in regulating growth and patterning of the cerebral hemispheres." Cereb Cortex **9**(6): 543-50.
- Duncan, P. A., R. M. Klein, P. L. Wilmot and L. R. Shapiro (1979). "Greig cephalopolysyndactyly syndrome." Am J Dis Child **133**(8): 818-21.
- Echelard, Y., D. J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J. A. McMahon and A. P. McMahon (1993). "Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity." Cell **75**(7): 1417-30.

- Edwards, M. A., M. Yamamoto and V. S. Caviness, Jr. (1990). "Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker." Neuroscience **36**(1): 121-44.
- Elson, E., R. Perveen, D. Donnai, S. Wall and G. C. Black (2002). "De novo GLI3 mutation in acrocallosal syndrome: broadening the phenotypic spectrum of GLI3 defects and overlap with murine models." J Med Genet **39**(11): 804-6.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar and Y. L. Lee (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." Neurochem Res **25**(9-10): 1439-51.
- Englund, C., A. Fink, C. Lau, D. Pham, R. A. Daza, A. Bulfone, T. Kowalczyk and R. F. Hevner (2005). "Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex." J Neurosci **25**(1): 247-51.
- Ericson, J., J. Muhr, T. M. Jessell and T. Edlund (1995). "Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube." Int J Dev Biol **39**(5): 809-16.
- Feng, L., M. E. Hatten and N. Heintz (1994). "Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS." Neuron **12**(4): 895-908.
- Feng, L. and N. Heintz (1995). "Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element." Development **121**(6): 1719-30.
- Fotaki, V., T. Yu, P. A. Zaki, J. O. Mason and D. J. Price (2006). "Abnormal positioning of diencephalic cell types in neocortical tissue in the dorsal telencephalon of mice lacking functional Gli3." J Neurosci **26**(36): 9282-92.
- Frantz, G. D. and S. K. McConnell (1996). "Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate." Neuron **17**(1): 55-61.
- Franz, T. (1994). "Extra-toes (Xt) homozygous mutant mice demonstrate a role for the Gli-3 gene in the development of the forebrain." Acta Anat (Basel) **150**(1): 38-44.

- Frederiksen, K. and R. D. McKay (1988). "Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo." J Neurosci **8**(4): 1144-51.
- Fuccillo, M., M. Rallu, A. P. McMahon and G. Fishell (2004). "Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning." Development **131**(20): 5031-40.
- Fukuchi-Shimogori, T. and E. A. Grove (2001). "Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8." Science **294**(5544): 1071-4.
- Fukuchi-Shimogori, T. and E. A. Grove (2003). "Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling." Nat Neurosci **6**(8): 825-31.
- Furuta, Y., D. W. Piston and B. L. Hogan (1997). "Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development." Development **124**(11): 2203-12.
- Gaiano, N. and G. Fishell (2002). "The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates." Annu Rev Neurosci **25**: 471-90.
- Gaiano, N., J. S. Nye and G. Fishell (2000). "Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain." Neuron **26**(2): 395-404.
- Galceran, J., E. M. Miyashita-Lin, E. Devaney, J. L. Rubenstein and R. Grosschedl (2000). "Hippokampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1." Development **127**(3): 469-82.
- Garel, S., K. J. Huffman and J. L. Rubenstein (2003). "Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants." Development **130**(9): 1903-14.
- Gilyarov, A. V. (2008). "Nestin in central nervous system cells." Neurosci Behav Physiol **38**(2): 165-9.
- Gitton, Y., M. Cohen-Tannoudji and M. Wassef (1999). "Role of thalamic axons in the expression of H-2Z1, a mouse somatosensory cortex specific marker." Cereb Cortex **9**(6): 611-20.
- Gleeson, J. G. and C. A. Walsh (2000). "Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms." Trends Neurosci **23**(8): 352-9.

- Gotz, M., J. Bolz, A. Joester and A. Faissner (1997). "Tenascin-C synthesis and influence on axonal growth during rat cortical development." Eur J Neurosci **9**(3): 496-506.
- Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(10): 777-88.
- Grove, E. A. and T. Fukuchi-Shimogori (2003). "Generating the cerebral cortical area map." Annu Rev Neurosci **26**: 355-80.
- Grove, E. A. and S. Tole (1999). "Patterning events and specification signals in the developing Hippokampus." Cereb Cortex **9**(6): 551-61.
- Grove, E. A., S. Tole, J. Limon, L. Yip and C. W. Ragsdale (1998). "The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice." Development **125**(12): 2315-25.
- Gunhaga, L., M. Marklund, M. Sjodal, J. C. Hsieh, T. M. Jessell and T. Edlund (2003). "Specification of dorsal telencephalic character by sequential Wnt and FGF signaling." Nat Neurosci **6**(7): 701-7.
- Hall, J. G., P. D. Pallister, S. K. Clarren, J. B. Beckwith, F. W. Wiglesworth, F. C. Fraser, S. Cho, P. J. Benke and S. D. Reed (1980). "Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus and postaxial polydactyly--a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations." Am J Med Genet **7**(1): 47-74.
- Hamasaki, T., A. Leingartner, T. Ringstedt and D. D. O'Leary (2004). "EMX2 regulates sizes and positioning of the primary sensory and motor areas in neocortex by direct specification of cortical progenitors." Neuron **43**(3): 359-72.
- Hanashima, C., L. Shen, S. C. Li and E. Lai (2002). "Brain factor-1 controls the proliferation and differentiation of neocortical progenitor cells through independent mechanisms." J Neurosci **22**(15): 6526-36.
- Hartfuss, E., E. Forster, H. H. Bock, M. A. Hack, P. Leprince, J. M. Luque, J. Herz, M. Frotscher and M. Gotz (2003). "Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation." Development **130**(19): 4597-609.

