

Charakterisierung der Funktion des Zinkfinger-
Transkriptionsfaktors Cst während der
Musterbildung im dorsalen Neuralrohr

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Silke Koch

aus Düsseldorf

2008

Aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Korreferent: PD Dr. Thomas Theil

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juli 2008

meinen Eltern

INHALT

1	EINLEITUNG	7
1.1	Grundlagen der Entwicklungsbiologie	7
1.2	Das Zentralnervensystem	9
1.2.1	Das Gehirn	10
1.2.2	Das Rückenmark	12
1.3	Mechanismen der Neurogenese	15
1.3.1	Dorso-ventrale Musterbildung im Neuralrohr	18
1.3.1.1	Musterbildung im ventralen Neuralrohr	19
1.3.1.2	Musterbildung im dorsalen Neuralrohr	21
1.4	Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Cst	26
1.5	Zielsetzung der Arbeit	28
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Standard-Chemikalien und Lösungen	30
2.1.1	Allgemeines	30
2.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	30
2.2	Biologisches Material	31
2.2.1	Eier	31
2.2.2	Mäuse	31
2.2.3	Bakterien	31
2.2.4	DNA-Techniken	32
2.2.5	Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	32
2.2.6	Dephosphorylierung von DNA	32
2.2.7	Umwandlung kohäsiver Enden in glatte Enden	32
2.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	33
2.2.9	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.2.11	Transformation von Plasmid-DNA.	34
2.2.12	Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.12.1	Plasmid-Präparation aus 5 ml Kulturen (Mini-Präp)	35
2.2.12.2	Plasmid-Präparation aus 100 ml Kulturen (Maxi-Präp)	36
2.2.13	Phenol-Chloroform-Extraktion	36
2.2.14	Natriumacetat-Ethanol-Fällung	36
2.2.15	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.16	PCR	37
2.2.17	Reverse Transkription	38
2.2.18	Erzeugung doppelsträngiger Oligonukleotide	38
2.2.19	Radioaktive Markierung doppelsträngiger Oligonukleotide mit γ - ³² P-ATP	38

2.2.20	Sequenzierung	39
2.2.21	Oligonukleotide	39
2.3	RNA-Techniken	40
2.3.1	RNA-Isolierung aus embryonalen Geweben	40
2.3.2	Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	40
2.3.3	Ammoniumacetat-Fällung	41
2.3.4	<i>Whole mount in situ</i> Hybridisierungen	42
2.3.5	<i>In situ</i> Hybridisierungen auf Paraffinschnitten	44
2.4	Protein-Techniken	45
2.4.1	Gewinnung von GST-Fusionsproteinen	45
2.4.2	Gelretardationsanalyse	46
2.4.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.4.4	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	48
2.5	<i>In ovo</i> Elektroporation	48
2.5.1	BrdU-Markierung	50
2.5.1.1	Hühnerembryonen	50
2.5.1.2	Mausembryonen	51
2.6	Isolierung definierter Embryonalstadien	51
2.6.1	Maus	51
2.6.2	Huhn	51
2.7	Histologische Techniken	52
2.7.1	Kryoschnitte	52
2.7.2	Paraffinschnitte	52
2.8	Immunohistochemie	53
2.8.1	Antikörperfärbung auf Kryostatschnitten	53
2.8.2	Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten	55
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Expressionsanalyse von <i>Cst</i> im Neuralrohr	57
3.2	Funktion von <i>Cst</i> während der Musterbildung im Rückenmark	60
3.3	Einfluss von <i>Cst</i> auf die Subtypspezifizierung von Neuronen des Rückenmarks	68
3.4	Molekulare Mechanismen der durch <i>Cst</i> induzierten neuronalen Differenzierung	70
3.4.1	Einfluss von <i>Cst</i> auf Schlüsselfaktoren der Proliferation und neuronaler Differenzierung	71
3.4.2	Die zentralen <i>Cst</i> -Motive binden spezifisch die Castor Ziel-Sequenz	76
3.4.3	Elektroporation mit Repressor- und Aktivator-Konstrukten	80
3.5	<i>Cst</i> und negative Regulatoren der Differenzierung	82
3.5.1	Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und Hes5-GFP	83
3.5.2	Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und Id2-GFP	84
3.6	<i>Cst</i> und proneurale bHLH-Transkriptionsfaktoren	86
3.6.1	Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und Math1	87
3.6.2	Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und Ngn1-GFP	89

3.6.3	Koelektroporation von Myc-Cst und Cash1-GFP	91
3.7	Regulation der <i>Cst</i> -Expression	93
3.7.1	Regulation der <i>Cst</i> -Expression durch Signalmoleküle aus der Dachplatte	94
3.7.2	Einfluss von Wnt auf die <i>Cst</i> -Expression	95
3.7.3	Einfluss der Bmp-Signaltransduktion auf die <i>Cst</i> -Expression	97
4	DISKUSSION	99
4.1	Die Expression von <i>Cst</i> im Neuralrohr von Vertebraten ist evolutionär konserviert	103
4.2	Regulation der <i>Cst</i> -Expression durch Signale aus der Dachplatte	105
4.3	<i>Cst</i> fördert neuronale Differenzierung	109
4.3.1	Charakterisierung der durch <i>Cst</i> unterstützten neuronalen Differenzierung	110
4.3.2	<i>Cst</i> schränkt die Wirkung von Inhibitoren neuronaler Differenzierung ein	113
4.3.3	Die zentrale Zinkfinger-Domäne des <i>Cst</i> -Proteins fördert neuronale Differenzierung	117
4.4	<i>Cst</i> nimmt alleine keinen Einfluss auf die Subtypspezifizierung	120
4.5	<i>Cst</i> kooperiert spezifisch mit Math1 bei der Bildung von dI1-Interneuronen	120
4.5.1	<i>Cst</i> als Teil des Netzwerkes zwischen Proliferation, Differenzierung und Subtypspezifizierung im dorsalen Neuralrohr	126
5	ZUSAMMENFASSUNG	127
6	SUMMARY	128
7	ANHANG	129
7.1	Abkürzungen	129
7.2	Sequenzen	133
7.2.1	<i>Cst</i> I-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz	133
7.3	Abbildungsverzeichnis	136
7.4	Tabellenverzeichnis	136
7.5	Literaturverzeichnis	137
7.6	Danksagung	154
7.7	Erklärung	155

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen der Entwicklungsbiologie

Die Entwicklungsbiologie erforscht wie aus der vergleichsweise wenig strukturierten Materie einer befruchteten Eizelle durch Zellteilung, Differenzierung, Zellwanderung und Apoptose Gewebe und Organe entstehen, die in ihrer Gesamtheit und in ihrem Zusammenspiel einen komplexen, vielzelligen Organismen darstellen.

Der Befruchtung einer tierischen Eizelle durch ein Spermium folgt zunächst eine Reihe von Furchungsteilungen. Hierbei werden in rascher Folge mehrere Phasen der DNA-Replikation und mitotische Teilungen durchlaufen, ohne die Zellmasse zu vermehren. In diesem Stadium der Embryogenese wird die Zygote also schnell in eine größere Anzahl kleinerer diploider Zellen (Blastomeren) unterteilt, die sich bei den meisten Arten um einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Blastula) herum anordnen. Die nächste Phase der Embryogenese, die Gastrulation ist neben einem hohen Maß an Proliferation vor allem durch die gezielte Wanderung von Zellen in das Innere der Hohlkugel gekennzeichnet und der damit verbundenen Bildung der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Während der Gastrulation angeschlossenen Neurulation entwickelt sich aus Zellen ektodermalen Ursprungs die Anlage des Zentralnervensystems (ZNS), aus der im Laufe der späteren Organogenese das Gehirn und das Rückenmark hervorgehen. Außerdem wandern aus dem Ektoderm weitere, sogenannte Neuralleistenzellen in verschiedene Bereiche des Embryos und beteiligen sich im Verlauf der Organogenese an der Bildung einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe und Organe wie Knochen und Knorpel im Kopfbereich, Binde- oder Nervengewebe oder Schilddrüse und Thymus, um nur einige Beispiele zu nennen. Im Weiteren bilden Zellen des Ektoderms mit der Epidermis auch einen Teil der Haut. Dagegen entwickelt sich aus mesodermalen Zellen zunächst die Chorda dorsalis und die Somiten sowie das Herz, Blut und Gefäße, die Nieren, Keimdrüsen, Bindegewebe, das Skelett und die Gliedmaßen. Die Somiten werden ihrerseits weiter zu Muskelgewebe, Knorpel, Wirbelknochen und der Dermis der Haut umgewandelt. Das Endoderm schließlich formt den Darm und mit diesem assoziierte Organe wie die Bauchspeicheldrüse und die Leber aber auch die Lunge. Für die embryonale Entwicklung eines Organismus ist neben der Bildung von Geweben und Organen zunächst aber auch die schrittweise Festlegung der verschiedenen Hauptkörperachsen zwischen Kopf und Schwanz (anterior-posterior), Rü-

cken und Bauch (dorsal-ventral) und den beiden Seiten rechts und links (medio-lateral) zu einem übergeordneten Körperbauplan von grundlegender Bedeutung (Wolpert *et al.*, 2007, Wilt *et al.*, 2004, Gilbert, 2000). Diese drei Achsen werden orthogonal zueinander angeordnet, vergleichbar einem dreidimensionalen Koordinatensystem in dem jeder Position eines Körpers diskrete Koordinaten zugeordnet werden können.

Damit während der Entwicklung eines Organismus aber überhaupt so komplexe Strukturen wie Organe und Gewebe gebildet werden können, ist es schon zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese wichtig, dass Zellen unterschiedliche Schicksale annehmen und beginnen, in unterschiedliche Richtungen zu differenzieren. Es ist notwendig, dass räumliche und zeitliche Muster zellulärer Aktivität organisiert werden. Der Musterbildung liegt allerdings kein einzelner universeller Mechanismus zugrunde, eher wird sie in verschiedenen Organismen und in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung durch eine Vielzahl zellulärer und molekularer Prozesse erreicht. Die mitunter wichtigsten Voraussetzungen sind dabei die Interaktion und Kommunikation der Zellen miteinander, bei der eine einzelne oder eine Gruppe von Zellen ein Signal erzeugt und aussendet, das letztendlich die genetische Aktivität von Zielzellen beeinflusst. Zum Beispiel kann der Sezernierung von Faktoren die Aktivierung spezifischer Signalkaskaden folgen, in deren Verlauf die Aktivierung oder auch die Inhibierung von Transkriptionsfaktoren steht, die ihrerseits die Expression bestimmter Zielgene modifizieren. Die spezifische Genaktivität einer Zelle ist wiederum die Grundlage für die angestrebte Diversität und richtungsweisend für das weitere Schicksal der Zelle.

Untersuchungen an unterschiedlichsten Organismen wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*), des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*), des Zebrafisches (*Danio rerio*), der Maus (*Mus musculus*) oder des Huhns (*Gallus gallus*) haben bereits gezeigt, dass viele molekularen Mechanismen der Embryogenese evolutionär hoch konserviert sind (Wolpert *et al.*, 2007). Für die Erforschung, welche Funktion einzelne beteiligte Faktoren während der Embryogenese erfüllen und welcher genetischen Kontrolle entwicklungsrelevante Prozesse unterliegen, bieten die genannten Modellorganismen unterschiedliche Vorteile für verschiedene experimentelle Ansätze. Beispielsweise sind die Vorteile der Fruchtfliege als Modellsystem für Invertebraten ihre geringe Größe, die einfach zu erfüllenden Haltungsbedingungen und die kurze Generationszeit. Attraktiv für genetische Experimente ist *Drosophila* auch, da ihr Genom im Vergleich zu Vertebraten weniger komplex und durch eine Reihe verfügbarer genetischer Werkzeuge manipulierbar ist (Wilt *et al.*, 2004). Ähnliches gilt z.B. auch für die Maus als Modellorganismus für Säugetiere. Auch ihre Hal-

tung ist vergleichsweise anspruchslos und sie ist relativ einfach zu züchten. Das Genom der Maus zeigt eine weitreichende Übereinstimmung mit dem des Menschen und sowohl die Analyse als auch genetische Experimente mit Genfunktionsgewinn und -verlust-(**Knock out**)-Mutanten sind wichtige Mittel, die Funktion und Wirkungsweise von Genen und ihren Produkten aufzuklären (Wilt *et al.*, 2004, Wolpert *et al.*, 2007, Capecchi, 1998a, b). Für die Entwicklungsbiologie ist das Huhn, neben der guten Verfügbarkeit befruchteter Eier und einfach zu erfüllenden Brutbedingungen, gerade wegen seiner extrauterinen Entwicklung ein weiteres interessantes Modellsystem. Der Embryo ist leicht zugänglich und so widerstandsfähig, dass z.B. mikrochirurgische oder auch genetische Manipulationen durchgeführt werden können. Dadurch ist es u.a. auch möglich an diesem Modellorganismus die Entwicklung des Nervensystems zu studieren und anhand von Überexpressionsstudien die Funktion beteiligter Gene zu analysieren (Wolpert, 2004, Stern, 2005).

1.2 Das Zentralnervensystem

Die Gesamtheit des Nervengewebes eines Organismus dient der Erfassung, Weiterleitung, Auswertung, Speicherung und Aussendung von Informationen. Zusammen mit dem Hormonsystem kann das Nervensystem die Leistung aller Organsysteme regeln und sie entsprechend den Anforderungen der ständig variierenden Bedingungen der Außenwelt anpassen.

Das Nervensystem der Vertebraten gliedert sich anatomisch in das **Zentralnervensystem** (ZNS) bestehend aus Gehirn und Rückenmark und das **periphere Nervensystem** (PNS), dem die Hirn- und Spinalnerven und sämtliche außerhalb des ZNS liegenden Nervenbahnen und Nervenzellen zugeordnet werden. Das ZNS kann grundsätzlich als ein übergeordnetes Zentrum angesehen werden, das durch das PNS mit der Peripherie des Organismus verbunden ist. Daneben wird das Nervensystem funktionell in das willkürliche, somatische auch als animales Nervensystem bezeichnete und das autonome, vegetative Nervensystem unterteilt. Dem somatischen Nervensystem obliegt die Steuerung aller dem Willen und dem Bewusstsein unterworfenen sensomotorischen Vorgänge, während das vegetative Nervensystem nicht direkt durch den Willen zu beeinflussen ist und die Funktion der inneren Organe steuert. Das vegetative Nervensystem besteht seinerseits aus den beiden Anteilen Sympathikus und Parasympathikus (Mutschler *et al.*, 2007, Thews *et al.*, 1999).

Innerhalb des Nervengewebes können grundsätzlich zwei Klassen von Zelltypen unterschieden werden, die ihrerseits dann weiter in zahlreiche Unterarten gegliedert werden können.

Eine Klasse wird von Neuronen gebildet, die der Erregungsbildung, Reizverarbeitung und Erregungsleitung dienen, und die andere von Gliazellen, die in ihrer Gesamtheit auch als Nervenbindegewebe bezeichnet werden. Die Gliazellen übernehmen meist Stütz-, Versorgungs- und immunologische Schutzfunktion. Sie können durch Zellteilung Defekte im Nervengewebe ausfüllen, stehen im Kontakt mit Blutkapillaren, umgeben als Hüll- oder Mantelzellen Neuronen und bilden so z.B. die Blut-Hirn-Schranke oder erhöhen als Myelinscheiden die Geschwindigkeit der Erregungsleitung. Da Myelin makroskopisch weiß erscheint, wird im ZNS anhand der Verteilung von Nervenzellen und Nervenbindegewebe die sogenannte weiße Substanz (Substantia alba) von der grauen Substanz (Substantia grisea) unterschieden. Zur weißen Substanz gehören demnach die Bereiche des ZNS, in denen die als Bahnen bezeichneten, myelinhaltigen Nervenfasern verlaufen. Hingegen bilden größere Ansammlungen eng beieinander liegender Nervenzellkörper und Dendriten als graue Substanz im ZNS die Schmetterlingsfigur und Ganglien im Rückenmark sowie die Hirnrinden (Corti) und Kerngebiete (Basalganglien) im Gehirn (Abb. 1) (Trepel, 2004, Mutschler *et al.*, 2007).

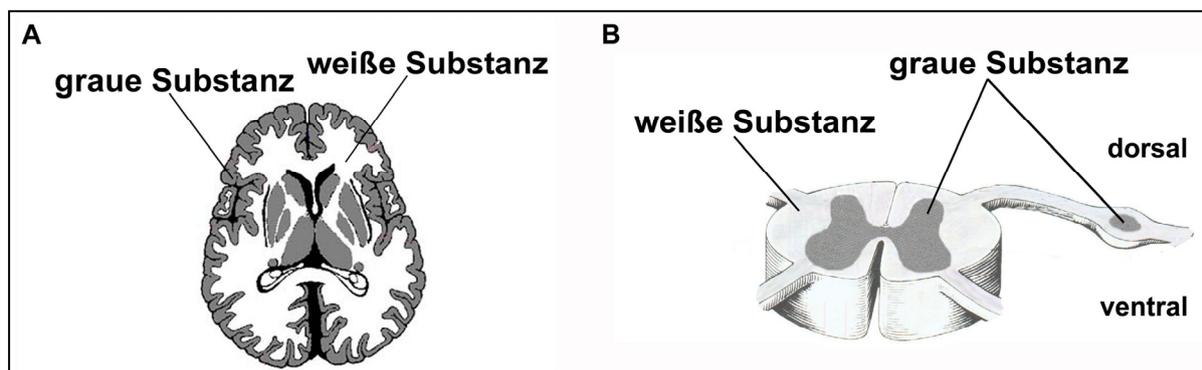


Abb. 1: Schematische Darstellung der grauen und weißen Substanz im Zentralnervensystem.

Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der grauen und weißen Substanz des menschlichen Zentralnervensystems im (A) Gehirn und (B) Rückenmark. (A) Der Horizontalschnitt durch beide Hirnhälften (Hemisphären) zeigt die außen liegende graue Substanz der Hirnrinde (Cortex) und der innen liegenden Kerngebiete (Basalganglien). (B) Der Querschnitt zeigt die schmetterlingsförmige graue Substanz des Rückenmarks umgeben von weißer Substanz und eines der ebenfalls zur grauen Substanz zählenden Hinterwurzelganglien. (Quelle: modifiziert, nach www.uni-saarland.de).

1.2.1 Das Gehirn

Das adulte Gehirn besteht abgesehen von der Einteilung in graue und weiße Substanz aus mehreren anatomisch und funktionell unterschiedlichen Anteilen, dem auch als Cerebrum bezeichneten Groß- oder Endhirn (Telencephalon) (Abb. 2A), dem Zwischenhirn (Diencephalon) (Abb. 2B), dem Mittelhirn (Mesencephalon) (Abb. 2C) und dem Rautenhirn (Rhombencephalon) (Abb. 2D) (Trepel, 2004, Schmidt *et al.*, 2006). Das Telencephalon besteht aus den

zwei Hirnhälften (Hemisphären) und den Basalganglien (Abb. 1A, Abb. 2A). Die beiden Hemisphären sind nur durch, als Balken (Corpus callosum) bezeichnete, Nervenfaserverbindungen (Kommissuren) untereinander verschaltet und arbeiten meist unabhängig voneinander. In der außen liegenden, aus grauer Substanz bestehenden Großhirnrinde sind z.B. beim Menschen etwa $\frac{3}{4}$ aller Neuronen des Gehirns enthalten. Das Großhirn selbst gilt als Sitz des Bewusstseins, d.h. aller bewussten Handlungen und Empfindungen, des Willens und des Gedächtnisses und bei hoch entwickelten Organismen auch der Kreativität und Sprache. Das Diencephalon besteht hauptsächlich aus dem Thalamus und dem Hypothalamus (Abb. 2B). Durch den Thalamus verlaufen sämtliche afferenten d.h. alle sensiblen oder sensorischen Nervenfasern, die von der Peripherie zum ZNS leiten. Im Hypothalamus befinden sich die dem vegetativen Nervensystem übergeordneten Zentren durch die hormonelle Regelkreise kontrolliert werden. Das Mesencephalon (Abb. 2C) umfasst ein optisches und akustisches Reflexzentrum sowie motorische und sensible Bahnen und ist auf die Steuerung unwillkürlicher Mitbewegungen spezialisiert. Zum entwicklungsgeschichtlichen ältesten Teil des Gehirns, dem Rhombencephalon, gehören das Kleinhirn (Cerebellum, Metencephalon), die Brücke (Pons) und die Medulla oblongata (Myelencephalon) (Abb. 2D).

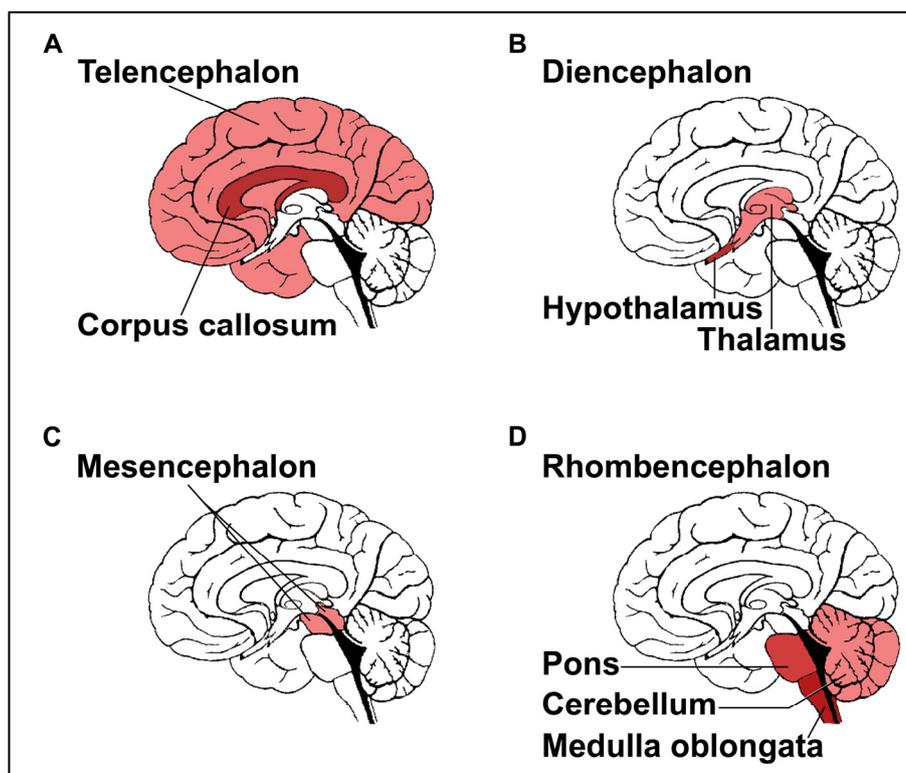


Abb. 2: Schematische Darstellung der Hirnregionen.

(A) Telencephalon (Groß- oder Endhirn) (rosa) mit Corpus Callosum (rot), (B) Diencephalon (Zwischenhirn) mit den Anteilen Thalamus (rot) und Hypothalamus (rosa), (C) Mesencephalon (Mittelhirn) (rosa), (D) Rhombencephalon (Rautenhirn) mit Kleinhirn (Metencephalon) (rosa), Pons (hellrot) und Medulla oblongata (Myelencephalon) (rot). (Quelle: modifiziert, nach www.ims.uni-stuttgart.de).

Das Cerebellum besteht ähnlich dem Cerebrum ebenfalls aus zwei Hemisphären, deren dünne Rinde von grauer Substanz gebildet wird. Der Hauptanteil wird allerdings von weißer Substanz gebildet, in die einige weitere Basalganglien eingebettet sind. Das Kleinhirn ist das koordinierende motorische Zentrum. Es reguliert in Abstimmung mit dem Großhirn sowohl den Muskeltonus als auch die Feinabstimmung von Bewegungen und steuert mit Hilfe der Informationen aus dem Gleichgewichtsorgan die Körperstellung zur Aufrechterhaltung des Körpergleichgewichtes. In der Pons sind im Weiteren jene quer verlaufenden Bahnen zusammengefasst, durch die die zur Kontrolle der Willkürmotorik vorausgesetzte Kommunikation zwischen Groß- und Kleinhirn gewährleistet wird. Neben dieser Kleinhirnschleife verlaufen durch die Brücke zusätzlich auch noch die Bahnen zwischen dem Großhirn und dem Rückenmark. Die Medulla oblongata letztendlich bildet im ZNS als verlängertes Mark den Übergang zwischen dem Gehirn und dem Rückenmark. Sie enthält sowohl die afferenten als auch die vom ZNS zur Peripherie ziehenden motorischen efferenten Nervenfasern und lebenswichtige vegetative Zentren wie das Herz-Kreislauf- und das Atemzentrum und die Zentren für den Schluck-, Husten-, Nies- und Brechreflex (Trepel, 2004, Schmidt *et al.*, 2006).

1.2.2 Das Rückenmark

Das Rückenmark (Medulla spinalis) der Wirbeltiere ist als Teil des ZNS die Verbindung zwischen dem Gehirn und den Rückenmarks- oder Spinalnerven des PNS. Es geht aus der Medulla oblongata (1.2.1) hervor, verläuft durch den schützenden Wirbelkanal der Wirbelsäule und reicht beim adulten Organismus bis zum ersten oder zweiten Lendenwirbel. Obwohl es äußerlich selbst, im Gegensatz zur Wirbelsäule, nicht in Segmente unterteilt ist, spricht man doch von einer segmentalen Gliederung des Rückenmarks, wobei sich die Benennung der unterschiedlichen Abschnitte an den Anteilen der Wirbelsäule orientiert (Thews *et al.*, 1999, Mutschler *et al.*, 2007). Über die gesamte Länge des Rückenmarks entspringen zu beiden Seiten eines jeden Wirbelsegmentes jeweils eine vordere und eine hintere Nervenwurzel, bestehend aus den zusammengefassten Axonen der lokalen Neuronen. Die Vorder- und Hinternervenwurzeln einer Seite vereinigen sich jeweils zu einem Spinalnerv und bilden so den Übergang zum PNS. Die Spinalnerven verlassen ihrerseits den Wirbelkanal durch die Zwischenwirbellöcher (Foramen intervertebralis) (Abb. 3). Wegen des unterschiedlichen Längenwachstums von Wirbelsäule und Rückenmark differieren allerdings ab dem mittleren Lendenwirbelbereich die Lage des Rückenmarksegmentes und der Austritt des Spinalnerves durch das zugehörige Foramen intervertebrale. Die Nervenwurzeln dieser Lenden- und der nachfolgen-

den Steißbeinsegmente legen daher als parallel verlaufende Nervenfasern eine längere Strecke durch den Wirbelkanal zurück und werden wegen dieser Anordnung auch als Pferdeschweif (Cauda equina) bezeichnet (Trepel, 2004).

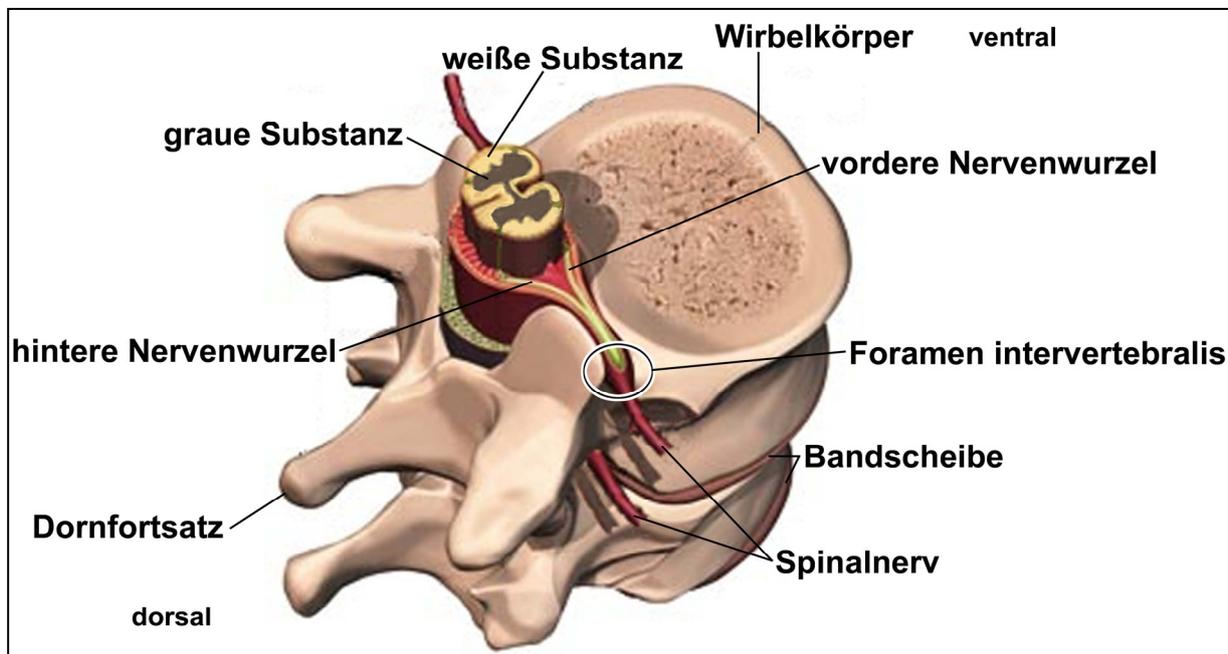


Abb. 3: Rückenmark im Wirbelkörper.

Schematische Darstellung des Rückenmarks eingefasst in Wirbelkörper. Das Rückenmark, bestehend aus grauer und weißer Substanz liegt im Zentralkanal der durch Bandscheiben getrennten Wirbelkörper. Dorsal treten die hinteren Nervenwurzel aus dem Rückenmark aus und vereinigen sich mit den aus dem ventralen Bereich des Marks austretenden vorderen Nervenwurzeln zu den Spinalnerven. Diese verlassen den Wirbelkanal durch die benachbarten Zwischenwirbellöcher (Foramen intervertebralis). (Quelle: modifiziert, nach www.dr-gumpert.de).

Die innere Struktur des Rückenmarks kann zunächst durch eine Unterteilung in graue und weiße Substanz beschrieben werden. Ein Querschnitt durch den Zentralkanal zeigt (Abb. 4) die schmetterlingsförmige graue Substanz mit den Nervenzellkörpern und die umliegende weiße Substanz, bestehend aus Nervenbahnen, die efferente Nervenimpulse vom Gehirn zur Peripherie und umgekehrt afferente Impulse von der Peripherie zum Gehirn leiten. Bei der grauen Substanz wird auf jeder Seite ein nach ventral gerichtetes so genanntes Vorderhorn und ein entsprechend nach dorsal orientiertes Hinterhorn, im Bereich des im Thorax verlaufenden Rückenmarks auch noch lateral je ein kleines Seitenhorn unterschieden. Jedes Vorderhorn enthält motorische Nervenzellen vom Typ der α - und γ -Motorneuronen. Dem Vorderhorn entspringt die bereits erwähnte Vorderwurzel, bestehend aus efferenten, motorischen Fasern, die zu den motorischen Endplatten der Skelettmuskulatur und zu den Muskelspindeln ziehen. Die Nervenzellen des Hinterhorns zählen zu den Interneuronen. Zu diesen ziehen die sensiblen, afferenten Nervenfasern, die Nervenimpulse aus der Peripherie zunächst über die

Spinalnerven und weiter über die Hinterwurzeln zum Rückenmark leiten. Am Übergang vom Spinalnerv zur Hinterwurzel liegt innerhalb einer Verdickung das von den Nervenzellkörpern der afferenten, sensiblen Nerven gebildete Spinalganglion. Sowohl efferente als auch afferente Nervenzellen des vegetativen Nervensystems liegen in den Seitenhörnern des Thorakalmarks. Die Axone der efferenten Neuronen verlassen das Rückenmark wie die motorischen Nervenfasern über die vordere Wurzel, die afferenten, sensiblen Fasern treten über die Hinterwurzel ein (Trepel, 2004, Thews *et al.*, 1999, Mutschler *et al.*, 2007).

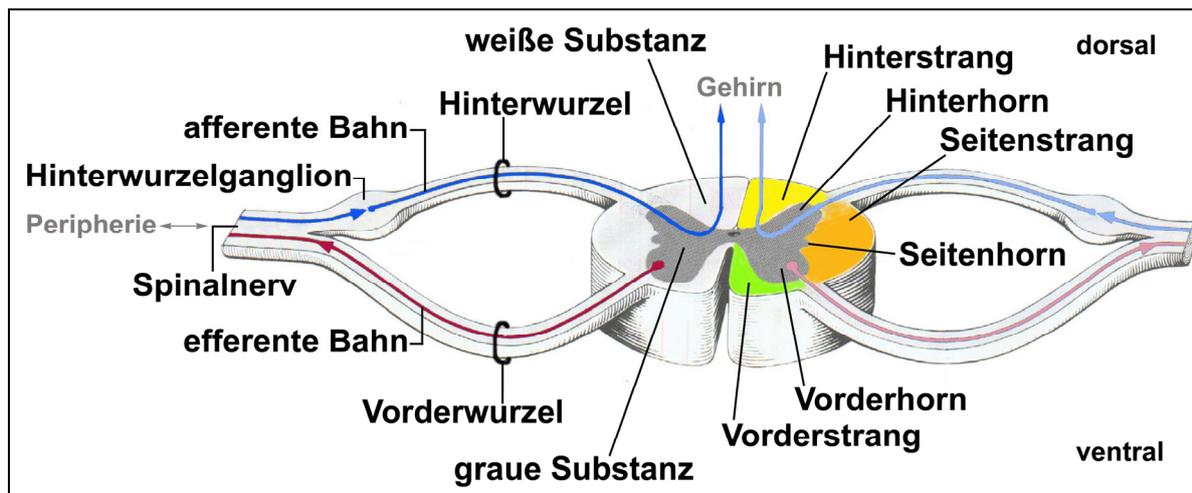


Abb. 4: Schematische Darstellung des inneren Struktur des Rückenmarks.

Die Abbildung zeigt einen schematischen Querschnitt des Rückenmarks. Im Rückenmark kann die schmetterlingsförmige graue von der umliegenden weißen Substanz unterschieden werden. Die graue Substanz wird unterteilt in ein nach dorsal gerichtetes Hinterhorn, ein Seitenhorn (nur im Thorakalbereich) und ein nach ventral gerichtetes Vorderhorn. An das Gehirn gerichtete Impulse aus der Peripherie werden über afferente Bahnen (blau) des Spinalnervs zum Hinterwurzelganglion, die Hinterwurzel und schließlich zu den Interneuronen des Hinterhorns geleitet. Dagegen werden über die, dem Vorderhorn entspringende Vorderwurzel an die Peripherie gerichtete efferente Impulse (rot) geleitet. Durch die Vorder- und Hinterwurzel wird die weiße Substanz noch weiter in den Vorder- (grün), Seiten- (orange) und Hinterstrang (gelb) unterteilt. (Quelle: modifiziert, nach www.uni-saarland.de).

Die weiße Substanz des Rückenmarks wird zunächst durch eine tiefe ventral gelegene Spalte und dorsal durch eine bindegewebige Trennschicht in zwei Hälften unterteilt. Außerdem wird die weiße Substanz jeder Hälfte durch die Nervenwurzeln weiter in einen Vorder- (Funiculus anterior), Seiten- (F. lateralis) und Hinterstrang (F. posterior) separiert. Im Seitenstrang verlaufen vor allem efferente Bahnen für die Willkürmotorik und afferente Bahnen für groben Druck, Schmerz und Temperatur. Den Hinterstrang passieren afferente, sensible Bahnen, die Informationen von Rezeptoren der Haut, der Muskeln, der Sehnen und Gelenke zum Gehirn leiten und so Berührungs-, Tastempfindung und Tiefensensibilität vermitteln. Über die wiederum efferenten Bahnen des Vorderstranges werden unbewusste Bewegungen, Willkürmotorik und Muskeltonus gesteuert (Trepel, 2004, Thews *et al.*, 1999, Mutschler *et al.*, 2007).

Die hier nur in Ansätzen beschriebene, enorme Vielfalt und Komplexität des Zentralnervensystems ist für die Lebensfähigkeit eines Organismus unerlässlich und erfordert als Basis bereits bei dessen Entwicklung eine präzise Koordination von Prozessen zur Etablierung der verschiedenen auf einander aufbauenden und interagierenden Komponenten.

1.3 Mechanismen der Neurogenese

Nachdem in der Gastrulation die verschiedenen Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm etabliert wurden, beginnt mit der anschließenden Neurogenese die zur Bildung des Nervensystems entscheidende Phase der Embryonalentwicklung.

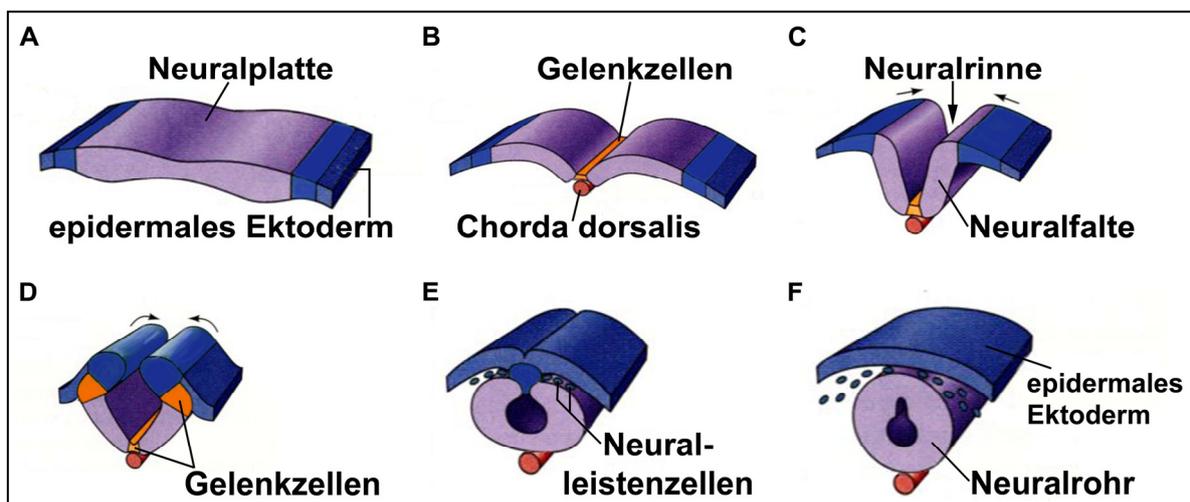


Abb. 5: Schematische Darstellung der Bildung des Neuralrohres.

(A) Elongierte Zellen des Neuroektoderms bilden die Neuralplatte (violett) und können leicht von den flacheren Zellen des epidermalen Ektoderms (blau) unterschieden werden. (B) Mit andauernder Elongation erheben sich die Randbereiche der Neuralplatte und wandern aufeinander zu, oberhalb der Chorda dorsalis bilden sich in der ventralen Mittellinie keilförmige Gelenkzellen. (C) Die Erhebung der Randbereiche der Neuralplatte führt zur Bildung der Neuralfalten, die in der ventralen Mittellinie durch Gelenkzellen miteinander verbunden sind. Zwischen den Neuralfalten liegt die Neuralrinne. (D) Die Bewegung des epidermalen Ektoderms in Richtung der dorsalen Mittellinie wird fortgesetzt. In dorso-lateralen Bereichen der Neuralfalten werden wiederum Gelenkzellen ausgebildet. (E) Die Einfaltung in Richtung der dorsalen Mittellinie wird fortgesetzt bis die Ränder der Neuralfalten einander berühren. Gleichzeitig beginnen sogenannte Neuralleisten-Zellen den Epithelverband zu verlassen und mesenchymalen Charakter anzunehmen. (F) Durch die Fusion der Neuralfalten wird das Neuralrohr gebildet. Darüber arrangiert sich das Ektoderm wieder zu einem einheitlichen epidermalen Epithel. Neuralleisten-Zellen wandern aus. (Quelle: modifiziert, nach Gilbert, 2000)

Durch Signale aus der Chorda dorsalis, einer tiefer liegenden Struktur axialen Mesoderms wird neben einer Änderung der Adhäsionseigenschaften zunächst eine Formänderung der an der Oberfläche befindlichen neuroektodermalen Zellen induziert (Wilt, 2004). Mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts elongieren die Zellen des Neuroektoderms und bilden so die Neuralplatte, eine Schicht im Querschnitt dicker erscheinenden Zellen, die leicht von den an-

grenzenden, flacheren Zellen des epidermalen Ektoderms unterschieden werden können (Abb. 5A). Im Folgenden erheben sich die Randbereiche der Neuralplatte und wandern aufeinander zu (Abb. 5B), während in der ventralen Mittellinie liegende Zellen weiter elongieren und eine Keilform annehmen. Daraus resultiert die Einfaltung der Neuralplatte zur so genannten Neuralrinne zwischen den durch Gelenkzellen verbundenen Neuralfalten (Abb. 5C). Vorangetrieben durch die Bewegung des epidermalen Ektoderms und unterstützt durch die Entstehung weiterer diesmal dorso-lateral gelegener Gelenkzellen wird die Einfaltung in Richtung der dorsalen Mittellinie soweit fortgesetzt, bis die Ränder der Neuralfalten dort einander berühren und ihre Fusion die Bildung des Neuralrohres abschließt (Abb. 5D-F) (Gilbert, 2000, Wilt, 2004). Das so gebildete Neuralrohr wird vollständig separiert und verbleibt in mesodermaler Position während sich das darüber liegende Ektoderm an der Oberfläche wieder zu einem einheitlichen Epithel arrangiert. Mit der Schließung des Neuralrohres geht außerdem einher, dass einige Zellen aus dem Epithelverband delaminieren und mesenchymale Eigenschaften annehmen (Abb. 5F). Diese Neuralleisten-Zellen wandern entlang distinkter Migrationspfade in periphere Körperregionen aus und werden später zu verschiedensten Zelltypen differenzieren (Wilt, 2004).

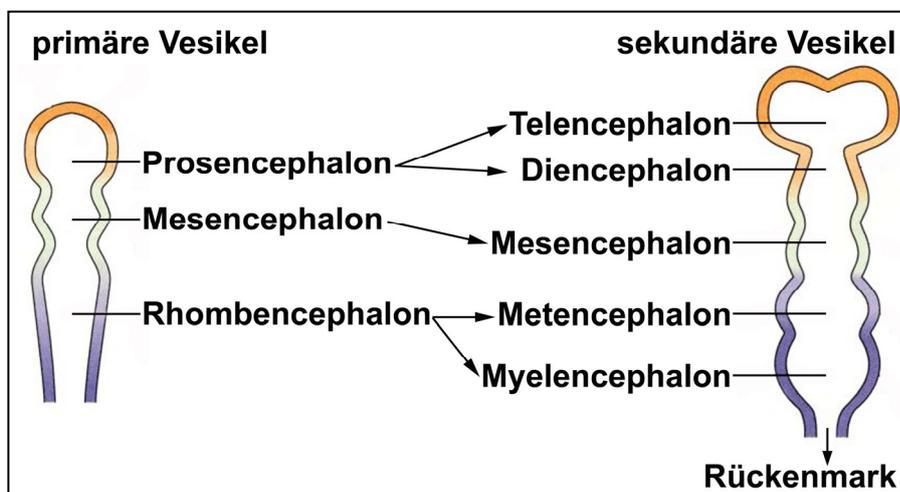


Abb. 6: Schematische Darstellung der Hirnanlage.

Aus der frühen Hirnanlage im rostralen Bereich des Neuralrohres entwickeln sich zunächst die drei primären Vesikel Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon, aus denen wiederum die fünf sekundären Vesikel Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Myelencephalon hervorgehen.

Aus diesen leiten sich wiederum die bereits erwähnten analog benannten adulten Strukturen ab. (Quelle: modifiziert, nach Gilbert, 2000).

Das Neuralrohr selbst ist eine der ersten Vorstufen des Zentralnervensystems, aus der im Verlauf der Entwicklung entlang seiner anterior-posterioren Achse das Gehirn und das Rückenmark hervorgehen. Zunächst geht aber aus einer Verdickung des rostralen Anteils des Neuralrohres die frühe Hirnanlage hervor, die sich dann weiter in die drei primären Vesikel Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon aufspaltet. Daraus gehen wiederum die fünf sekundären Vesikel Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Mye-

lencephalon hervor (Abb. 6) aus denen sich die bereits erwähnten, analog benannten, adulten Strukturen (1.2.1) ableiten. Dazu sei noch angemerkt, dass die beiden letztgenannten Strukturen Metencephalon und Myelencephalon im adulten Organismus auch noch unter dem Begriff Rhombencephalon zusammengefasst werden. Der gesamte caudale Bereich des Neuralrohres dient dagegen allein der Bildung des Rückenmarks (Gilbert, 2000).

Hervorgehend aus der einschichtigen Neuralplatte besteht das Neuralrohr entlang seiner anterior-posterioren Achsen entsprechend zunächst auch nur aus einer einzigen Lage von Zellen. Das ändert sich, nachdem diese teilungsaktiven neuralen Stammzellen in rascher Folge eine Reihe von Zellteilungen durchlaufen haben und mit der Differenzierung beginnende Tochterzellen nach ihrem Austritt aus dem Zellzyklus schließlich in die Peripherie des Neuralrohres auswandern. So entsteht lateral zu der an das Lumen grenzenden ventrikulären Zone (VZ) aus proliferierenden Vorläuferzellen ein als Mantelzone (MZ) bezeichneter Bereich postmitotischer Zellen bzw. differenzierter Neuronen (Gilbert, 2000, Wilt, 2004).

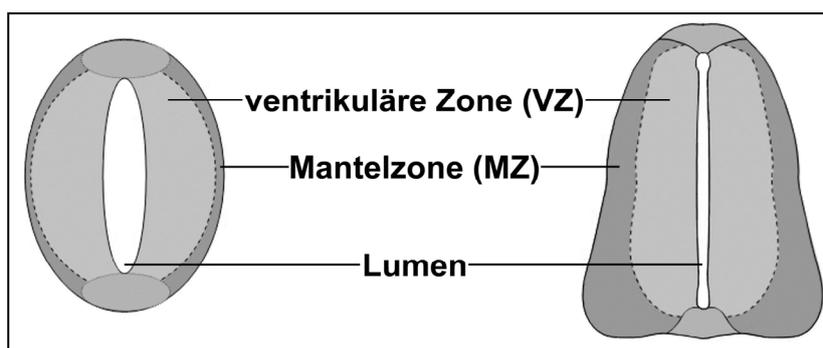


Abb. 7: Schematische Darstellung der Bildung der ventrikulären Zone und der Mantelzone im Neuralrohr.

Nach der Bildung des Neuralrohres durchlaufen die neuralen Stammzellen eine Reihe von Zellteilungen. Die Tochterzellen wandern mit dem Beginn der Differenzierung in die Peripherie des Neuralrohres aus.

So entsteht benachbart zum Lumen des Neuralrohres ein Bereich aus proliferierenden Vorläuferzellen, die ventrikuläre Zone (VZ, hellgrau) und lateral dazu ein Bereich mit postmitotischen Zellen, die Mantelzone (MZ, dunkelgrau), der sich mit fortschreitender Entwicklung weiter ausdehnt.

Diese Anordnung wird später noch mit der Ausbildung und Bündelung von Axonen der Neuronen der MZ um die Marginalzone als lateraler Abschluss des Neuralrohres erweitert. Während bei der Reifung des Gehirns dieser grundsätzlichen Aufbau noch durch weitere Schichten ergänzt wird, bleibt im späteren Rückenmark diese medio-lateral orientierte Anordnung als graue und weiße Substanz erhalten (Gilbert, 2000, Wolpert, 2007). Neben dieser medio-lateralen Einteilung findet aber auch im caudalen Neuralrohr noch eine Entwicklung entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres statt. Für die Aufnahme und Verarbeitung sensorischer Impulse aus der Haut und der Muskulatur entstehen im dorsalen Neuralrohr hauptsächlich sensorische Interneuronen und im ventralen Anteil Motorneuronen und ventrale Interneuronen für die Innervierung der Skelettmuskulatur und Weiterleitung afferenter Impulse (Tanabe *et al.*, 1996).

1.3.1 Dorso-ventrale Musterbildung im Neuralrohr

Mit der Einfaltung der Neuralplatte zum geschlossenen Neuralrohr entstehen entlang dessen dorsaler und ventraler Mittellinie zwei gegenüberliegende Signalzentren (Abb. 8A). Auf der dorsalen Seite wird unter dem Einfluss des epidermalen Ektoderms die sogenannte Dachplatte und ventral durch Signale der Chorda dorsalis die Bodenplatte induziert. Zellen des epidermalen Ektoderms sekretieren u.a. die parakrinen Signalmoleküle der Bmp-Familie (Bone morphogenetic protein), die in den Zellen der Dachplatte die Expression verschiedener Mitglieder der TGF- β (Transforming growth factor)-Superfamilie veranlassen (Lee *et al.*, 1999, Liem *et al.*, 1995, Liem *et al.*, 1997). Im Neuralrohr wird mit diesen Faktoren ein von dorsal nach ventral gerichteter Gradient ausgebildet, durch den in Abhängigkeit von der Konzentration das Schicksal der Vorläuferzellen determiniert wird. Demgegenüber zeichnet sich die Bodenplatte als ventrales Signalzentrum des Neuralrohres durch eine Expression von Shh (Sonic hedgehog) aus, die ihrerseits durch ein aus dem angrenzenden axialen Mesoderm stammendes Shh-Signal induziert wurde (Placzek, 1995, Jessell *et al.*, 1990). Mit der Expression von Shh wird ausgehend von der Bodenplatte ein von ventral nach dorsal gerichteter Morphogengradient etabliert, dessen Konzentrationsgefälle von Vorläuferzellen ebenfalls als positionelle und damit schicksalsbestimmende Information registriert wird.

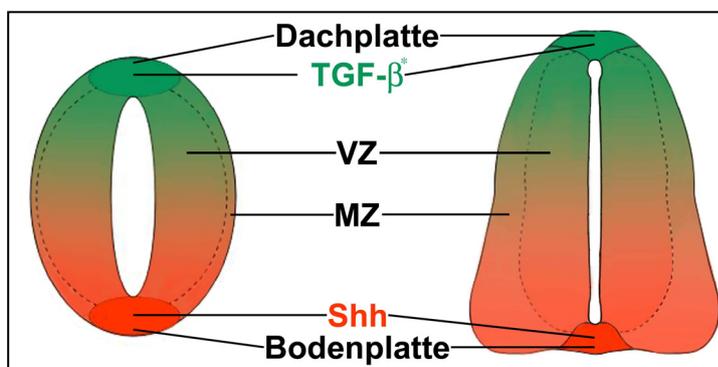


Abb. 8: Schematische Darstellung der Musterbildung im Neuralrohr.

Im Neuralrohr wurde durch äußere Signale die Bildung der beiden sekundären Signalzentren induziert. Das dorsal gelegene Signalzentrum wird als Dachplatte, das ventrale Signalzentrum als Bodenplatte bezeichnet. In der Dachplatte werden Signalmoleküle der TGF- β -*Superfamilie (grün) exprimiert und sezerniert, daraus resultiert ein von der Dachplatte ausgehender, nach

ventral gerichteter Konzentrationsgradient. In der Bodenplatte wird entsprechend das Signalmolekül Shh (rot) exprimiert und sezerniert, so dass hier ein gegenläufiger, nach dorsal gerichteter Konzentrationsgradient etabliert wird. Mit Fortschreiten der Neurogenese und Differenzierung der Vorläuferzellen wird der durch postmitotische Zellen besiedelte Bereich der Mantelzone (MZ) weiter ausgedehnt, während proliferierende Zellen in der ventrikulären Zone (VZ) nahe dem Lumen verbleiben.

Gemessen an der Konzentration definieren die von den beiden Signalzentren Boden- und Dachplatte ausgehenden entgegengesetzten Morphogengradienten also jede Position des Neuralrohres entlang der dorso-ventralen Achse und legen damit den Grundstein für die Musterbildung und Etablierung unterschiedlicher Zellschicksale. Die Vorläuferzellen reagieren auf die Informationen des Gradientenfeldes mit einer ihrer Position angepassten Änderung der

Genexpression, so dass entlang der dorso-ventralen Achse distinkte Populationen von Vorläuferzellen entstehen, die sich zunächst durch ihre unterschiedliche Expression verschiedener basische Helix-Loop-Helix (bHLH)- und Homeodomänen (HD)-Transkriptionsfaktoren gegeneinander abgrenzen und später unterschiedliche Neuronentypen hervorbringen (Roelink *et al.*, 1995, Dodd *et al.*, 1998, Ericson *et al.*, 1997).