- Hartfuss, E., R. Galli, N. Heins and M. Gotz (2001). "Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia." Dev Biol **229**(1): 15-30.
- Hatakeyama, J., Y. Bessho, K. Katoh, S. Ookawara, M. Fujioka, F. Guillemot and R. Kageyama (2004). "Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation." Development **131**(22): 5539-50.
- Hatten, M. E. (1985). "Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro." J Cell Biol **100**(2): 384-96.
- Hatten, M. E. (1999). "Central nervous system neuronal migration." Annu Rev Neurosci **22**: 511-39.
- Haubensak, W., A. Attardo, W. Denk and W. B. Huttner (2004). "Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3196-201.
- Haubst, N., J. Berger, V. Radjendirane, J. Graw, J. Favor, G. F. Saunders, A. Stoykova and M. Gotz (2004). "Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development." Development **131**(24): 6131-40.
- Hayhurst, M. and S. K. McConnell (2003). "Mouse models of holoprosencephaly." Curr Opin Neurol **16**(2): 135-41.
- Hebert, J. M., Y. Mishina and S. K. McConnell (2002). "BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline." Neuron **35**(6): 1029-41.
- Heins, N., F. Cremisi, P. Malatesta, R. M. Gangemi, G. Corte, J. Price, G. Goudreau, P. Gruss and M. Gotz (2001). "Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex." Mol Cell Neurosci **18**(5): 485-502.
- Heins, N., P. Malatesta, F. Cecconi, M. Nakafuku, K. L. Tucker, M. A. Hack, P. Chapouton, Y. A. Barde and M. Gotz (2002). "Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6." Nat Neurosci **5**(4): 308-15.

- Hirsch, C., L. M. Campano, S. Wohrle and A. Hecht (2007). "Canonical Wnt signaling transiently stimulates proliferation and enhances neurogenesis in neonatal neural progenitor cultures." Exp Cell Res **313**(3): 572-87.
- Hong, S. E., Y. Y. Shugart, D. T. Huang, S. A. Shahwan, P. E. Grant, J. O. Hourihane, N. D. Martin and C. A. Walsh (2000). "Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations." Nat Genet **26**(1): 93-6.
- Huang, X., Y. Litingtung and C. Chiang (2007). "Ectopic sonic hedgehog signaling impairs telencephalic dorsal midline development: implication for human holoprosencephaly." Hum Mol Genet **16**(12): 1454-68.
- Huttner, W. B. and M. Brand (1997). "Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells." Curr Opin Neurobiol **7**(1): 29-39.
- Ince-Dunn, G., B. J. Hall, S. C. Hu, B. Ripley, R. L. Haganir, J. M. Olson, S. J. Tapscott and A. Ghosh (2006). "Regulation of thalamocortical patterning and synaptic maturation by NeuroD2." Neuron **49**(5): 683-95.
- Izumi, Y., T. Hirose, Y. Tamai, S. Hirai, Y. Nagashima, T. Fujimoto, Y. Tabuse, K. J. Kemphues and S. Ohno (1998). "An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3." J Cell Biol **143**(1): 95-106.
- Johe, K. K., T. G. Hazel, T. Muller, M. M. Dugich-Djordjevic and R. D. McKay (1996). "Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system." Genes Dev **10**(24): 3129-40.
- Johnson, R. L., R. D. Riddle and C. J. Tabin (1994). "Mechanisms of limb patterning." Curr Opin Genet Dev **4**(4): 535-42.
- Johnston, J. J., I. Olivos-Glander, C. Killoran, E. Elson, J. T. Turner, K. F. Peters, M. H. Abbott, D. J. Aughton, A. S. Aylsworth, M. J. Bamshad, C. Booth, C. J. Curry, A. David, M. B. Dinulos, D. B. Flannery, M. A. Fox, J. M. Graham, D. K. Grange, A. E. Guttmacher, M. C. Hannibal, W. Henn, R. C. Hennekam, L. B. Holmes, H. E. Hoyme, K. A. Leppig, A. E. Lin, P. Macleod, D. K. Manchester, C. Marcelis, L. Mazzanti, E. McCann, M. T. McDonald, N. J. Mendelsohn, J. B. Moeschler, B. Moghaddam, G. Neri,

- R. Newbury-Ecob, R. A. Pagon, J. A. Phillips, L. S. Sadler, J. M. Stoler, D. Tilstra, C. M. Walsh Vockley, E. H. Zackai, T. M. Zadeh, L. Brueton, G. C. Black and L. G. Biesecker (2005). "Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations." Am J Hum Genet **76**(4): 609-22.
- Johnston, J. J., I. Olivos-Glander, J. Turner, K. Aleck, L. M. Bird, L. Mehta, R. N. Schimke, H. Heilstedt, J. E. Spence, J. Blancato and L. G. Biesecker (2003). "Clinical and molecular delineation of the Greig cephalopolysyndactyly contiguous gene deletion syndrome and its distinction from acrocallosal syndrome." Am J Med Genet A **123**(3): 236-42.
- Kalderon, D. (1997). "Hedgehog signalling: Ci complex cuts and clasps." Curr Biol **7**(12): R759-62.
- Kang, S., J. M. Graham, Jr., A. H. Olney and L. G. Biesecker (1997). "GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome." Nat Genet **15**(3): 266-8.
- Kim, A. S., S. A. Anderson, J. L. R. Rubenstein, D. H. Lowenstein and S. J. Pleasure (2001). "Pax-6 Regulates Expression of SFRP-2 and Wnt-7b in the Developing CNS." J. Neurosci. **21**(5): 132RC-.
- Kohtz, J. D., D. P. Baker, G. Corte and G. Fishell (1998). "Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog." Development **125**(24): 5079-89.
- Kosodo, Y., K. Roper, W. Haubensak, A. M. Marzesco, D. Corbeil and W. B. Huttner (2004). "Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells." Embo J **23**(11): 2314-24.
- Kriegstein, A. R. and M. Gotz (2003). "Radial glia diversity: a matter of cell fate." Glia **43**(1): 37-43.
- Kroisel, P. M., E. Petek and K. Wagner (2001). "Phenotype of five patients with Greig syndrome and microdeletion of 7p13." Am J Med Genet **102**(3): 243-9.

- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, M. Park, J. R. Miller and R. T. Moon (2000). "The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." Trends Genet **16**(7): 279-83.
- Kurtz, A., A. Zimmer, F. Schnutgen, G. Bruning, F. Spener and T. Muller (1994). "The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development." Development **120**(9): 2637-49.
- Kuschel, S., U. R  ther and T. Theil (2003). "A disrupted balance between Bmp/Wnt and Fgf signaling underlies the ventralization of the Gli3 mutant telencephalon." Developmental Biology **260**: 484-95.
- Land, P. W. and A. P. Monaghan (2003). "Expression of the transcription factor, *tailless*, is required for formation of superficial cortical layers." Cereb Cortex **13**(9): 921-31.
- Le Borgne, R., Y. Bellaiche and F. Schweisguth (2002). "Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage." Curr Biol **12**(2): 95-104.
- Lee, H. S. and G. A. Mihailoff (1990). "Convergence of cortical and cerebellar projections on single basilar pontine neurons: a light and electron microscopic study in the rat." Neuroscience **39**(3): 561-77.
- Lee, J. E., S. M. Hollenberg, L. Snider, D. L. Turner, N. Lipnick and H. Weintraub (1995). "Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein." Science **268**(5212): 836-44.
- Lee, K. J., P. Dietrich and T. M. Jessell (2000). "Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification." Nature **403**(6771): 734-40.
- Lee, S. M., S. Tole, E. Grove and A. P. McMahon (2000). "A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian Hippokampus." Development **127**(3): 457-67.
- Li, H., Y. W. Chang, K. Mohan, H. W. Su, C. L. Ricupero, A. Baridi, R. P. Hart and M. Grumet (2008). "Activated Notch1 maintains the phenotype of radial glial cells and promotes their adhesion to laminin by upregulating nidogen." Glia **56**(6): 646-58.

- Li, L., P. Cserjesi and E. N. Olson (1995). "Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis." Dev Biol **172**(1): 280-92.
- Lin, C. H., J. Stoeck, A. C. Ravanpay, F. Guillemot, S. J. Tapscott and J. M. Olson (2004). "Regulation of neuroD2 expression in mouse brain." Dev Biol **265**(1): 234-45.
- Lin, D., A. S. Edwards, J. P. Fawcett, G. Mbamalu, J. D. Scott and T. Pawson (2000). "A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity." Nat Cell Biol **2**(8): 540-7.
- Litingtung, Y. and C. Chiang (2000). "Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3." Nat Neurosci **3**(10): 979-85.
- Liu, M., S. J. Pleasure, A. E. Collins, J. L. Noebels, F. J. Naya, M. J. Tsai and D. H. Lowenstein (2000). "Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 865-70.
- Ludin, B. and A. Matus (1993). "The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity." Hippokampus **3 Spec No**: 61-71.
- Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P. M. Schlag, W. Birchmeier and J. Behrens (2002). "Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors." Mol. Cell. Biol. **22**(4): 1184-1193.
- Machon, O., M. Backman, O. Machonova, Z. Kozmik, T. Vacik, L. Andersen and S. Krauss (2007). "A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the Hippokampus." Dev Biol **311**(1): 223-37.
- Machon, O., C. J. van den Bout, M. Backman, R. Kemler and S. Krauss (2003). "Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium." Neuroscience **122**(1): 129-43.
- Malatesta, P., M. A. Hack, E. Hartfuss, H. Kettenmann, W. Klinkert, F. Kirchhoff and M. Gotz (2003). "Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate." Neuron **37**(5): 751-64.

- Malatesta, P., E. Hartfuss and M. Gotz (2000). "Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage." Development **127**(24): 5253-63.
- Mallamaci, A., L. Muzio, C. H. Chan, J. Parnavelas and E. Boncinelli (2000). "Area identity shifts in the early cerebral cortex of *Emx2*<sup>-/-</sup> mutant mice." Nat Neurosci **3**(7): 679-86.
- Mallamaci, A. and A. Stoykova (2006). "Gene networks controlling early cerebral cortex arealization." Eur J Neurosci **23**(4): 847-56.
- Mangale, V. S., K. E. Hirokawa, P. R. Satyaki, N. Gokulchandran, S. Chikbire, L. Subramanian, A. S. Shetty, B. Martynoga, J. Paul, M. V. Mai, Y. Li, L. A. Flanagan, S. Tole and E. S. Monuki (2008). "Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate." Science **319**(5861): 304-9.
- Martynoga, B., H. Morrison, D. J. Price and J. O. Mason (2005). "Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis." Dev Biol **283**(1): 113-27.
- Matise, M. P., D. J. Epstein, H. L. Park, K. A. Platt and A. L. Joyner (1998). "Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system." Development **125**(15): 2759-70.
- Maynard, T. M., M. D. Jain, C. W. Balmer and A. S. LaMantia (2002). "High-resolution mapping of the *Gli3* mutation extra-toes reveals a 51.5-kb deletion." Mamm Genome **13**(1): 58-61.
- McCarthy, M., D. H. Turnbull, C. A. Walsh and G. Fishell (2001). "Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis." J Neurosci **21**(17): 6772-81.
- McConnell, S. K. (1995). "Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination." Neuron **15**(4): 761-8.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.