1.3.1.1 Musterbildung im ventralen Neuralrohr

In der ventralen Hälfte des Neuralrohres ist der Konzentrationsgradient des morphogenen Faktors Shh für die Musterbildung unter den Vorläuferzellen und damit auch der Spezifizierung ventral entstehenden Neuronen von essentieller Bedeutung. Als erste relevante Shh exprimierende Quelle und damit als primäres Signalzentrum gilt die Chorda dorsalis, durch die wiederum die Expression von Shh in der Bodenplatte, dem in der ventralen Mittellinie des Neuralrohres gelegenen, sekundären Signalzentrum, induziert wird (Echelard *et al.*, 1993, Roelink *et al.*, 1994, Placzek *et al.*, 1990). Von hier aus wird in dorsaler Orientierung der Konzentrationsgradient des Morphogens aufgebaut, der im Weiteren Einfluss auf die Genaktivität der ihm ausgesetzten Vorläuferzellen nimmt. Die Ausdehnung von Shh wird in unterschiedlicher Weise durch die Aktivität verschiedener Gli-Proteine, Homologe des Faktors Ci (Cubitus interruptus) aus *Drosophila*, modifiziert und vermittelt. Gli1 fungiert z.B. als Mediator der Wirkung von Shh während Gli3 antagonisierend Einfluss nimmt (Park *et al.*, 2000, Perrson *et al.*, 2002, Altaba, 1998, Litingtung *et al.*, 2000). Letztendlich modulieren die Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des Shh-Signals die Expression so genannter Shh-abhängiger Transkriptionsfaktoren, die in zwei Klassen unterteilt werden. Die Genexpression der zur Klasse I zählenden Faktoren wird ab bestimmten Shh-Konzentrationen inhibiert, die Expression der Klasse II-Gene stattdessen aktiviert, bis entsprechende Schwellenwerte unterschritten werden (Lee *et al.*, 2001, Stone *et al.*, 2000, Pierani *et al.*, 1999, Briscoe *et al.*, 2000). Im Weiteren inhibieren wechselseitig einzelne Faktoren der einen die Expression der Faktoren der anderen Klasse, so dass letztendlich geordnete Zellpopulationen entstehen, die sich durch ihre unterschiedliche Expression von Faktoren der Klasse I und II strikt voneinander abgrenzen (Briscoe *et al.*, 2000). Der Klasse I konnten bisher die Faktoren Pax6, Pax7, Dbx1, Dbx2 und Irx3 zugeordnet werden, der Klasse II dagegen Nkx2.2, Nkx6.1, Nkx6.2 sowie Olig2 und eine wechselseitige Inhibierung gilt bisher für die Paarungen Pax6/Nkx2.2, Dbx2/Nkx6.1, Dbx1/Nkx6.2 sowie Irx3/Olig2 als erwiesen (Novitch *et al.*, 2001, Briscoe *et al.*, 2000). Bei den genannten Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Homeodomänen-

Faktoren, mit Ausnahme von Olig2, dessen DNA-bindende Domäne aus einem basischen Helix-Loop-Helix-Motiv besteht (Zhou *et al.*, 2000). Durch die spezifische kombinatorische Expression verschiedener Klasse I und Klasse II Transkriptionsfaktoren wird also die Etablierung einzelner Domänen ventraler Vorläuferzellen realisiert und in der ventrikulären Zone des Neuralrohres können so, von ventral nach dorsal beschrieben, die Populationen pV3, pMN, pV2, pV1 und pV0 unterschieden werden. Nach dem Depressions-Modell der Zelltypspezifizierung wird das Schicksal der Vorläuferzellen dadurch bestimmt, dass die jeweilige charakteristische Kombination der exprimierten Transkriptionsfaktoren nur die Verwirklichung eines bestimmten neuronalen Programms zulässt und alle anderen unterdrückt (Briscoe *et al.*, 2000).

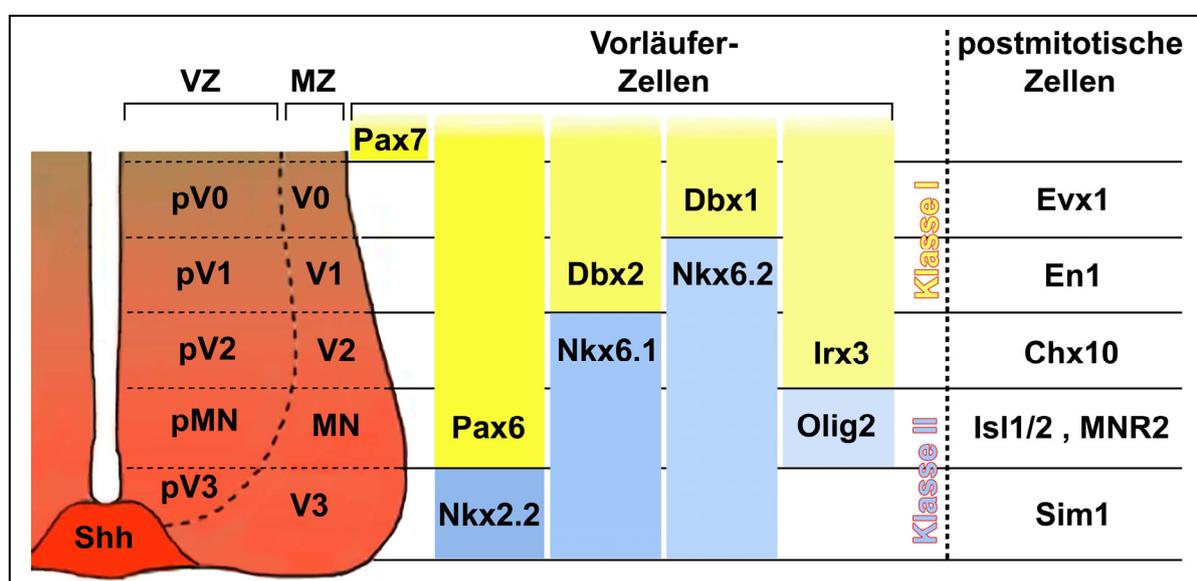


Abb. 9: Schematische Darstellung der Musterbildung im ventralen Neuralrohr.

Die Abbildung zeigt einen schematischen Ausschnitt der ventralen Hälfte des Neuralrohres (links) und das typische Muster von Vorläuferzellen (mittig) und postmitotischen Zellen (rechts) exprimierter Transkriptionsfaktoren. (links) In der Bodenplatte wird das Signalmolekül Shh exprimiert. In der ventrikulären Zone (VZ) des Neuralrohres werden die verschiedenen Vorläuferpopulationen pV0, pV1, pV2, pMN und pV3 etabliert. Zellen dieser Populationen wandern mit ihrer Differenzierung in die Mantelzone (MZ) des Neuralrohres aus und bilden hier die unterschiedlichen Neuronenpopulationen V0, V1, V2, MN und V3. (mittig) Das Schema zeigt welche HD- bzw. bHLH-Transkriptionsfaktoren von den Vorläuferzellen der einzelnen Populationen der VZ exprimiert werden. Die Expression von Faktoren der Klasse I wird durch das Shh-Signal aus der Bodenplatte inhibiert, diejenige der Faktoren der Klasse II dagegen aktiviert. (rechts) Dieser Teil des Schemas zeigt welche typischen Marker von den postmitotischen Zellen der verschiedenen Populationen der MZ exprimiert werden.

Im Weiteren führen eben diese spezifischen Expressionsmuster unmittelbar zur Differenzierung der Vorläuferzellen zu definierten Neuronentypen. Während der Differenzierung ändern die postmitotischen Zellen erneut ihr Genexpressionsmuster und wandern von der ventrikulären in die Mantelzone, wo sie als unterschiedliche neuronale Subtypen nun anhand der Expression anderer charakteristischer Transkriptionsfaktoren identifiziert werden können. Ent-

sprechend ihrer Herkunft und späteren Funktionalität werden diese Neuronenpopulationen als Motorneuronen (MN) und ventrale Interneuronen des Typs V3, V2, V1 und V0 bezeichnet. Repräsentativ für die Population der ventralen Interneuronen V3 ist die Expression von *Sim1* und für Motorneuronen die von *Is1/2* (Islet) und *MNR2*, V2-Neuronen exprimieren *Chx10* (Chox), V1-Neuronen *En1* (Engrailed) und die ventralen Interneuronen V0 schließlich *Evx1* (Even-skipped homologue) (Moran-Rivard *et al.*, 2001; Briscoe *et al.*, 2000; Tanabe *et al.*, 1998; Matise *et al.*, 1997; Ericson *et al.*, 1992; Bastian *et al.*, 1990).

1.3.1.2 Musterbildung im dorsalen Neuralrohr

Im dorsalen Bereich des Neuralrohres ist ebenfalls ein Konzentrationsgradient parakriner Signalmoleküle, hier allerdings der TGF- β Superfamilie, für die Musterbildung der Vorläuferzellen und der späteren Subtypspezifizierung von grundlegender Bedeutung. Als primäres Signalzentrum sekretieren zunächst nicht-neurale Zellen des epidermalen Ektoderms die morphogenen Faktoren Bmp4 und Bmp7 (Liem *et al.*, 1997). Dadurch wird die Expression verschiedener Mitglieder der TGF- β Superfamilie in der Dachplatte, dem entsprechend in der dorsalen Mittellinie des Neuralrohres gelegenen, sekundären Signalzentrum induziert. Der nach ventral verlaufende Konzentrationsgradient der sezernierten Morphogene bewirkt, dass die betroffenen Vorläuferzellen im dorsalen Neuralrohr distinkte Populationen bilden, die sich zunächst durch die Expression verschiedener proneuraler bHLH- bzw. HD-Transkriptionsfaktoren voneinander unterscheiden. Dabei wird die Etablierung scharfer Populationsgrenzen auch hier dadurch erreicht, dass die Transkriptionsfaktoren zum Teil wechselseitig ihre Expression inhibieren. Im Weiteren führt die Aktivität der spezifisch exprimierten proneuralen Faktoren dazu, dass die Vorläuferzellen der einzelnen Domänen zu bestimmten neuronalen Subtypen differenzieren. So werden in der ventrikulären Zone zunächst sechs verschiedene Vorläuferpopulationen etabliert, von dorsal nach ventral als dP1-dP6 bezeichnet, aus denen im Verlauf der Neurogenese die, analog ihrer Herkunft benannten, dorsalen Interneuronen dI1-dI6 hervorgehen. Charakteristisch für die, an die Dachplatte grenzende, dorsalste Vorläuferpopulation dP1 und gleichzeitig notwendig für die Bildung der dI1-Interneuronen, ist die Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors *Math1* in der Maus und *Cath1* im Huhn, beides Homologe des proneuralen Gens *atonal* in *Drosophila melanogaster* (Nakada *et al.*, 2004, Gowan *et al.*, 2001, Bermingham *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 1998, Helms *et al.*, 1998, Akazawa *et al.*, 1995). Die Zellen der ventral angrenzenden Vorläuferdomäne dP2 zeichnen sich durch die Expression der bHLH-Faktoren Ngn1 und Ngn2 (Neurogenin) und ihrer späteren Diffe-

renzierung zu dI2-Neuronen aus (Gowan *et al.*, 2001, Ma *et al.*, 1996, Perez *et al.*, 1999). Die Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors *Mash1* in der Maus und *Cash1* im Huhn, beides Homologe des proneuralen Gens *achaete-scute* in *Drosophila melanogaster* (Johnson *et al.*, 1990, Jasoni *et al.*, 1994), ist kennzeichnend für Vorläuferzellen der Populationen dP3, dP4 und dP5, aus denen die verschiedenen Interneuronen dI3, dI4 und dI5 hervorgehen (Lo *et al.*, 1991, Ma *et al.*, 1997). Der Abschluss der Vorläuferdomänen im dorsalen Neuralrohr wird von der dP6 Population gebildet, deren Zellen den HD-Faktor *Dbx2* exprimieren und zu dI6-Interneuronen differenzieren (Periani *et al.*, 1999). Nach der Differenzierung lassen sich die postmitotischen Neuronen wiederum durch die spezifische Expression unterschiedlicher HD-Transkriptionsfaktoren voneinander unterscheiden. Im dorsalen Neuralrohr wird *Lh2a/b* ausschließlich in dI1 und *Isl1/2* (Islet) nur in dI3-Interneuronen exprimiert. dI2-Neuronen exprimieren u.a. *Lim1/2* aber nicht *Pax2*, wodurch sie sich von dI4 und dI6-Neuronen abheben, die neben *Lim1/2* auch *Pax2* exprimieren. Die Expression von *Lmx1b* ist dagegen charakteristisch für dI5-Interneuronen.

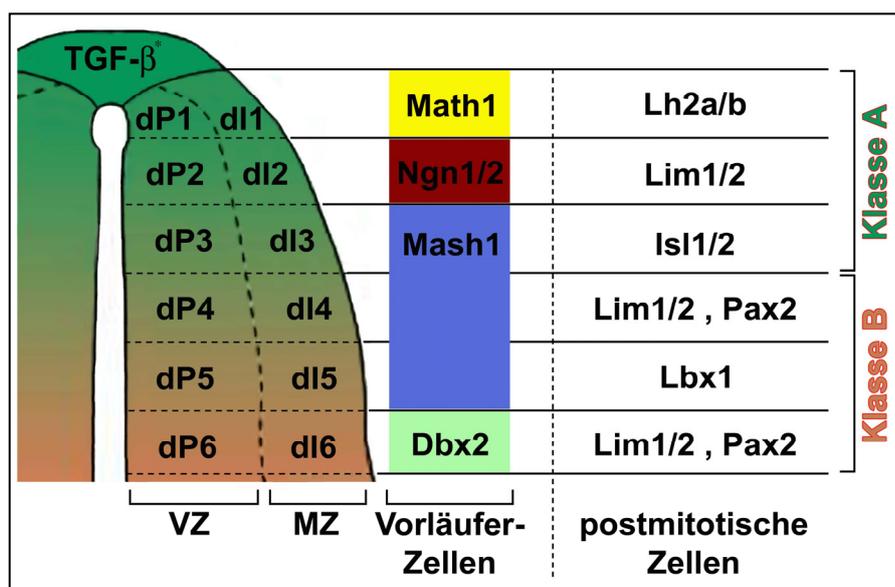


Abb. 10: Schematische Darstellung der Musterbildung im dorsalen Neuralrohr.

Die Abbildung zeigt einen schematischen Ausschnitt der dorsalen Hälfte des Neuralrohres (links) und das typische Muster von Vorläuferzellen (mittig) und postmitotischen Zellen (rechts) exprimierter Transkriptionsfaktoren. (links) In der Dachplatte werden Signalmoleküle der TGF-β-Superfamilie exprimiert. In der ventrikulären Zone (VZ) des Neuralrohres werden die verschiedenen Vorläuferpopulationen dP1, dP2, dP3, dP4, dP5 und dP6 etabliert. Zellen dieser Populationen wandern mit ihrer Differenzierung in die Mantelzone (MZ) des Neuralrohres aus und bilden hier die unterschiedlichen Neuronenpopulationen dI1, dI2, dI3, dI4, dI5 und dI6. (mittig) Das Schema zeigt welche bHLH- bzw. HD-Transkriptionsfaktoren von den Vorläuferzellen der einzelnen Populationen der VZ exprimiert werden. (rechts) Dieser Teil des Schemas zeigt welche typischen Marker von den postmitotischen Zellen der verschiedenen Populationen der MZ exprimiert werden. Postmitotische Zellen der Populationen dI1, dI2 und dI3 werden außerdem der Klasse A zugeordnet, deren Bildung von den Signalmolekülen der Dachplatte abhängig ist. Der Klasse B werden die Interneuronen der Populationen dI4, dI5 und dI6 zugeordnet, deren Etablierung unabhängig von der Signaltransduktion aus der Dachplatte ist.

Die Differenzierung der Vorläuferzellen und die Bildung unterschiedlicher neuronaler Subtypen im dorsalen Neuralrohr ist zwar wie bereits erwähnt von der Aktivität der proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren abhängig, bedarf aber, wie Experimente belegen darüber hinaus noch der Beteiligung weiterer gegenwärtig zumeist noch unbekannter Faktoren. So wird z.B. *Mash1* gleichsam in den Vorläuferpopulationen dI3, dI4 und dI5 exprimiert, diese durchlaufen aber unterschiedliche Subtypspezifizierungen. Der Verlust von *Mash1* führt zwar gänzlich zum Verlust von dI5-Interneuronen, die Anzahl der dI3-Interneuronen wird aber lediglich reduziert und die der dI4-Neuronen sogar vergrößert (Helms *et al.*, 2005, Kriks *et al.*, 2005). Damit kann *Mash1* nicht der einzige steuernde Faktor für die Bildung dieser Interneuronenpopulationen sein. Neuere Studien belegen die Beteiligung von *Olig3* (Müller *et al.*, 2005) und *Gsh2* (Kriks *et al.*, 2005), eines weiteren bHLH- und eines HD-Transkriptionsfaktors bei der Spezifizierung der *Mash1* exprimierenden dP3-Vorläuferzellen zu dI3-Interneuronen, während andere für die Bildung von dI4- und dI5-Interneuronen relevante Faktoren erst noch identifiziert werden müssen. Dagegen ist die Spezifizierung der dP1-Vorläuferzellen zu dI1-Interneuronen direkt auf die Expression von *Math1* zurückzuführen. Entsprechend ist mit der Reduktion der *Math1*-Expression auch der Verlust von dI1-Interneuronen verbunden und wie Überexpressionsstudien zeigen, resultiert aus der ektopischen Expression von *Math1* entsprechend eine vermehrte Anzahl *Lh2a/b⁺* dI1-Neuronen (Bermingham *et al.*, 2001, Helms *et al.*, 1998, Gowan *et al.*, 2001). Jedoch haben die Überexpressionsanalysen mit *Math1* auch gezeigt, dass die Bildung zusätzlicher dI1-Interneuronen auf dorsale Bereiche des Neuralrohres beschränkt bleibt, woraus gefolgert werden kann, dass auch hier an der Subtypspezifizierung zusätzliche, momentan noch unbekannte Faktoren beteiligt sind (Gowan *et al.*, 2001, Nakada *et al.*, 2004).

Von der Dachplatte werden einige, für die Musterbildung im dorsalen Neuralrohr relevante Faktoren sezerniert, darunter mehrere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie. Im Hühnerembryo z.B. sind es *ActivinB*, *Wnt1*, *Wnt3a* sowie *Wnt5a* und als Mitglieder der *Bmp*-Familie die Faktoren *Bmp4*, *Bmp5*, *Bmp7*, *Gdf7* (Growth and differentiation factor) und *Dorsalin1*, die als Signalmoleküle der Dachplatte nach ihrer Expression sezerniert werden (Hollyday *et al.*, 1995, Liem *et al.*, 1995, Liem *et al.*, 1997, Basler *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1998). Ähnlich dazu exprimieren die Zellen der Dachplatte eines Mausembryos *Bmp6*, *Bmp7* und *Gdf7* sowie *Wnt1* und *Wnt3a* (Lee *et al.*, 1998, Arkell *et al.*, 1997, Ikeya *et al.*, 1997, Jones *et al.*, 1991). Diese sezernierten Morphogene bilden wie schon beschrieben einen nach ventral abnehmenden Konzentrationsgradienten und können in konzentrationsabhängiger Weise die Expression der verschiedenen bHLH-Transkriptionsfaktoren in den Vorläuferzellen induzieren. Die wie-

derum aus den Vorläuferpopulationen hervorgehenden dorsalen Interneuronen werden in Bezug auf die Signale der Dachplatte in zwei Klassen, A und B, unterteilt. Der Klasse B werden die weiter ventral gelegenen Interneuronen dI4-dI6 zugeordnet, deren Etablierung nicht der von der Dachplatte ausgehenden Signaltransduktion sondern alternativen Quellen, wie z.B. dem HD-Faktor *Lbx1* (Müller *et al.*, 2002) zugeschrieben wird. Zur Klasse A gehören dagegen die Interneuronen dI1-dI3, ihre Bildung ist abhängig von den Signalen aus der Dachplatte und deren Einfluss auf das Expressionsmuster der Vorläuferzellen (Müller *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2000). Die hohe Konzentration der Bmp-Faktoren nahe der Dachplatte ist notwendig zur Aktivierung von *Math1* und damit zur Bildung der dP1-Population und dI1-Interneuronen (Lee *et al.*, 1998). Niedrigere Bmp-Konzentrationen weiter ventral ermöglichen die Expression von *Ngn1* und *Ngn2* (Ma *et al.*, 1996, Sommer *et al.*, 1996) und erst ab einer geringen Konzentration wird *Mash1* in den Vorläuferzellen exprimiert (Timmer *et al.*, 2002). Eine Schärfung der Populationsgrenzen wird nachfolgend durch die wechselseitige Inhibierung der benachbart exprimierten bHLH-Transkriptionsfaktoren erzielt (Gowan *et al.*, 2001, Parras *et al.*, 2002). Der Verlust der Dachplatte (Millonig *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2000, Chizhikov *et al.*, 2004) oder auch die Inhibierung der Bmp-Signaltransduktion (Chesnutt *et al.*, 2004, Wine-Lee *et al.*, 2004) führen folglich sowohl zur Reduktion der *Math1*-, *Ngn1*- und *Mash1*-Expression in den Vorläuferzellen als auch zum Verlust der Klasse A-Interneuronen. Eine Steigerung und die ektopische Aktivierung der Bmp-Signaltransduktion resultieren entsprechend konzentrationsabhängig z.B. in einer Ausweitung der dP1- und dI1-Population oder vermehrten Bildung von dI3-Interneuronen (Timmer *et al.*, 2002, Chizhikov *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004).

Zielgene der Bmp-Signaltransduktion und somit relevante Faktoren zur Vermittlung des Bmp-Signals sind auch einige Mitglieder der für HD-Transkriptionsfaktoren kodierenden *Msx*-Genfamilie (Liem *et al.*, 1995, Furuta *et al.*, 1997, Timmer *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004). Entsprechend korreliert die Expressionsdomäne der Faktoren *Msx1-3* im dorsalen Neuralrohr der Maus (Hill *et al.*, 1989, Robert *et al.*, 1989, Davidson, 1995, Shimeld *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1996) auch mit dem Wirkungsbereich der Bmp-Signale und variiert parallel dazu, wenn die Bmp-Signaltransduktion experimentell ausgedehnt oder inhibiert wird (Timmer *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004). Erwähnenswert ist außerdem, dass Studien den *Msx*-Faktoren eine differenzierungsinhibierende Funktion zuordnen (Hu *et al.*, 2001). Auch die Expression der sekretierten Faktoren *Wnt1* und *Wnt3a* in der Dachplatte wird durch Bmp-Signale reguliert (Liem *et al.*, 1995, Marcelle *et al.*, 1997, Panchision *et al.*, 2001). Die Wnt-Signale beeinflussen ihrerseits u.a. die Expression des bHLH-Faktors *Olig3* in den Vorläuferdomänen der

Klasse A-Interneuronen (Müller *et al.*, 2005, Zechner *et al.*, 2007). Der Verlust von Olig3 führt zu einer Reduktion der dI1-Neuronen und anstelle der Populationen dI2 und dI3 werden ektopisch Neuronen der Klasse B gebildet (Müller *et al.*, 2005). Im Einklang dazu wird durch die ektopische Aktivierung der Wnt-Signalkaskade die Expressionsdomäne von Olig3 massiv erweitert und führt zu einer vermehrten Bildung von dI2- und dI3-Interneuronen (Zechner *et al.*, 2007). Neben dieser Rolle bei der Musterbildung nehmen die Wnt-Faktoren aber vor allem als Mitogene Einfluss auf die Populationsgrößen neuronaler Vorläuferzellen im dorsalen Neuralrohr, indem sie den proliferativen Status neuronaler Vorläuferzellen zur Gewährleistung ausreichender Populationsgrößen aufrecht erhalten (Dickinson *et al.*, 1994, Megason *et al.*, 2002). In *Wnt1^{-/-};3a^{-/-}*-Verlustmutanten bleiben sowohl die Bmp-Signaltransduktion der Dachplatte als auch die Expression der bHLH-Transkriptionsfaktoren bestehen, die Anzahl der Vorläuferzellen ist ohne das Proliferationssignal aber drastisch reduziert (Muroyama *et al.*, 2002, Ikeya *et al.*, 1997). Die ektopische Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion führt dagegen wie die Überexpression von Wnt1 zu einer deutlichen Zunahme der Vorläuferzellen (Dickinson *et al.*, 1994, Chesnutt *et al.*, 2004, Zechner *et al.*, 2003).

Weitere Faktoren, die das Wechselspiel von Proliferation und Differenzierung entscheidend mitbestimmen, sind der membrangebundene Ligand Delta1 und der Rezeptor Notch, durch die auch im Neuralrohr der Mechanismus der lateralen Inhibition vermittelt wird. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor benachbarter Zellen wird in den rezeptortragenden Zellen eine Signalkaskade aktiviert, die zunächst die Expression proneuraler Faktoren und damit auch die Differenzierung inhibiert (de la Pompa *et al.*, 1997). So ist es immer nur einem Teil der Zellpopulation möglich zu differenzieren und aus der ventrikulären Zone in die Mantelzone zu migrieren. Durch die laterale Inhibition wird erreicht, dass während der Neurogenese beständig Populationen proneuraler Vorläuferzellen erhalten bleiben (Henrique *et al.*, 1995, Ma *et al.*, 1996). Wichtige Faktoren, durch die der differenzierungsinhibierende Effekt der Notch-Delta-Signalkaskade vermittelt wird, sind Mitglieder der Hes-Familie. Als Transkriptionsfaktoren inhibieren sie zum einen die Expression proneuraler Gene, treten darüber hinaus aber auch mit den proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren in eine direkte physikalische Wechselwirkung und verhindern so die Expression differenzierungsrelevanter Zielgene (Chen *et al.*, 1997, Davis *et al.*, 2001, Alifragis *et al.*, 1997, Sasai *et al.*, 1992). Ein ähnlicher Mechanismus zur Verzögerung der Differenzierung von Vorläuferzellen wird auch noch parallel zur lateralen Inhibition praktiziert. Schlüsselfaktoren in diesem Prozess sind Mitglieder der Id-Proteinfamilie (Martinsen *et al.*, 1998). Sie bilden zeitweise mit bHLH-Transkriptionsfaktoren nicht funktionale Heterodimere und konkurrieren gleichzeitig mit den proneuralen

Proteinen um essentielle Kofaktoren (Jen *et al.*, 1997, Norton, 2000). Auch die Mitglieder der HMG (*high mobility group*)-Box-Familie Sox1-3 (Kamachi *et al.*, 2000) beeinflussen die Effektivität der proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren, die Differenzierung von Vorläuferzellen auszulösen. Die Kompetenz der bHLH-Faktoren, neuronale Differenzierung im dorsalen Neuralrohr zu induzieren scheint mit der Fähigkeit verknüpft zu sein, die Expression dieser Sox-Gene zu reprimieren (Bylund *et al.*, 2003, Graham *et al.*, 2003). Ein wichtiger Faktor, durch den dagegen die differenzierende Wirkung der bHLH-Transkriptionsfaktoren umgesetzt wird, ist p27^{Kip1} (p27) (Farah *et al.*, 2000). p27 ist ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (CdK) und seine Expression wird durch die proneuralen bHLH-Faktoren induziert. Die Aktivierung von p27 führt in den Vorläuferpopulationen zur Inhibierung zellzyklusrelevanter CdK und folglich zum Abbruch der Proliferation. Darüber hinaus hat p27 auch noch weitere Funktionen bei der Wanderung von Neuronen aus der ventrikulären Zone (Polyak *et al.*, 1994, Helms *et al.*, 1998).

Die Musterbildung im dorsalen Neuralrohr stellt einen Ausschnitt der präzise koordinierten Prozesse während der Entwicklung des Zentralnervensystems dar und zeigt auf, dass zahlreiche Faktoren für die Etablierung der vielzähligen verschiedenen Neuronentypen, in genauer Anzahl, zur rechten Zeit und an passender Stelle in ein komplexes Wechselspiel treten. Auch wenn schon einige der beteiligten Faktoren identifiziert und ihre Funktionen beschrieben werden konnten, sind doch noch nicht alle Abläufe verstanden und die Hinweise zahlreich, dass weitere, noch unbekannte Faktoren einbezogen werden müssen.

1.4 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Cst

Das Gen *castor* wurde erstmalig in *Drosophila melanogaster* beschrieben und kodiert hier für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit einer Länge von 792 Aminosäuren (Mellerick *et al.*, 1992, Cui *et al.*, 1992). Die DNA-bindende Domäne ist zentral positioniert und besteht aus insgesamt acht Cys-Cys, His-His (C₂-H₂)-Motiven (Cui *et al.*, 1992, Mellerick *et al.*, 1992) Aus der Aminosäuresequenz kann abgeleitet werden, dass jedes zweite dieser C₂-H₂-Motive charakteristisch ist für Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren der Klasse TFIIIA. Im Castor-Protein bilden jeweils zwei der C₂-H₂-Motive eine typische Einheit (C₂-H₂C₂-H₂), die im Folgenden als Cst-Motiv bezeichnet wird. Die zentrale Zinkfinger-Domäne von Castor besteht demnach aus vier Cst-Motiven, die jeweils durch 19 Aminosäuren voneinander getrennt sind (Cui *et al.*, 1992, Mellerick *et al.*, 1992). In *Drosophila* ist Castor während der Neuroge-

nese in Prozesse der Musterbildung des Zentralnervensystems involviert und ist hierbei einer von mehreren Faktoren, deren sequenzielle Expression in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen die Identität der nachfolgenden Neuronen determiniert (Kambadur *et al.*, 1998, Brody *et al.*, 2000, Isshiki *et al.*, 2001). Castor ist an der Regulation aller in *Drosophila* bekannten POU-Homöobox-Gene beteiligt und aktiviert so zum einen die Expression von *drf* (drifter) und *I-POU*, inhibiert aber sowohl *pdm-1* als auch *pdm-2* (Kambadur *et al.*, 1998). Entsprechend führt der Verlust von Castor zu einer ektopischen Expression von *pdm-1* und *pdm-2* und einem Fehlen der Expression von *drf* und *I-POU*, mit der Folge, dass sich das neuronale Netzwerk des Zentralnervensystems von *Drosophila* nur in reduzierter Form entwickeln kann (Kambadur *et al.*, 1998).

Da viele molekulare Mechanismen der Embryogenese evolutionär konserviert sind, war die Beteiligung von Castor bei der Musterbildung des Zentralnervensystems von *Drosophila* während der Neurogenese Anlass für die Suche nach homologen Genen in Vertebraten mit eventuell ebenso entwicklungsrelevantem Potential. Im Labor von Dr. Thomas Theil wurde ein einzelnes, dem aus *Drosophila* bekannten *castor* verwandtes Gen *Cst* der Maus identifiziert (Hurtado *et al.*, 2002). Im weiteren wurden durch mit Abschnitten der Castor-Sequenz durchgeführte Datenbankanalysen EST (*expressed sequence tag*)-Klone der Maus, des Huhns und des Menschen ermittelt, deren prognostizierte Proteinsequenz zueinander und im Bereich der Zinkfinger-Domänen weitreichende Homologien zum Castor-Protein aus *Drosophila* aufzeigten. Teile der für die Zinkfinger-Domäne kodierenden Sequenzen der EST-Klone wurden verwendet, um durch *whole mount in situ* Hybridisierungen das Expressionsmuster von *Cst* während der Embryonalentwicklung der Maus (Hurtado *et al.*, 2002, le Viseur, 2002) und später auch des Huhns (le Viseur, 2002) zu untersuchen. Diese Analysen zeigten, dass *Cst* im Verlauf der Embryogenese in mehreren verschiedenen Gewebe und Organe exprimiert wird, so z.B. in der Herzanlage, der nasalen Plakode und im Auge, sowie in den frühen Hinterwurzel- und kranialen Ganglien des peripheren Nervensystems. Darüber hinaus wurde die Expression von *Cst* aber auch in mehreren Regionen des Rhombencephalons, im dorso-medialen Telencephalon sowie im Neuralrohr, also in Komponenten des Zentralnervensystems nachgewiesen (Hurtado *et al.*, 2002). Um die Expressionsdomäne im Neuralrohr exakter zu bestimmen, wurde in weiteren Untersuchungen die *Cst*-Expression mit der Expression verschiedener Markergene für Vorläufer- und Neuronenpopulationen nach *whole mount in situ* Hybridisierungen verglichen (le Viseur, 2002). So wurde ermittelt, dass *Cst* sowohl in Mäuse- als auch in Hühnchenembryonen nur begrenzt, in Zellen der Vorläuferpopulationen dP1 und dP2 exprimiert wird (le Viseur, 2002). Der Mittelpunkt anschließender Analysen war es, erste Er-

kenntnisse über die Funktion des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Cst* in Vertebraten zu gewinnen. Dazu wurde die Sequenz mit dem größtmöglichen Leserahmen der vorhandenen *Cst*-cDNA der Maus (RIKEN-EST BB026049) ausgewählt und nach der Klonierung in einen Expressionsvektor durch *in ovo* Elektroporation ektopisch im Neuralrohr von Hühnchenembryonen exprimiert (le Viseur, 2002). Im Unterschied zum *castor*-Gen in *Drosophila* kodiert die ausgesuchte Sequenz des *Cst*-Gens der Maus für ein Protein mit einer Länge von 986 Aminosäuren. Es beinhaltet insgesamt fast fünf der typischen *Cst*-Motive, von denen ebenfalls vier in einer zentralen Zinkfinger-Domäne angeordnet sind. Das fünfte Motiv besteht aus einem C-H₂C₂-H₂-Element und liegt im Abstand von etwa 100 Aminosäuren zum zentralen Zinkfinger-Block in der Nähe des C-terminalen Endes des Proteins. Die Ergebnisse dieser ersten, im begrenzten Rahmen durchgeführten Überexpressionsstudien untermauerten zwar nicht die Theorie, dass *Cst* auch in Vertebraten die Ausbildung neuronaler Subtypen beeinflusst, zeigten aber, dass die ektopische Expression von *Cst* neuronale Vorläuferzellen zur Differenzierung veranlasst (le Viseur, 2002).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Prozesse der Musterbildung entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres sind bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig entschlüsselt, auch wenn schon einige der beteiligten Faktoren identifiziert und ihre Funktion bestimmt werden konnten. Erste Untersuchungen des ebenfalls im Neuralrohr exprimierten Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Cst* deuten darauf hin, dass ein neuer Faktor gefunden wurde, der potentiell ein Teil des Netzwerkes sein könnte und dessen Funktion zur Etablierung der verschiedenen Neuronentypen im Neuralrohr beiträgt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Funktion von *Cst* im Neuralrohr näher zu charakterisieren und in den Kontext der Musterbildungsprozesse einzuordnen. Dafür sollte zunächst das bisher nur nach *whole mount in situ* Hybridisierungen betrachtete *Cst*-Expressionsmuster exakter analysiert und mit der Expression verschiedener Marker-gene verglichen werden. Nach dieser Eingrenzung des Wirkungsbereiches innerhalb des Neuralrohres, sollte die Funktion von *Cst* anhand weiterführender Überexpressionsstudien durch *in ovo* Elektroporation in das Neuralrohr von Hühnerembryonen untersucht werden. Da die Veröffentlichung weiterer *Cst*-cDNA tragender EST-Klone eine tieferführende Sequenzanalyse erlaubte, konnte festgestellt werden, dass es mehrere alternative Splice-Produkte für *Cst* geben könnte und dass der in der Arbeit von le Viseur eingesetzte EST-Klon im 5'-Bereich ein Stopp-Kodon aufweist, das weder durch die anderen Sequenzen noch durch den Vergleich

mit der genomischer Sequenz bestätigt werden kann. Aufgrund der neueren Erkenntnisse über die *Cst*-Sequenz sollte für die Überexpressionsanalysen eine Sequenz mit einem endogen verifizierbaren, alternativen 5'-Bereich gefunden und verwendet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Standard-Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Allgemeines

Die für diese Arbeit verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Applichem GmbH, J.T. Baker, Boehringer Mannheim, Difco Laboratories, Fluka, Gibco BRL, Merck, Riedel de Haen, Roche Molecular Biochemicals, New England Biolabs, Roth GmbH und Sigma bezogen. Lösungen wurden mit Wasser aus einer haus-eigenen Millipore-MilliQ-Anlage angesetzt und soweit erforderlich wie Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien auch durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 30 min, durch Filtration oder durch Inkubation in trockener Hitze bei 180°C für 30 min sterilisiert. Die eingesetzten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind, sofern bei den einzelnen Methoden nicht besonders erwähnt, die in einem molekularbiologisch arbeitenden Labor im Allgemeinen verwendeten. Spezielle, im Folgenden nicht aufgeführte Lösungen und Chemikalien werden bei den einzelnen Methoden entsprechend ihrer Verwendung erwähnt.