- Miller, S. J., H. Li, T. A. Rizvi, Y. Huang, G. Johansson, J. Bowersock, A. Sidani, J. Vitullo, K. Vogel, L. M. Parysek, J. E. DeClue and N. Ratner (2003). "Brain lipid binding protein in axon-Schwann cell interactions and peripheral nerve tumorigenesis." Mol Cell Biol **23**(6): 2213-24.
- Mischel, P. S., L. P. Nguyen and H. V. Vinters (1995). "Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathologic features and proposal for a grading system." J Neuropathol Exp Neurol **54**(2): 137-53.
- Miyashita-Lin, E. M., R. Hevner, K. M. Wassarman, S. Martinez and J. L. Rubenstein (1999). "Early neocortical regionalization in the absence of thalamic innervation." Science **285**(5429): 906-9.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, K. Saito, M. Kawano, T. Muto and M. Ogawa (2004). "Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells." Development **131**(13): 3133-45.
- Mizutani, K., K. Yoon, L. Dang, A. Tokunaga and N. Gaiano (2007). "Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors." Nature **449**(7160): 351-5.
- Monuki, E. S., F. D. Porter and C. A. Walsh (2001). "Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway." Neuron **32**(4): 591-604.
- Morrow, E. M., T. Furukawa, J. E. Lee and C. L. Cepko (1999). "NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent." Development **126**(1): 23-36.
- Muzio, L., B. DiBenedetto, A. Stoykova, E. Boncinelli, P. Gruss and A. Mallamaci (2002). "Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in Emx2(-/-) Pax6(Sey/Sey) double-mutant mice." Nat Neurosci **5**(8): 737-45.
- Muzio, L., B. DiBenedetto, A. Stoykova, E. Boncinelli, P. Gruss and A. Mallamaci (2002). "Emx2 and Pax6 control regionalization of the pre-neuronogenic cortical primordium." Cereb Cortex **12**(2): 129-39.

- Muzio, L. and A. Mallamaci (2005). "Foxg1 confines Cajal-Retzius neuronogenesis and hippocampal morphogenesis to the dorsomedial pallium." J Neurosci **25**(17): 4435-41.
- Nakagawa, Y., J. E. Johnson and D. D. O'Leary (1999). "Graded and areal expression patterns of regulatory genes and cadherins in embryonic neocortex independent of thalamocortical input." J Neurosci **19**(24): 10877-85.
- Nguyen, V., A. L. Chokas, B. Stecca and A. R. Altaba (2005). "Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis." Development **132**(14): 3267-79.
- Nieto, M., E. S. Monuki, H. Tang, J. Imitola, N. Haubst, S. J. Khoury, J. Cunningham, M. Gotz and C. A. Walsh (2004). "Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex." J Comp Neurol **479**(2): 168-80.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman and A. R. Kriegstein (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." Nature **409**(6821): 714-20.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic and A. R. Kriegstein (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." Nat Neurosci **7**(2): 136-44.
- O'Leary, D. D. (1989). "Do cortical areas emerge from a protocortex?" Trends Neurosci **12**(10): 400-6.
- O'Shea, K. S. (2004). "Self-renewal vs. differentiation of mouse embryonic stem cells." Biol Reprod **71**(6): 1755-65.
- Olson, E. C. and C. A. Walsh (2002). "Smooth, rough and upside-down neocortical development." Curr Opin Genet Dev **12**(3): 320-7.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.
- Owada, Y., T. Yoshimoto and H. Kondo (1996). "Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains." J Chem Neuroanat **12**(2): 113-22.

- Palma, V. and A. Ruiz i Altaba (2004). "Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex." Development **131**(2): 337-45.
- Panchision, D. M., J. M. Pickel, L. Studer, S. H. Lee, P. A. Turner, T. G. Hazel and R. D. McKay (2001). "Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate." Genes Dev **15**(16): 2094-110.
- Patten, B. A., J. M. Peyrin, G. Weinmaster and G. Corfas (2003). "Sequential signaling through Notch1 and erbB receptors mediates radial glia differentiation." J Neurosci **23**(14): 6132-40.
- Pellegrini, M., A. Mansouri, A. Simeone, E. Boncinelli and P. Gruss (1996). "Dentate gyrus formation requires Emx2." Development **122**(12): 3893-8.
- Pleasure, S. J., A. E. Collins and D. H. Lowenstein (2000). "Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development." J Neurosci **20**(16): 6095-105.
- Podos, S. D. and E. L. Ferguson (1999). "Morphogen gradients: new insights from DPP." Trends Genet **15**(10): 396-402.
- Polleux, F., R. J. Giger, D. D. Ginty, A. L. Kolodkin and A. Ghosh (1998). "Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions." Science **282**(5395): 1904-6.
- Porcher, C., W. Swat, K. Rockwell, Y. Fujiwara, F. W. Alt and S. H. Orkin (1996). "The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages." Cell **86**(1): 47-57.
- Price, M. A. and D. Kalderon (1999). "Proteolysis of cubitus interruptus in *Drosophila* requires phosphorylation by protein kinase A." Development **126**(19): 4331-9.
- Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis and S. Temple (2000). "Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells." Neuron **28**(1): 69-80.
- Quinn, J. C., M. Molinek, B. S. Martynoga, P. A. Zaki, A. Faedo, A. Bulfone, R. F. Hevner, J. D. West and D. J. Price (2007). "Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies

- cortical cell identity by a cell autonomous mechanism." Dev Biol **302**(1): 50-65.
- Radhakrishna, U., D. Bornholdt, H. S. Scott, U. C. Patel, C. Rossier, H. Engel, A. Bottani, D. Chandal, J. L. Blouin, J. V. Solanki, K. H. Grzeschik and S. E. Antonarakis (1999). "The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations." Am J Hum Genet **65**(3): 645-55.
- Radhakrishna, U., A. Wild, K. H. Grzeschik and S. E. Antonarakis (1997). "Mutation in GLI3 in postaxial polydactyly type A." Nat Genet **17**(3): 269-71.
- Rakic, P. (1972). "Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex." J Comp Neurol **145**(1): 61-83.
- Rakic, P. (1974). "Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition." Science **183**(123): 425-7.
- Rakic, P. (1988). "Specification of cerebral cortical areas." Science **241**(4862): 170-6.
- Rakic, P. (1995). "A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution." Trends Neurosci **18**(9): 383-8.
- Rallu, M., R. Machold, N. Gaiano, J. G. Corbin, A. P. McMahon and G. Fishell (2002). "Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling." Development **129**(21): 4963-74.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1996). "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell." Dev Biol **175**(1): 1-13.
- Rice, D. S. and T. Curran (2001). "Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development." Annu Rev Neurosci **24**: 1005-39.
- Rice, D. S., M. Sheldon, G. D'Arcangelo, K. Nakajima, D. Goldowitz and T. Curran (1998). "Disabled-1 acts downstream of Reelin in a signaling

- pathway that controls laminar organization in the mammalian brain." Development **125**(18): 3719-29.
- Roelink, H., A. Augsburger, J. Heemskerk, V. Korzh, S. Norlin, A. Ruiz i Altaba, Y. Tanabe, M. Placzek, T. Edlund, T. M. Jessell and et al. (1994). "Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord." Cell **76**(4): 761-75.
- Roessler, E., E. Belloni, K. Gaudenz, P. Jay, P. Berta, S. W. Scherer, L. C. Tsui and M. Muenke (1996). "Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly." Nat Genet **14**(3): 357-60.
- Ross, A. C. (1993). "Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins." Faseb J **7**(2): 317-27.
- Ross, M. E., K. Swanson and W. B. Dobyns (2001). "Lissencephaly with cerebellar hypoplasia (LCH): a heterogeneous group of cortical malformations." Neuropediatrics **32**(5): 256-63.
- Rubenstein, J. L., S. Anderson, L. Shi, E. Miyashita-Lin, A. Bulfone and R. Hevner (1999). "Genetic control of cortical regionalization and connectivity." Cereb Cortex **9**(6): 524-32.
- Ruiz i Altaba, A. (1997). "Catching a Gli-mpse of Hedgehog." Cell **90**(2): 193-6.
- Ruiz i Altaba, A. (1999). "Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease." Development **126**(14): 3205-16.
- Ruppert, J. M., B. Vogelstein, K. Arheden and K. W. Kinzler (1990). "GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity." Mol Cell Biol **10**(10): 5408-15.
- Schinzel, A. (1979). "Postaxial polydactyly, hallux duplication, absence of the corpus callosum, macrencephaly and severe mental retardation: a new syndrome?" Helv Paediatr Acta **34**(2): 141-6.
- Schlaggar, B. L. and D. D. O'Leary (1991). "Potential of visual cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex." Science **252**(5012): 1556-60.

- Schneider, J. W., Z. Gao, S. Li, M. Farooqi, T. S. Tang, I. Bezprozvanny, D. E. Frantz and J. Hsieh (2008). "Small-molecule activation of neuronal cell fate." Nat Chem Biol **4**(7): 408-10.
- Schnitzer, J., W. W. Franke and M. Schachner (1981). "Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system." J Cell Biol **90**(2): 435-47.
- Schuurmans, C., O. Armant, M. Nieto, J. M. Stenman, O. Britz, N. Klenin, C. Brown, L. M. Langevin, J. Seibt, H. Tang, J. M. Cunningham, R. Dyck, C. Walsh, K. Campbell, F. Polleux and F. Guillemot (2004). "Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways." Embo J **23**(14): 2892-902.
- Schwab, M. H., A. Bartholomae, B. Heimrich, D. Feldmeyer, S. Druffel-Augustin, S. Goebbels, F. J. Naya, S. Zhao, M. Frotscher, M. J. Tsai and K. A. Nave (2000). "Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the Hippokampus." J Neurosci **20**(10): 3714-24.
- Schwab, M. H., S. Druffel-Augustin, P. Gass, M. Jung, M. Klugmann, A. Bartholomae, M. J. Rossner and K. A. Nave (1998). "Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX, neuroD, NDRF): spatiotemporal expression and targeted disruption of the NEX gene in transgenic mice." J Neurosci **18**(4): 1408-18.
- Shen, Q., W. Zhong, Y. N. Jan and S. Temple (2002). "Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts." Development **129**(20): 4843-53.
- Shimamura, K. and J. L. Rubenstein (1997). "Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain." Development **124**(14): 2709-18.
- Shimogori, T., V. Banuchi, H. Y. Ng, J. B. Strauss and E. A. Grove (2004). "Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex." Development **131**(22): 5639-47.
- Shin, S. H., P. Kogerman, E. Lindstrom, R. Toftgard and L. G. Biesecker (1999). "GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila cubitus interruptus*

- protein functions and localization." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2880-4.
- Shinya, M., S. Koshida, A. Sawada, A. Kuroiwa and H. Takeda (2001). "Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos." Development **128**(21): 4153-64.
- Shu, W., Y. Q. Jiang, M. M. Lu and E. E. Morrisey (2002). "Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung." Development **129**(20): 4831-4842.
- Sock, E., S. D. Rettig, J. Enderich, M. R. Bosl, E. R. Tamm and M. Wegner (2004). "Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling." Mol Cell Biol **24**(15): 6635-44.
- Soriano, E. and J. A. Del Rio (2005). "The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after." Neuron **46**(3): 389-94.
- Storm, E. E., J. L. Rubenstein and G. R. Martin (2003). "Dosage of Fgf8 determines whether cell survival is positively or negatively regulated in the developing forebrain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1757-62.
- Super, H., E. Soriano and H. B. Uylings (1998). "The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and Hippokampus." Brain Res Brain Res Rev **27**(1): 40-64.
- Sur, M. (1988). "Visual projections induced into auditory thalamus and cortex: implications for thalamic and cortical information processing." Prog Brain Res **75**: 129-36.
- Tao, W. and E. Lai (1992). "Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain." Neuron **8**(5): 957-66.
- Tarabykin, V., A. Stoykova, N. Usman and P. Gruss (2001). "Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression." Development **128**(11): 1983-93.
- te Welscher, P., A. Zuniga, S. Kuijper, T. Drenth, H. J. Goedemans, F. Meijlink and R. Zeller (2002). "Progression of vertebrate limb development

- through SHH-mediated counteraction of GLI3." Science **298**(5594): 827-30.
- Theil, T. (2005). "Gli3 is required for the specification and differentiation of preplate neurons." Dev Biol **286**(2): 559-71.
- Theil, T., G. Alvarez-Bolado, A. Walter and U. R  ther (1999). "Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development." Development **126**(16): 3561-71.
- Theil, T., S. Aydin, S. Koch, L. Grotewold and U. R  ther (2002). "Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon." Development **129**(13): 3045-54.
- Theil, T., S. Kaesler, L. Grotewold, J. Bose and U. R  ther (1999). "Gli genes and limb development." Cell Tissue Res **296**(1): 75-83.
- Tole, S., C. Christian and E. A. Grove (1997). "Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse Hippokampus." Development **124**(24): 4959-70.
- Tole, S., G. Goudreau, S. Assimacopoulos and E. A. Grove (2000). "Emx2 is required for growth of the Hippokampus but not for hippocampal field specification." J Neurosci **20**(7): 2618-25.
- Tole, S. and E. A. Grove (2001). "Detailed field pattern is intrinsic to the embryonic mouse Hippokampus early in neurogenesis." J Neurosci **21**(5): 1580-9.
- Tole, S., C. W. Ragsdale and E. A. Grove (2000). "Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant extra-toes(J)." Dev Biol **217**(2): 254-65.
- Uittenbogaard, M. and A. Chiaramello (2002). "Constitutive overexpression of the basic helix-loop-helix Nex1/MATH-2 transcription factor promotes neuronal differentiation of PC12 cells and neurite regeneration." J Neurosci Res **67**(2): 235-45.
- Uittenbogaard, M. and A. Chiaramello (2004). "Expression profiling upon Nex1/MATH-2-mediated neuritogenesis in PC12 cells and its implication in regeneration." J Neurochem **91**(6): 1332-43.

- Van der Loos, H. and T. A. Woolsey (1973). "Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs." Science **179**(71): 395-8.
- Vives, V., G. Alonso, A. C. Solal, D. Joubert and C. Legraverend (2003). "Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice." J Comp Neurol **457**(4): 404-19.
- Vortkamp, A., M. Gessler and K. H. Grzeschik (1991). "GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families." Nature **352**(6335): 539-40.
- Vortkamp, A., M. Gessler and K. H. Grzeschik (1995). "Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein." DNA Cell Biol **14**(7): 629-34.
- Vyas, A., B. Saha, E. Lai and S. Tole (2003). "Paleocortex is specified in mice in which dorsal telencephalic patterning is severely disrupted." J Comp Neurol **466**(4): 545-53.
- Wang, B., J. F. Fallon and P. A. Beachy (2000). "Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb." Cell **100**(4): 423-34.
- Willert, K. and R. Nusse (1998). "Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling." Curr Opin Genet Dev **8**(1): 95-102.
- Wilson, S. W. and J. L. Rubenstein (2000). "Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon." Neuron **28**(3): 641-51.
- Winter, R. M. and C. Tickle (1993). "Syndactylies and polydactylies: embryological overview and suggested classification." Eur J Hum Genet **1**(1): 96-104.
- Wodarz, A. and R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 59-88.
- Wrobel, C. N., C. A. Mutch, S. Swaminathan, M. M. Taketo and A. Chenn (2007). "Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors." Dev Biol **309**(2): 285-97.

- Xu, Y., M. Baldassare, P. Fisher, G. Rathbun, E. M. Oltz, G. D. Yancopoulos, T. M. Jessell and F. W. Alt (1993). "LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(1): 227-31.
- Xuan, S., C. A. Baptista, G. Balas, W. Tao, V. C. Soares and E. Lai (1995). "Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres." Neuron **14**(6): 1141-52.
- Ye, W., K. Shimamura, J. L. Rubenstein, M. A. Hynes and A. Rosenthal (1998). "FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate." Cell **93**(5): 755-66.
- Yu, F., Y. Cai, R. Kaushik, X. Yang and W. Chia (2003). "Distinct roles of G $\alpha$  and G $\beta$ 13F subunits of the heterotrimeric G protein complex in the mediation of Drosophila neuroblast asymmetric divisions." J Cell Biol **162**(4): 623-33.
- Zhou, C., S. Y. Tsai and M. J. Tsai (2001). "COUP-TFI: an intrinsic factor for early regionalization of the neocortex." Genes Dev **15**(16): 2054-9.
- Zhou, H., S. Kim, S. Ishii and T. G. Boyer (2006). "Mediator modulates Gli3-dependent Sonic hedgehog signaling." Mol Cell Biol **26**(23): 8667-82.
- Zilian, O., C. Saner, L. Hagedorn, H. Y. Lee, E. Sauberli, U. Suter, L. Sommer and M. Aguet (2001). "Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates." Curr Biol **11**(7): 494-501.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro- ( $10^{-6}$ )
Abb	Abbildung
B27	[Zusatzstoff in der Neurosphärenkultivierung]
bHLX	basische Helix Loop Helix
Bl/6	Black 6 (Mäusestamm)
BLBP	Brain lipid binding Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Bovines Serum-Albumin
BVZ	basale Vorläuferzelle
cDNA	copyDNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CTX	zerebrale Kortex
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIG	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoyribonukleotidtriphosphatgemisch
E12.5	Embryonalstadium 12.5 (Maus)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Endothelial Growth Factor
Emx1/Emx2	Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales Bovines Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor

---

FoxG1	Forkhead Box G1
g	Gramm
GAPDH	Glyceral-3-phosphat-Dehydrogenase
GLAST	Glutamat Transporter
Gli3	Zinkfinger-Transkriptionsfaktor
h	Stunde
HBSS	Hank's Ballanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
lacZ	β-Galactosidase-Gen
LGE	laterale ganglionäre Eminenz
m	Meter
m	milli-(10 <sup>-3</sup> )
M	molar (mol/l)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGE	mediale ganglionäre Eminenz
Min	Minute
mol	Mol (6,023 × 10 <sup>23</sup> Teilchen)
mRNA	Messenger-RNA
MZ	Marginalzone
n	nano- (10 <sup>-9</sup> )
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NE	neuroepitheliale Vorläuferzelle
NeuroD	Transkriptionsfaktor
Ngn	Neurogenin
°C	Grad Celsius
Pax6	Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren
PBS	Phosphate buffered saline

---

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pdn	Polydactyly Nagoya Mausmutante
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PP	Präplatte
RGC	radiale Gliazelle
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic Hedgehog
SSC	Natriumcitratsalz-Puffer
SVZ	Subventrikuläre Zone
Taq	Thermus aquaticus
Tbr2	T-box Transkriptionsfaktor
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
VZ	Ventikelzone
w/o	without
w/v	Volumen pro Gewicht
Wnt	Wingless-Int
$Xt^l/Xt^l$	extra-toes homozygote Mausmutante
$Xt^l/+$	extra-toes heterozygote Maus
ZNS	Zentrales Nervensystem

### 6.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Vereinfachte Darstellung der Verarbeitungsspezialisierung des Gehirns	9
Abb. 2:	Vereinfachte Darstellung der Signalzentren	12
Abb. 3:	Auswirkungen auf die Entwicklung des Telenzephalons der Maus bei Verlust von <i>Emx2</i> , <i>Pax6</i> und <i>Lhx2</i>	15
Abb. 4:	Entwicklung der Architektur des zerebralen Kortex der Maus	18
Abb. 5:	Entwicklungsbaum der Neurogenese im zerebralen Kortex	22
Abb. 6:	Neuroepithelium	24
Abb. 7:	Radiale Gliazelle	25
Abb. 8:	Basale Vorläuferzelle	28
Abb. 9:	Koronal geführte Kryostatschnitte durch das Telenzephalon eines Wildtyps (A.-D) und der <i>Gli3</i> -Mutante E12.5 (E-H) mit ektopischen Expressionsmustern für <i>BLBP</i> .	61
Abb. 10:	Ektopischen Expressionsmustern für <i>GLAST</i> <sup>+</sup> und fehlende Signale für <i>Tenascin</i> <sup>+</sup> RGC auf koronal geführten Kryostatschnitten durch das Telenzephalon E12.5	62
Abb.11:	Analyse der <i>Gli3</i> - Mutante E10,5 mit RGC spezifischen Markern	63
Abb.12:	Untersuchung auf Einfluss des <i>Gli3</i> -Gens auf die basalen Vorläuferzellen bei E11.5	65
Abb.13:	Untersuchung auf Einfluss des <i>Gli3</i> -Gens auf die basalen Vorläuferzellen bei E12.5	66
Abb.14:	Doppelfärbungen mit <i>BLBP</i> und <i>Tuj1</i> an <i>Gli3</i> -Mutanten bei E11.5 und E12.5 mit koronaler Schnittführung des Telenzephalons	68
Abb.15:	Analyse der <i>Wnt7b</i> -Mutante E12.5	70
Abb.16:	Genotypisierung mit Hilfe einer PCR der <i>Gli3/ Wnt7b</i> -Mutante	71
Abb.17:	Bestehende ektopische Expressionen RGC in der	

	<i>Gli3/Wnt7b</i> Mutante E12.5	<b>73</b>
Abb.18:	<i>BLBP</i> / <i>Wnt7b</i> Ko-Expression in neokortikalen Vorläuferzellen des dorsalen Telenzephalons	<b>75</b>
Abb.19:	Neurosphären in Kultur	<b>78</b>
Abb.20:	Genexpressionsanalyse von Neurosphären	<b>79</b>
Abb.21:	Keine Veränderungen bezüglich der Proliferationsfähigkeit und Vitalität	<b>83</b>
Abb.22:	Zellkulturaufnahmen ausdifferenzierter Neurosphären in gliale Zellrichtung nach 14 Tagen	<b>85</b>
Abb.23:	Gestörte Neurodifferenzierung in der <i>Gli3</i> -Mutante gezeigt an Tuj1 <sup>+</sup> Zellen	<b>87</b>
Abb.24:	Gestörte Neurodifferenzierung in der <i>Gli3</i> -Mutante gezeigt an Map2 <sup>+</sup> Zellen	<b>89</b>
Abb.25:	Zellkulturaufnahme ausdifferenzierter BLBP <sup>+</sup> Zellen nach 14 Tagen	<b>90</b>
Abb.26:	Erhöhte Anzahl RC2 <sup>+</sup> Zellen in der Differenzierungskultur aus <i>Gli3</i> -Neurosphären	<b>91</b>
Tabelle Nr.1	Zusammenfassung wichtiger Unterscheidungskriterien zwischen dem Neuroepithelium (NEZ), radialen Gliazellen (RGC) und basalen Vorläuferzellen (BVZ).	<b>29</b>
Tabelle Nr.2	Zusammenfassung der klinischen Zeichen der mit <i>Gli3</i> assoziierten Krankheiten	<b>37</b>
Tabelle Nr.3	Liste der verwendeten primär und sekundär Antikörper einschließlich der Verdünnungen	<b>45</b>
Tabelle Nr.4	Genotypisierung	<b>55</b>
Tabelle Nr.5	Oligonukleotide für die Genotypisierung	<b>55</b>
Tabelle Nr.6	Oligonukleotide für die Neurosphären-Analyse	<b>56</b>