2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

DEPC-dH₂O	H ₂ O 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonate (DEPC) ün inkubiert, autoklaviert
dH₂O	Wasser aus der Millipore-Anlage; autoklaviert
4% PFA	4% (w/v) Paraformaldehyd PBS
LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt in dH ₂ O autoklaviert
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 ; autoklaviert

PBT	0,1% (v/v) Tween 20 PBS
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,9 1 mM EDTA

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Eier

Befruchtete Hühnereier wurden von der Firma Deindl GmbH & Co KG, Rietberg-Varensell bezogen und bis zu ihrer Verwendung, jedoch höchstens eine Woche bei 12°C gelagert. Die Inkubation erfolgte bei 38°C in einem Heraeus T20 Trockenschrank, in Gegenwart offener, wassergefüllter Gefäße, zur Etablierung einer Luftfeuchtigkeit von etwa 50%. Die Eier wurden waagrecht ausgerichtet und die Position des Embryos auf der Schale markiert

2.2.2 Mäuse

Die Maushaltung und -zucht erfolgte in der Tierversuchsanlage der medizinischen Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die in dieser Arbeit verwendeten Mausembryonen mit wildtypischem Genotyp gehören zum Stamm NMRI.

2.2.3 Bakterien

Von Stefanie Kuschel wurden freundlicherweise kompetente *Escherichia coli*-Zellen (JM109; *recA1*; *lacZ*ΔM15) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung dieser kompetenten Zellen wurde das Protokoll nach Inoue *et al.* (1990) angewandt. Die Bakterien wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4 DNA-Techniken

2.2.5 Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von Roche oder NEB bezogen und zusammen mit den empfohlenen Puffern nach den Angaben der Hersteller eingesetzt. In einem Standard-Restriktionsansatz mit 20 µl Gesamtvolumen wurden maximal 10 µg DNA durch 1 - 10 U Enzym in 1x Enzympuffer gespalten. Zur Spaltung größerer DNA-Mengen wurde das Gesamtvolumen und die Enzymmenge entsprechend erhöht. Wenn nicht anders erwähnt, wurde der Restriktionsansatz für 2 h bei 37°C oder einer anderen, durch den Hersteller des Enzyms angegebenen Temperatur inkubiert. Entsprechend ihrer weiteren Verwendung wurde die gespaltene DNA entweder gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.8) oder durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.13) aufgereinigt. Die sequenzspezifische Spaltung von DNA dient z.B. der Herstellung ligationsfähiger DNA-Fragmente (2.2.10) oder der Linearisierung von Plasmiden für *in situ* Hybridisierungen (2.3.4 oder 2.3.5).

2.2.6 Dephosphorylierung von DNA

Der Spaltung von zur Ligation bestimmten Vektoren mit nur einem Restriktionsenzym wurde eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (Roche) angeschlossen, um die Frequenz der Religation der komplementären Vektorenden zu verringern. Dazu wurde dem Restriktionsansatz eine vom Hersteller angegebene Menge Reaktionspuffer sowie 1 U Alkalische Phosphatase (CIP) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente entweder durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.13) aufgereinigt oder sofort gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.8).

2.2.7 Umwandlung kohäsiver Enden in glatte Enden

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden kann es notwendig sein, in der sequenzspezifischen Spaltung der DNA (2.2.5) entstandene, 5' überhängende Enden der DNA mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* aufzufüllen. Dazu wurde der Restriktionsansatz auf eine Konzentration von 250 µM je dNTP eingestellt, mit 1 U Kle-

now-Fragment (NEB) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.8) oder nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.13) für weitere restriktionsenzymatische Spaltungen verwendet

2.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Als Gel sowie als Laufpuffer wurde das TAE-Puffersystem eingesetzt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 0,8 - 2,0% (w/v) verwendet. Der aufgekochten Agaroselösung wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,25 Volumen Auftragspuffer vermischt. Zur späteren Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurde außerdem die 1-kb-Leiter (GibcoBRL) als Längenstandard aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung wahlweise zwischen 2 und 5 Volt/cm bei RT. Im Anschluss an die Auftrennung konnten die DNA-Fragmente mit Hilfe der Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit einer Computer-gestützten Videodokumentation fotografiert werden. Ausgenommen davon wurden DNA-Fragmente, die in eine Ligation eingesetzt werden sollten. Diese DNA-Banden wurden durch Bestrahlung mit energieärmerem UV-Licht (366 nm) einer Hand-UV-Lampe (Konrad Benda) detektiert und aus dem Agarosegel isoliert (2.2.9).

1-kb-Leiter (GibcoBRL)	12.216; 11.198; 10.180; 9.162; 8.144; 7.126; 6.108; 5.090; 4.072; 3.054; 2.036; 1.636; 1.018; 506; 517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp
Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin 2% (w/v) Orange G in TAE
TAE	40 mM Tris/Acetat 2 mM EDTA pH 8,2

2.2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten erfolgte aus hochschmelzenden Agarosegelen unter Anwendung der „Glasmilch-Methode“ (Vogelstein und Gillespie, 1979) mit Hilfe des Genomed-Jet sorb Gel Extraction Kit/600. Hierfür wurde die Bande mit dem gewünschten DNA-

Fragment nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (2.2.8) unter langwelligem UV-Licht detektiert und sorgfältig mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Gewicht des isolierten Gelstücks ermittelt. Nach Zugabe von 12 µl Glasmilch wurde das Gelstück mit 300 µl Puffer A1/0,1 mg Agarose versetzt und durch Inkubation im Schüttler für 10 min bei 56°C und 1.400 Upm aufgeschmolzen. Nach einer Zentrifugation für 15 sek bei 13.000 Upm befand sich die an die Glasmilch gebundene Nukleinsäure im Sediment, wurde wiederum mit 500 µl Puffer A1 versetzt, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Präzipitat wurde danach in 500 µl Puffer A2 resuspendiert und nach einer weiteren Zentrifugation für 45 sek bei 56°C getrocknet. Durch Zugabe von 22µl TE und Inkubation im Schüttler für 5 min bei 56°C und 1.400 Upm wurde die DNA eluiert und durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 Upm von der Glasmilch abgetrennt. Zur Kontrolle der Elutionseffizienz wurden obligatorisch 10% der eluierten DNA nochmals gelelektrophoretisch (2.2.8) analysiert.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 25 - 50 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss Insert-DNA, 1 U T4-DNA-Ligase (GibcoBRL) und 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer versetzt und 2 h bei RT inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden anschließend für die Transformation in kompetente Bakterien (2.2.11) eingesetzt.

2.2.11 Transformation von Plasmid-DNA.

Die zur Transformation verwendeten, kompetenten *Escherichia coli*-Zellen (JM109; *recA1*; *lacZΔM15*) wurden freundlicherweise von Stefanie Kuschel zur Verfügung gestellt.

Für die Transformation wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, anschließend mit 5 µl des Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein kurzer Hitzschock, 45 sek bei 42°C, und eine weitere Inkubation auf Eis für 1 min. Nach der Zugabe von 100 µl LB-Medium und Schütteln bei 37°C mit 1.000 Upm für 10 min wurde die Suspension auf antibiotikahaltigen Selektivnährböden ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Die herangewachsenen Bakterienkolonien transformierter Zellklone wurden für das Animpfen von Flüssigkulturen verwendet, die zunächst die Analyse der Klone

ermöglichten (2.2.12.1) und im Weiteren der Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (2.2.12.2) dienten.

Selektivnährboden 1,5% (w/v) Bacto-Agar
 50 µg/ml Ampicillin
 in LB-Medium

2.2.12 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) und Birnboim (Birnboim, 1983) mit modifizierten Bedingungen angewendet.

2.2.12.1 Plasmid-Präparation aus 5 ml Kulturen (Mini-Präp)

Jeweils 5 ml Selektionsmedium wurden mit einer Einzelkolonie eines plasmidtragenden Bakterienstammes angeimpft und für 8-16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 2 ml der Suspension wurden zur Präzipitation der Bakterien 2 min mit 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 150 µl des Puffers P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl des Puffers P2 wurde die Lösung durch vorsichtiges Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 175 µl eiskalten Puffer P3 versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Durch eine nachfolgende Zentrifugation für 10 min mit 13.000 Upm wurde der entstandene Niederschlag sedimentiert und der klare, plasmidhaltige Überstand konnte in 400 µl Isopropanol überführt werden. Der Ansatz wurde gemischt und wiederum 10 min mit 13.000 Upm zentrifugiert, um nun die Plasmid-DNA zu präzipitieren. Der DNA-Niederschlag wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut 5 min mit 13.000 Upm zentrifugiert, luftgetrocknet und in 50 µl TE oder dH₂O resuspendiert. Die gewonnene Plasmid-DNA konnte nun restriktionsenzymatisch (2.2.5) und gelelektrophoretisch (2.2.6) weiterverarbeitet oder zur Sequenzierung (2.2.20) eingesetzt werden. Überschüssige Bakteriensuspension konnte zum Animpfen größerer Flüssigkulturen verwendet werden.

Puffer P1 50 mM Glucose
 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM EDTA, pH 8,0

Puffer P2 0,2 N NaOH
 1% (w/v) SDS

Puffer P3 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 mit Eisessig

Selektionsmedium 50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium

2.2.12.2 Plasmid-Präparation aus 100 ml Kulturen (Maxi-Präp)

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (bis 500 µg) hochreiner Qualität wurden zunächst 100 ml Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie eines plasmidtragenden Bakterienstammes oder mit 100 µl bereits analysierter Bakteriensuspension aus einem Mini-Präp (2.2.12.1) angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die folgende Plasmid-Präparationen aus 100 ml Kulturen wurde das „QIAGEN Plasmid Kit“ der Firma Qiagen ausschließlich nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Konzentration der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde spektralphotometrisch bestimmt (2.2.15) bevor weitere restriktionsenzymatische (2.2.5) und gelelektrophoretische (2.2.6) Analysen vorgenommen wurden oder die DNA in der *in ovo* Elektroporation (2.5) Verwendung fand.

2.2.13 Phenol-Chloroform-Extraktion

Im Anschluss an enzymatische Reaktionen kann es notwendig sein, Proteine aus der wässrigen, nukleinsäurehaltigen Lösung zu entfernen, damit sie nachfolgende Reaktionen nicht beeinträchtigen. Dazu wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, bei der Proben mit Protein-Nukleinsäuregemischen 1 Volumen Phenol-Chloroform zugegeben wurde. Durch kräftiges Vortexen wurden die hydrophile, wässrige und die hydrophobe Phenol-Chloroform-Phase zunächst gemischt und durch Zentrifugation für 5 min mit 13.000 Upm wieder getrennt. Die Nukleinsäuren befanden sich nun in der oberen, wässrigen Phase, während die amphiphilen Proteine im Interphasebereich verblieben. Die wässrige Phase konnte abgenommen und durch eine weitere Extraktion alleine mit Chloroform von Phenolresten befreit werden. Im Anschluss an eine Phenol-Chloroform-Extraktion wurde obligatorisch eine Natriumacetat-Ethanol-Fällung (2.2.14) durchgeführt.

Phenol-Chloroform 1:1, TE gesättigt

2.2.14 Natriumacetat-Ethanol-Fällung

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt und mit 2,5 Volumen 100% Ethanol gemischt. Nach Inkubation für mindestens 1 h bei mindestens -20°C wurden die gefällte Nukleinsäuren für 30 min bis 1 h bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend noch einmal mit 70% (v/v) Ethanol gespült und abermals für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Über-

stand vollständig abgenommen, die Nukleinsäuren an der Luft getrocknet und zur weiteren Verwendung im jeweiligen Puffer und geeignetem Volumen gelöst.

2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde in einem Spektralphotometer (Pharmacia Ultrospec 2000) die Absorption verdünnter Nukleinsäurelösungen in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Referenzmessung des Lösungsmittels besteht zwischen der gemessenen Absorption und der Nukleinsäurekonzentration folgende Beziehung (Sambrook *et al.*, 1989):

RNA 1 A₂₆₀ = 40 µg/ml

DNA 1 A₂₆₀ = 50 µg/ml

2.2.16 PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden in einer MWG-Biotech-Maschine (Primus) unter Verwendung dünnwandiger 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße durchgeführt. Als Enzym wurde entweder die einfache *Taq*-Polymerase (Roche) oder die *Taq*-Polymerase *expand* (Roche) mit zusätzlicher *proofreading* Aktivität, in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem verwendet. Für den Ablauf der PCR wurden folgende Bedingungen festgelegt :

1x	Denaturierung	3 min	95°C
30x - 35x		Denaturierung	1 min 95°C
		Annealing	1 min 56°C - 62°C
		Elongation	1 min 72°C
1x	Elongation	7 min	72°C
	Abkühlung	∞	22°C

Im Anschluss an die PCR wurden 2 - 5 μl der Ansätze gelelektrophoretisch (2.2.8) kontrolliert, bevor die amplifizierte DNA aufgereinigt (2.2.13) und zur weiteren Klonierung verwendet wurde.

Standard-PCR-Ansatz (50 μl)	5,0 μl 10x Puffer 1,0 μl dNTP-Gemisch (10 mM) 1,0 μl Oligonukleotid 1 (100 pmol/ μl) 1,0 μl Oligonukleotid 2 (100 pmol/ μl) 0,5 μl Polymerase (5 U) x μl DNA (0,1 – 1 ng/ μl) ad 50 μl dH ₂ O
dNTP-Gemisch	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP

2.2.17 Reverse Transkription

Für reverse Transkriptionen wurde das „Expand Reverse Transcriptase“-System von Roche verwendet. Es wurden zwischen 100 ng - 5 μg Gesamt-RNA und 20 pmol *Oligo(dT)*-Oligonukleotide eingesetzt, die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten Puffersystems.

2.2.18 Erzeugung doppelsträngiger Oligonukleotide

Zur Generierung doppelsträngiger DNA aus Oligonukleotiden wurden jeweils 1 nM der komplementären Einzelsträngen in einem Gesamtvolumen von 100 μl zunächst zur vollständigen Denaturierung 5 min bei 94°C inkubiert und anschließend durch Abkühlung innerhalb mehrerer Stunden bis auf Raumtemperatur sequenzspezifisch aneinandergelagert. Der Ansatz wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.19 Radioaktive Markierung doppelsträngiger Oligonukleotide mit γ -³²P-ATP

In einem Gesamtvolumen von 30 μl wurden 10 pM doppelsträngiger Oligonukleotide (2.2.18) mit 10 U Polynukleotid-Kinase (NEB), 3 μl 10x Polynukleotid-Kinase-Puffer und 3 μl γ -³²P-ATP (5000 Ci/mmol) versetzt und maximal 30 min bei 37°C inkubiert. Für die Aufreinigung der radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde das „Qiaquick Nucleotid removal Kit“ ausschließlich nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Effizienz der Markierung wurde

durch eine Cerenkovzählung in einem Szintillationszähler bestimmt bevor die Oligonukleotide in Gelretardationsanalysen (2.4.2) eingesetzt wurden.

2.2.20 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurden als Auftragssequenzierung entweder vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels „ABI Prism“-Sequenzierautomat oder von der Firma AGOWA GmbH, Berlin durchgeführt.