## 6.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die auf verschiedene Weise die Entstehung und das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ganz besonderer Dank geht hierbei an;

- Prof. Dr. Thomas Skutella und Dr. Thomas Theil, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Motivation eine experimentelle Doktorarbeit zu beginnen.
- Dr. Thomas Theil, für die hervorragende Betreuung im Labor und außerhalb der heiligen Hallen der Anatomie Tübingen, mit einem stets offenem Ohr und aufbauenden Worten die weit über Arthur's Seat hinausreichen
- Sabine Conrad, für die exzellent technische, methodische und fachliche Betreuung zu jeder Tages- und Nachtzeit gepaart mit einer unersetzlichen Geduld und antreibender Ausdauer
- Dr. Andrea Wizenmann, für die produktiven Einfälle und Gedankenanstöße für das Vorankommen dieser Arbeit
- das Anatometeam, mit Petra Bareiß, Jürgen von der Ruhr, Roland Mohr, Friederike Utta, Marco Metzger, Timo Schmidt, Martin Zeeb, Tina Wiesner, Beate Aichele, Susanne Haussmann, Heike Michels-Nieser, Ulli Kohler, die mir alle stets mit Tipps und Tricks zur Seite standen und nebenbei zu einer unvergesslichen Zeit beigetragen haben
- Prof. Dr. Ingo Autenrieth für die Aufnahme in den Stipendiums-promotionskolleg und den mir damit vertieften Blick in die Forschung
- Familie Theil, für eine unvergessliche Zeit im schottischem Labor und der kulinarischer Art, mit dem Gefühl geleitet und nicht getrieben zu werden
- Meinen Freunden, die neben dem Laboralltag mit neuen Impulsen für unverzichtbare Abwechslung gesorgt haben
- Clara Hiller, die mir als Wirbelsturm und Anker zugleich die nötige Ausgeglichenheit schenkt
- besonders meinen Eltern, die mich stets in all meinen Plänen und Vorhaben moralisch unterstützen und mir einen Weg gebahnt haben

## 6.5 Lebenslauf

Thomas Weisner  
Geboren am 23.02.1983 in Beuthen  
deutsch

### Ausbildung

- |               |                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 08.94 – 08.03 | Besuch des Graf-Eberhard-Gymnasiums in Bad Urach<br>Abschluss: Abitur                                                                                                                                      |
| 09.03 – 07.04 | Zivildienst auf einer Allgemein Chirurgischen Station in Garmisch-Partenkirchen mit dem Schwerpunkt in der Endoprothetik geleitet von Dr. Schlemmer                                                        |
| 10.04 – 10.11 | Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen                                                                                                                                     |
| 03.06 – 06.07 | Experimentelle Doktorarbeit auf dem Gebiet der Hirnentwicklung unter Verlust des <i>Gli3</i> kodierten Zingfingertranskriptionsfaktors, Abteilung Tissue Engineering Anatomie Tübingen, Prof. Dr. Skutella |
| 04.07 – 07.09 | Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Tissue Engineering, Anatomie Tübingen, Prof. Dr. Skutella                                                                                                    |
| 08.09 – 03.10 | Erasmussemester in der Türkei, an der Istanbul University, Cerrahpaşa Medical Faculty, Abteilung Pädiatrie                                                                                                 |
| 09.10 – 07.11 | Praktisches Jahr an der Universität Tübingen, in den Abteilungen Pädiatrie und Innere Medizin mit anschließendem Chirurgie Tertial in der Schweiz am Lehrkrankenhaus der Universität Basel                 |
| 27.10.2011    | Ärztliche Prüfung ( Zweiter Abschnitt )                                                                                                                                                                    |

### Praktika

- |                |                                                                                                     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01.-30.09.2007 | Famulatur Dresden Friedrichstadt Abteilung Pulmologie, Dr. Wollschläger                             |
| 01.-30.03.2008 | Famulatur Hall in Tirol, Österreich im Bezirkskrankenhaus auf der Urologischen Abteilung, Dr. Joost |
| 08-09.2008     | Praktikum im Center for Neuroscience Research Edinburgh, Schottland, Abteilung Dr. Theil            |

- 
- 01.-30.04.2009 Famulatur in der Inneren Medizin, Cebu Doctors University Hospital Cebu City, Philippinen, Dr. Larrazabal
- 08.-28.02.2010 Famulatur in einer kinderärztlichen Praxis, Dr. Estedt
- 01.-31.03.2010 Famulatur im Bereich der pädiatrischen Kardiologie, Universitätsklinikum Tübingen, Dr. Baden

Universität

Fachschaftsarbeit im Arbeitskreis Mentorenprogramm,  
Leitung des Arbeitskreises „Mit Sicherheit verliebt“