2.2.21 Oligonukleotide

Tabelle 1: Oligonukleotide

PCR-Nr.	Bezeichnung	Sequenz 5' - 3' (Position der Cst-Sequenz)	Schnittstelle
1	Cst I Fw	AGA CCT TGC TGA CGG AAG (131 Cst I)	
	Cst Bw 0	CCA CTG CGG TCT TTG TCC (561 Cst I)	
2	Cst II Fw	GAG TGT TAC CGT CAG GAG C (22 Cst II)	
	Cst Bw 0	CCA CTG CGG TCT TTG TCC (388 Cst II)	
3	Cst Fw 19	CAT CAA GAC AGA AGC GGA G (3276)	
	Cst Bw 3	CTC TCT AGA GAC GTC GTC (3809)	
4	Cst Fw 18	AAT GAA TTC TAT GGA TCT TGG AAC AGC TG (358)	<i>EcoRI</i>
	Cst Bw 6	GGT GGA AGC AGC GTA GTC (880)	<i>BamHI</i>
5	Cst Fw 15	AAT GAA TTC TAT TGC CAG GTT CTC AGG AAG T (1755)	<i>EcoRI</i>
	Cst Bw 15	AAT CTC GAG GCC CAG CAG GGA GGC CGG (2470)	<i>XhoI</i>
-	Castor-Bindestelle #12 des <i>pdm-1</i> Promotors	5' - 3' : TCA ACC CCT TTT TTT TAT GGC CCA CCA GAG 3' - 5' : AGT TGG GGA AAA AAA ATA CCG GGT GGT CTC	

2.3 RNA-Techniken

2.3.1 RNA-Isolierung aus embryonalen Geweben

Zur Vermeidung von RNA-Degradationsprozessen wurde das präparierte Gewebe unmittelbar nach der Isolierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Isolierung von RNA wurde das gefrorene Material gewogen, mit 1 ml TRIZOL (GibcoBRL)/100 mg Gewebe versetzt und sofort im Polytron (Stufe 4, Kinematica AG, Luzern) homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung der RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers, jedoch wurden alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. bei 4°C und nicht bei RT durchgeführt. Anschließend wurde der luftgetrocknete RNA-Niederschlag in einem geeigneten Volumen DEPC-dH₂O aufgenommen und nach der Konzentrationsbestimmung (2.2.15) bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

2.3.2 Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Für die Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden wurden das RNA-Polymerase-System von Roche und linearisierte Plasmid-DNA (2.2.5) verwendet, die geeignete Promotor-Sequenzen für eine der RNA-Polymerasen T3, T7 oder Sp6 enthielt. In einem Standard-Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 20 µl wurde 1 µg linearisierte Plasmid-DNA mit 2 µl 10 x DIG-Nukleotid-Mix, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 1 U RNase-Inhibitor und 1 U RNA-Polymerase (Roche) versetzt und \hat{u} N bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Ammoniumacetat gefällt (2.3.3) und das Pellet in 50 µl 50% Formamid/2 x SSC, pH 7,0 resuspendiert. Vor ihrer Verwendung bei *in situ* Hybridisierungen (2.3.4, 2.3.5) wurde ein Aliquot der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden gelelektrophoretisch (2.2.8) überprüft.

10 x Transkriptionspuffer	0,4 M Tris-HC, pH 8,0
	0,1 M Dithiothreitol
	60 mM MgCl ₂
	20 mM Spermidin

Tabelle 2: Digoxigenin-markierte RNA-Sonden

Probe	Linearisierung mit	RNA-Polymerase	Referenz/Quelle
<i>cCst</i>	<i>KpnI</i>	T7	ChEST 675N23
<i>mCst</i>	<i>EcoRI</i>	T3	RikenEST
<i>Math1</i>	<i>KpnI</i>	T7	Helms und Johnson, 1998
<i>Cath1</i>	<i>NcoI</i>	Sp6	Helms und Johnson, 1998
<i>cNgn1</i>	<i>SacI</i>	T3	Gowan <i>et al.</i> , 2001
<i>Ngn2</i>	<i>BamHI</i>	T7	Gradwohl <i>et al.</i> , 1996
<i>Mash1</i>	<i>XbaI</i>	Sp6	Guillemont und Joyner, 1993
<i>Cash1</i>	<i>NcoI</i>	T3	Gowan <i>et al.</i> , 2001
<i>Msx1</i>	<i>NcoI</i>	Sp6	Chan <i>et al.</i> , 1993
<i>Msx2</i>	<i>PstI</i>	T7	Robert <i>et al.</i> , 1991
<i>cConductin</i>	<i>NotI</i>	T3	ChEST NM204491
<i>cHes5</i>	<i>NotI</i>	T3	Debreuil <i>et al.</i> , 2002
<i>cId2</i>	<i>PstI</i>	T3	Debreuil <i>et al.</i> , 2002
<i>cDelta1</i>	<i>EcoRI</i>	T3	Henrique <i>et al.</i> , 1997
<i>cNeuroM</i>	<i>HindIII</i>	T3	Roztocil <i>et al.</i> , 1997
<i>cBmp4</i>	<i>SmaI</i>	T7	zur Verfügung gestellt von Dr. J.C. Izpisua Belmonte
<i>cCyclinB3</i>	<i>SacI</i>	T3	ChEST 412E18
<i>cCyclinD1</i>	<i>SacI</i>	T3	ChEST 109B12
<i>cCclinD2</i>	<i>SacI</i>	T3	ChEST 174M17
<i>cLh2b</i>	<i>EcoRI</i>	T3	Liem <i>et al.</i> , 1997
<i>Tlx3</i>	<i>SstII</i>	T7	Logan <i>et al.</i> , 2002

2.3.3 Ammoniumacetat-Fällung

Die Fällung mit Ammoniumacetat und Ethanol wurde im Anschluss an die RNA-Sondensynthese (2.3.2) durchgeführt, weil hierbei nicht eingebaute Mononukleotide hauptsächlich im Überstand verbleiben und nicht mit den Digoxigenin-markierten RNA-Sonden präzipitieren.

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 0,5 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 4 Volumen 100% Ethanol gemischt. Nach Inkubation für mindestens 1 h bei -20°C oder -80°C wurde die gefällte Nukleinsäure für 30 min bis 1 h mit 13.000 Upm bei 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend noch einmal mit 75% Ethanol gewaschen und abermals für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vollständig abgenommen, die Nukleinsäuren zur weiteren Verwendung in dH₂O oder 50% Formamid, 2 x SSC gelöst und bei -20°C gelagert.

2.3.4 Whole mount *in situ* Hybridisierungen

Die Methode der *whole mount in situ* Hybridisierung erlaubt den Nachweis von mRNA-Transkripten im gesamten Embryo durch die Hybridisierung mit markierten Antisense-RNA-Sonden. Gebundene, markierte Sonden werden durch spezifische enzymgekoppelte Antikörper nach Umsetzung eines Farbsubstrates detektiert.

Bei der Präparation wurden sowohl Mäuse- als auch Hühnerembryonen von allen extraembryonalen Membranen befreit, in PBS gewaschen und in PBS bei 4°C in 4% PFA fixiert. Nach kurzem Waschen in PBT wurden die Embryonen für jeweils 10 min in 50% Methanol/PBT, 75% Methanol/PBT und 100% Methanol unter Schütteln inkubiert. In frischem 100% Methanol wurden die Präparate zunächst eine Nacht und danach entweder weiter bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert oder anschließend in die *in situ* Hybridisierung eingesetzt.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden mit dem *in situ* Roboter „insituPro“ der Firma Abimed durchgeführt. Zunächst wurden die Embryonen durch die Inkubation in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert und 2 x 12 min sowie 1 x 20 min in PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen 5 min in 6%iger H₂O₂-Lösung gebleicht und wieder 2 x 5 min in PBT inkubiert. Um die Permeabilität der Embryonen für die RNA-Sonden zu erhöhen, folgte eine Behandlung mit Proteinase K (10 µg/ml) in PBT für die Dauer von 5 - 10 min, in Abhängigkeit des Alters der Embryonen (HH16, E8,5 – HH18, E9,5 → 5 min, HH19; E10,0 – HH24, E11,5 → 10 min). Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBT für jeweils 5 min folgte ein zusätzlicher Inkubationsschritt in Glycin (2 ml/ ml PBT) um die Aktivität der Proteinase zu stoppen. Danach wurden die Embryonen für 20 min in 4% PFA/0,1% Glutaraldehyd postfixiert und erneut kurz mit PBT gewaschen bevor zur Prähybridisierung, 3 h bei 65°C, der Hybridisierungspuffer zugegeben wurde. Vor der Hybridisierung wurden je 1 - 2 µl der DIG markierten RNA-Sonden (2.3.2) mit 1 ml Hybridisierungspuffer

versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. In dieser Lösung wurden die Embryonen anschließend für 16 h bei 65°C hybridisiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener und überschüssiger RNA-Sonden wurden die Präparate nach der Hybridisierung 2 x 30 min mit Hybridisierungspuffer, 2 x 30 min mit Lösung I und 1 x 20 min mit Lösung I/MABT (1:1) bei jeweils 65°C gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschritten für jeweils 10 min mit MABT bei RT wurden die Embryonen zum Absättigen unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 3 h in Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung durch den mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten DIG-Antikörper (1:1.000 in Blockierungslösung) ersetzt und 12 h bei RT inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener und überschüssiger Antikörper wurden die Embryonen anschließend 2 x 12 min, 1 x 20 min, 1 x 30 min, 1 x 45 min und 8 x 60 min mit MABT sowie 30 min mit NTMT gewaschen. Hiernach erfolgte die weitere Aufarbeitung der Embryonen manuell. Einer weiteren Behandlung mit NTMT für 30 min wurde die Inkubation in Färbelösung im Dunkeln bei RT angeschlossen. Nach Abschluss der Farbreaktion wurden die Embryonen mehrfach kurz in PBT gewaschen, in 4% PFA fixiert und bei 4°C gelagert.

Hybridisierungspuffer	50% Formamid 5 x SSC, pH 4,5 0,1 % (v/v) Triton X-100 50 µg/ml Heparin 0,5 mg/ml tRNA 5 mM EDTA, pH 8,0 in DEPC-H ₂ O
Blockierungslösung	2% (w/v) Blockierungsreagenz (ROCHE) 20% Schafserum, hitzeinaktiviert in MABT
Lösung I	50% Formamid 1x SSC, pH 4,5 0,1% (v/v) Triton X-100
MABT	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Triton X-100
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,5% (v/v) Tween-20
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP in NTMT

2.3.5 *In situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten

Mit dieser Methode können auf Paraffinschnitten mRNA-Transkripte in Geweben oder einzelnen Organen nachgewiesen werden. Hierbei ist es, anders als bei der *whole mount in situ* Hybridisierung möglich, durch die Analyse aufeinander folgender Schnitte, die mit unterschiedlichen RNA-Sonden (2.3.2) behandelt werden, die Expression mehrerer Gene an einem Embryo zu untersuchen.

Zuerst wurde durch mehrere Waschschrte das Paraffin aus den Geweben auf den Paraffindünnschnitten (2.7.2) entfernt. Die Schnittpräparate wurden dafür 3 x 7min in Xylol, 2 min in Xylol/Ethanol (1:1), 2 x 2min in 100% Ethanol, je 1 min in 96%, 90%, 70% und 50% Ethanol sowie 2 x 5 min in PBS inkubiert. Angeschlossen wurde eine Behandlung mit Proteinase K (20 µg/ml) für 10 min bei 37°C. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Gewebe 5 min bei RT in 0,2% Glycin/PBS inkubiert, anschließend 2 x 5 min in PBS gewaschen und 20 min in 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd postfixiert. Nach zweimaligen Waschen für jeweils 5 min in PBS wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern möglichst nah mit einem Fettstift (ImmEdge-Pen; Vector Laboratories) umrandet. Dieses Verfahren gewährleistet, dass die im Folgenden aufgetragenen geringen Lösungsvolumen nicht verlaufen und so die Präparate vollständig überdecken. Jedes Schnittpräparat wurde mit 7,5 µl Hybridisierungspuffer überschichtet und 1 h in einer mit 50% Formamid/2 x SSC befeuchteten Kammer bei 65°C prähybridisiert. Vor der Hybridisierung wurden die DIG-markierten RNA-Sonden bis zu einer Endkonzentration von 1 ng/µl mit Hybridisierungspuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. In dieser Lösung wurden die Embryonen anschließend 1 h bei 70°C hybridisiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener und überschüssiger RNA-Sonden wurden die Präparate nach der Hybridisierung kurz in 2 x SSC getaucht und 2 x 15 min bei 65°C mit 50% Formamid/2 x SSC gewaschen. Nach drei weiteren Waschschrten für jeweils 10 min in PBT bei RT wurden die Schnittpräparate zum Absättigen unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 1 h in B-Blocklösung inkubiert. Danach wurde die B-Blocklösung durch den mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten DIG-Antikörper (1:1.000 in B-Blocklösung) ersetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener und überschüssiger Antikörper wurden die Gewebe anschließend 3 x 10 min mit PBT gewaschen. Einer weiteren Behandlung mit NTM für 10 min wurde die Inkubation in Färbelösung im Dunkeln bei RT angeschlossen. Nach Abschluss der Farbreaktion wurden die Präparate mehrfach kurz in PBS gewaschen und mit Aquatex eingedeckelt.

Hybridisierungspuffer	50% Formamid 5 x SSC, pH 4,5 0,1% Boehringer-Block 50 mM EDTA 0,1% Tween 20 0,1% CHAPS 0,2% Heparin 0,01% tRNA
B-Blocklösung	2% (w/v) Boehringer-Block 10% Schafserum in PBT
NTM	100 mM Tris, pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Färbelösung	2% (v/v) NBT/BCIP (Roche) in NTM

2.4 Protein-Techniken

2.4.1 Gewinnung von GST-Fusionsproteinen

Die Gewinnung von GST-Fusionsproteinen erfolgte nach Smith und Corcoran (Smith *et al.*, 1990). Jeweils 10 ml Selektionsmedium wurden mit einer Einzelkolonie eines pGEX4T3-Vektor tragenden Bakterienstammes angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln mit 185 Upm inkubiert. Im folgenden wurde das Volumen auf 100 ml erhöht, die Kultur unter konstanten Bedingungen weiter kultiviert, bei Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,8 bis zu einer Endkonzentration von 1 mM mit IPTG versetzt und anschließend für weitere zwei Stunden inkubiert. Zur Präzipitation der Bakterien wurde die Kultur 20 min mit 6000 Upm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in 10 ml kaltem PBS resuspendiert und die Bakterien anschließend mittels einer French Press bei 1100 Psi aufgeschlossen. Zur besseren Solubilisierung der Fusionsproteine wurde die Suspension danach bis zu einer Endkonzentration von 1% mit Triton X-100 versetzt und 30 min auf Eis geschwenkt. Anschließend wurde der Bakteriendebris in 10 min mit 6000 Upm bei 4°C abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde aufgefangen, mit 1 ml einer, nach den Angaben des Herstellers äquilibrierten 50%igen Glutathion-Spharose 4B-Suspension versetzt und erneut 30 min auf Eis unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde danach 2 min mit 1700 Upm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sepharose dreimal mit PBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine aus der Matrix zu entfernen. Dazu wurde die Sepharose jeweils mit 5 ml PBS versetzt, invertiert und sofort im Anschluss 2 min mit 1700 Upm bei 4°C zentrifu-

25 µl TEMED
 125 µl 40% APS
 ad 60 ml dH₂O

5x TBE

54,0 g/l Tris
 27,5 g/l Borsäure
 20 ml/l 0,5 M EDTA, pH 8,0

2.4.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) in einer vertikalen Biometra Minigel-Twin Gelapparatur. Das Volumen des Sammelgels betrug 3 ml, das des Trenngels 12 ml, die Dicke beider Gele in der Kammer jeweils 1 mm. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit 4x Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Zur späteren Größenabschätzung der Proteine wurde außerdem der SDS-PAGE Marker for Molecular Weight der Firma Sigma aufgetragen. Nach dem Lauf durch das Sammelgel bei 25mA und 100V folgte schließlich die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei konstant 50mA. Im Anschluss an die Elektrophorese konnten die Proteine mittels einer Silberfärbung von Proteingelen (2.4.4) sichtbar gemacht und mit einer Computer-gestützten Videodokumentation fotografiert werden.

SDS-PAGE Marker (Sigma)

206; 116; 97; 66; 45; 29 kDa

4x Auftragspuffer

400 mM Tris-HCl, pH 8,0
 40% Glycerin
 12% SDS
 8% β-Mercaptoethanol
 0,4% Bromphenolblau

10x Laufpuffer

250 mM Tris
 2 M Glycin, pH 2,7
 1% SDS

Sammelgel

450 µl 2x MDE Gelsolution (Biowhittaker Molecular Applications)
 390 µl Sammelgelpuffer
 5 µl TEMED
 15 µl 40% APS
 ad 3 ml dH₂O

Trenngel

2x MDE Gelsolution (Biowhittaker Molecular Applications)
 1,2 ml SDS
 3 ml Trenngelpuffer
 5 µl TEMED
 60 µl 40% APS
 ad 12 ml dH₂O

Sammelgelpuffer

500 mM Tris-HCl, pH 6,3

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
 1% SDS

2.4.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und nach einem modifizierten Protokoll von Schumacher *et al.* 1983 weiterbehandelt. Zunächst wurde 20 min unter Schütteln in Fixierlösung I inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 10 min in Fixierlösung II und 1 min in Verstärkerlösung geschwenkt bevor es dreimal kurz in dH₂O gewaschen wurde. Danach wurde das Gel 25 min in wieder verwendbarer Färbelösung inkubiert, wiederum dreimal kurz in dH₂O gewaschen und nachfolgend nach Bedarf bis zur Detektion der Banden in Entwicklerlösung geschwenkt. Die Farbreaktion wurde durch die Überführung des Gels in die Endfixierungslösung gestoppt.

Fixierlösung I	50% Ethanol 12% Essigsäure
Fixierlösung II	30% Ethanol
Verstärkerlösung	0,2 g/l Natriumthiosulfat 3,25 ml/l Formaldehyd, 37%
Färbelösung	0,2% Silbernitrat
Entwicklerlösung	15 g/l Natriumcarbonat 200 ml/l Verstärkerlösung
Endfixierungslösung	25% Ethanol 12% Essigsäure 5% Glycerin

2.5 *In ovo* Elektroporation

Die Methode der *in ovo* Elektroporation (Muramatsu *et al.*, 1997) ermöglicht grundsätzlich die Manipulationen der Genexpression während der Embryonalentwicklung in ausgesuchten Geweben des Huhns. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in ovo* Elektroporation dazu eingesetzt Neuralrohrzellen mit Expressionsplamiden zu transfizieren, die neben ausgesuchten Gensequenzen transkriptionsrelevante regulatorische Elemente tragen und damit eine zellautonome Expression der eingeführten Gensequenz induzieren. Im Anschluss daran kann der Einfluss der ektopischen Expression auf die Neurogenese der betroffenen Zellen untersucht werden.

Zunächst wurden befruchtete Hühnereier 48 h bei 38°C und 50% Luftfeuchtigkeit inkubiert, so dass sich die Embryonen zum Zeitpunkt der Elektroporation in einem Entwicklungsstadium zwischen HH10 und HH14 befanden. Zu Beginn dieser ersten Inkubationsphase wurden die Eier horizontal ausgerichtet und die Position des Embryos oben auf der Schale markiert.

Um die Eierschale für das Elektroporationsverfahren später gefahrlos an dieser Stelle öffnen zu können, wurde der Dotter mit dem aufliegenden Embryo zuvor durch das Absaugen von 4 - 5 ml Albumin abgesenkt. Ein Splittern der Schale beim Öffnen der Eier wurde durch aufgeklebtes, breites Klebeband verhindert. Mittels einer spitzen Präparierschere wurde dann ein 2 x 2 cm großes Fenster aus der Schale geschnitten. Die, zur besseren optischen Kontrolle mit dem Farbstoff Fast Green FCF (Sigma) versehene DNA-Lösung wurde mit einer ausgezogenen Glaskapillare in das rostrale Neuralrohr injiziert. Die Konzentrationen der injizierten Plasmid-DNA variierte von 1,5 µg/µl bis 5,0 µg/µl. Grundsätzlich wurde eine möglichst hohe Konzentration zur Elektroporation angestrebt, wobei die Viskosität einer DNA-Lösung mit einer Konzentration von mehr als 5 µg/µl eine zuverlässig reproduzierbare Injektionseffizienz nicht zuließ. Eine niedrige Konzentration musste dann gewählt werden, wenn durch eine massive Überexpression des injizierten Gens auftretende strukturellen Defekte des Neuralrohres eine Auswertung unmöglich machten. Bei Experimenten, in deren Verlauf zwei Konstrukte gleichzeitig elektroporiert werden sollten (Koelektroporation), wurden äquimolare Mengen der Plasmide eingesetzt. Nach der Injektion der DNA-Lösung wurden zwei vergoldete, 5 mm lange Elektroden mit einem Durchmesser von 0,5 mm im Abstand von 5 mm parallel zu beiden Seiten des Embryos platziert. Die Elektroden wurden so ausgerichtet, dass sich der Embryo exakt mittig und der Kopf und die Herzanlagen des Embryos nicht zwischen diesen befanden. Der Embryo wurde anschließend mit 150 µl 1% Penicillin-Streptomycin/HBSS (GibcoBRL) überschichtet, welches aufgrund seiner hohen Konzentration an gelösten Ionen den Stromfluss während der Elektroporation begünstigt. Mit einem Electro Square Porator ECM 830 (BTX) wurde in 5 Pulsen eine Spannung von 25 V für eine Dauer von je 50 ms angelegt. Innerhalb des angelegten elektrischen Feldes dringt die in das Lumen injizierte Plasmid-DNA aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrates nur in die Zellen der Anode zugewandten Seite des Neuralrohres ein. Die Zellen der zur Kathode gelegene Seite nehmen hingegen keine Plasmid-DNA auf. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass im Rahmen eines Experimentes und innerhalb desselben Organismus eine gleichbehandelte wildtypische Kontrolle zum direkten Vergleich vorhanden ist. Danach wurden die Öffnung in der Schale der Eier wieder mit Klebeband verschlossen, um ein Austrocknen des Embryos während der anschließenden Inkubationsphase für weitere 24 h - 48 h bei 38°C und 50% Luftfeuchtigkeit zu verhindern. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Embryonen entweder einer BrdU-Markierung (2.5.1) unterzogen oder direkt aus dem Ei isoliert (2.6.2).

Tabelle 3: Expressionsplasmide zur in ovo Elektroporation

Insert	Vektor	Konzentration	Referenz / Quelle
Myc-Cst	pCS2+MT	5,0 µg/µl	Riken-EST , BB 026049
Myc-Cst4	pCS2+MT	4,0 µg/µl	Riken-EST BB 026049
Myc-CstMI-4-EngR	pCS2+MT	4,0 µg/µl	Riken-EST BB 026049, Marine <i>et al.</i> , 1997
Myc-CstMI-4-E1A	pCS2+MT	4,0 µg/µl	Riken-EST BB 026049, Marine <i>et al.</i> , 1997
caBmpR1b	pEGFP	1,5 µg/µl	Timmer <i>et al.</i> , 2002
cNoggin	pMiwIII	1,0 µg/µl	Chesnutt <i>et al.</i> , 2004
Myc-ca β-Catenin	pCS2+MT	5,0 µg/µl	Aberle <i>et al.</i> , 1997
Math1	pMIW III	2,0 µg/µl	Gowan <i>et al.</i> , 2001
Math1-IRES-NLS-GFP	pCAGGS	2,0 µg/µl	Gowan <i>et al.</i> , 2001, Briscoe <i>et al.</i> , 2001
cNgn1-IRES-NLS-GFP	pCAGGS	4,0 µg/µl	zur Verfügung gestellt von Dr. T. Theil
Cash1-IRES-NLS-GFP	pCAGGS	2,0 µg/µl	Jasoni <i>et al.</i> , 1994
Hes5-IRES-NLS-GFP	pCAGGS	4,0 µg/µl	Dubreuil <i>et al.</i> , 2002
Id2-IRES-NLS-GFP	pCAGGS	4,0 µg/µl	Dubreuil <i>et al.</i> , 2002
IRES-NLS-GFP	pCAGGS	5,0 µg/µl	Briscoe <i>et al.</i> , 2001

2.5.1 BrdU-Markierung

Das synthetische Thymidin-Analogon Bromdesoxy-Uridin (BrdU) wird in die DNA von Zellen eingebaut, die sich in der S-Phase der Mitose befinden. Zellkerne, die den markierten Baustein aufgenommen haben, werden mit einem anti-BrdU-Antikörper (Tabelle 4) identifiziert.

2.5.1.1 Hühnerembryonen

In das entstehende, venöse Blutgefäßsystem eines Hühnerembryos (ab HH16) werden mit einer ausgezogenen Glaskapillare 5 µl einer BrdU-Injektionslösung injiziert. Nach 2 stündiger Inkubation bei 38°C und 50% Luftfeuchtigkeit wird der Embryo aus dem Ei isoliert (2.6.2) und weiter analysiert (2.7.1 oder 2.7.2).

BrdU-Stocklösung	1 M BrdU in DMSO
BrdU-Injektionslösung	100 mM BrdU (aus Stocklösung) 5% Fast Green FCF (Sigma) in PBS

2.5.1.2 Mausembryonen

1 h vor der Isolierung der Embryonen zu definierten Embryonalstadien (2.6.1) werden 100 µg BrdU pro g Körpergewicht des Muttertieres peritoneal injiziert.

2.6 Isolierung definierter Embryonalstadien

2.6.1 Maus

Eine erfolgreiche Verpaarung von Mäusen wurde bei den weiblichen Tieren durch das Auftreten eines Vaginalpfropfens angezeigt. Die Weibchen wurden am selben Tag von den Männchen getrennt und die Zeit 12 Uhr mittags als E0,5 der Embryonalentwicklung definiert.

Nach Erreichen des gewünschten Embryonalstadiums wurden die Muttertiere durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri entnommen und die Embryonen unter dem Stereomikroskop in PBS freipräpariert sowie von allen extraembryonalen Membranen befreit. Danach wurden die Embryonen für weitere Analysen (2.7.2) verwendet.

2.6.2 Huhn

Die Stadien der Hühnerembryonen wurden nach dem System von Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt. Die Embryonen wurden aus dem Ei isoliert und unter dem Stereomikroskop in PBS von allen extraembryonalen Membranen befreit. Danach wurden die Embryonen für weitere Analysen (2.3.4, 2.7.1, 2.7.2) verwendet.

2.7 Histologische Techniken

2.7.1 Kryoschnitte

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die von allen extraembryonalen Membranen befreiten Embryonen, kurz in kaltem PBS gewaschen und 1 - 2 h bei 4°C in 4% PFA fixiert. Danach wurden die Embryonen erneut in kaltes PBS überführt und anschließend üN bei 4°C in 30% Sucrose/PBS inkubiert. Nach der Entwässerung durch die Sucrose-Lösung wurden die Embryonen gerichtet in einem geeigneten Gefäß auf Trockeneis in OCT eingebettet. Dabei wurde unbedingt vermieden, dass die Embryonen während der Gefrierphase des OCT-Mediums auf den Gefäßboden absanken. Die eingebetteten Embryonen wurden entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert, oder sofort mit einem Kryostaten (Leica CM 30505) bei -20°C in 20 µm dünne Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Plus-Objektträger überführt und zur vollständigen Adhäsion 30 min bei RT gelagert. Nach Möglichkeit wurden die Präparate sofort im Anschluss immunohistochemischen Analysen (2.8.1) unterzogen oder kurzfristig, höchstens 48 h bei 4°C aufbewahrt.

2.7.2 Paraffinschnitte

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die Embryonen bei der Präparation von allen extraembryonalen Membranen befreit, kurz in kaltem PBS gewaschen und üN bei 4°C in 4% PFA fixiert. Danach wurden die Embryonen durch Inkubation für jeweils 2 h in 70%, 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol unter leichtem Schütteln entwässert und anschließend üN bei 4°C in 1-Butanol aufbewahrt. 2 h nach der Überführung in ein Bad mit 60°C heißem, flüssigem Paraffin wurden die Embryonen weitere 2 h unter Vakuum inkubiert. Anschließend wurden die Präparate ausgerichtet und eingebettet. Nach Aushärtung des Paraffins üN bei RT wurden an einem Mikrotom (Leica RM 2035) 14µm dünne Paraffinschnitte angefertigt. Die Paraffindünnschnitte wurden zur Streckung in ein 45°C warmes Wasserbad überführt und anschließend auf SuperFrost Plus-Objektträger gezogen. Zur vollständigen Streckung und Adhäsion der Präparate auf den Objektträgern wurden diese weitere 30 - 60 min auf einem Heizblock bei 40°C gelagert. Die Schnitte wurden üN bei 37°C und bis zur weiteren Verwendung (2.3.5, 2.8.2) bei 4°C aufbewahrt.

2.8 Immunohistochemie

Der Immunohistochemie liegt zu Grunde, dass Immunglobuline (Antikörper) Bindungsstellen besitzen, die hochspezifisch bestimmte molekulare Strukturen (Epitope) erkennen. Sogenannte Erstantikörper werden aus verschiedenen Organismen, z.B. Maus oder Kaninchen, gewonnen und dazu verwendet, ein zu analysierendes Genprodukt spezifisch zu markieren. Wiederum spezifisch gegen diese Organismen gerichtete, Fluoreszenz-Farbstoff- oder Enzym-konjugierte Zweitantikörper (anti-Maus oder anti-Kaninchen) binden ihrerseits an die Erstantikörper und ermöglichen durch ihr Konjugat die Detektion des gesamten Komplexes.

2.8.1 Antikörperfärbung auf Kryostatschnitten

Für die Antikörperfärbung auf Kryostatschnitten wurden ausschließlich Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelte Zweitantikörper eingesetzt. Die Detektion der Antikörper und die Dokumentation der Präparate wurde mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS NT) im Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

Dafür wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern (2.7.1) möglichst nah mit einem Fettstift (ImmEdge-Pen; Vector Laboratories) umrandet. Dieses Verfahren gewährleistet, dass die später aufgetragenen Lösungen nicht verlaufen und die Präparate vollständig überdecken. Zur Entfernung des Einbettmediums und zur Reinigung von Sucroseresten wurden die Objektträger zunächst 3 x 20 min mit PBS gewaschen, bevor die Gewebe zum Absättigen unspezifischer Antikörperbindungsstellen 1 h bei RT mit 10% Schafserum/PBT überschichtet wurden. Sollte jedoch gegen BrdU detektiert werden, wurden die Präparate noch vor der Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen zunächst 10 min bei 37°C in 2 N HCl und 45 min bei 65°C in 50% Formamid/2 x SSC inkubiert. Anschließend wurden die Erstantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 4) auf die Präparate gegeben und in einer feuchten Kammer üN bei 4°C inkubiert. Danach wurden die wieder verwendbaren Erstantikörper-Verdünnungen aufgefangen und die Objektträger zur Entfernung überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper 3 x 20 min in PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Gewebeschnitte im Dunkeln für mindestens 4 h bei RT mit Zweitantikörpern geeigneter Verdünnung (Tabelle 5) inkubiert, 2 x 10 min in PBS gewaschen und zur Erhaltung der Fluoreszenz mit DABCO-haltigem Moviol eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Moviol

5g Moviol gelöst / 20 ml PBS
10 ml Glycerin

Tabelle 4: Erstantikörper für Gefrierschnitte

Alle Antikörper wurden mit PBS bis zu den angegebenen Konzentrationen verdünnt.

Antigen	Donor-Organismus	Konzentration	Quelle
Myc	Maus	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology
Myc	Kaninchen	1 : 100	Dianova
Islet1/2	Maus	1 : 100	DSHB *
Lim1/2	Maus	1 : 5	DSHB
Engrailed1	Maus	1 : 50	DSHB
Chox10	Kaninchen	1 : 1000	J. Ericson
MNR2	Maus	1 : 50	DSHB
p27	Maus	1 : 100	BD Transduction Laboratories
NeuN	Maus	1 : 500	Chemicon
BrdU	Maus	1 : 20	Bio-Science Products
Pax2	Kaninchen	1 : 200	Zymed
Mash	Maus	1 : 33	BD Biosciences
Cst	Kaninchen	1 : 25	Pineda
Sox3	Kaninchen	1 : 1000	J. Ericson

*DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank der Universität von Iowa

Tabelle 5: Fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper

Alle Antikörper wurden mit PBS bis zur angegebenen Konzentration verdünnt.

Antigen	Konjugat	Donor	Konzentration	Quelle
Maus-IgG	Cy TM 2	Esel	1 : 100	Jacson Immuno Research Lab Inc.
Maus-IgG	Cy TM 3	Esel	1 : 100	Jacson Immuno Research Lab Inc.
Maus-IgG	Alexa Fluor©647	Ziege	1 : 200	Molecular Probes Inc. MoBiTec
Kaninchen-IgG	Cy TM 2	Esel	1 : 100	Jacson Immuno Research Lab Inc.
Kaninchen-IgG	Cy TM 3	Esel	1 : 100	Jacson Immuno Research Lab Inc.
Kaninchen-IgG	Alexa Fluor©647	Ziege	1 : 200	Molecular Probes Inc. MoBiTec

2.8.2 Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten

Zuerst wurde durch mehrere Waschschriffe das Paraffin aus den Geweben auf den Paraffinschnitten (2.7.2) entfernt. Die Schnittpräparate wurden dafür 3 x 10 min in Xylol, 2 x 5 min in 100% Ethanol, je 5 min in 90%, 70% und 50% Ethanol sowie 2 x 5 min in PBS inkubiert. Angeschlossen wurde eine Behandlung mit 1% H₂O₂/PBS, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Zur Demaskierung verdeckter Antigene wurden die Gewebe 3 min in Zitratpuffer bis zum Siedepunkt des Puffers in der Mikrowelle erhitzt, 5 min abgekühlt und erneut 3 min aufgeköcht. Nach zweimaligen Waschen für jeweils 5 min in PBS wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern möglichst nah mit einem Fettstift (ImmEdge-Pen; Vector Laboratories) umrandet. Diese Technik gewährleistet, dass die im Folgenden aufgetragenen Lösungen nicht verlaufen und die Präparate vollständig überdeckt bleiben. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Gewebeschnitte 1 h bei RT mit 10% Schafserum/PBS überschichtet. Anschließend wurden die Erstantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 6) auf die Präparate gegeben und diese dann in einer feuchten Kammer üN bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Objektträger zur Entfernung überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper 2 x 20 min in PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Gewebeschnitte für mindestens 4 h bei RT mit Biotin-gekoppelten Zweitantikörpern in entsprechender Verdünnung (Tabelle 7) inkubiert, 2 x 5 min in PBS gewaschen und zur Bildung eines Biotin-Avidin-Komplexes weitere 45 min in ABC-Lösung inkubiert. Anschließend wurde wiederum 2 x 5 min mit PBS gewaschen und die Zugabe des umzusetzenden Substrates Diaminobenzidin (DAB) vorbereitet. Dafür wurde zuerst eine DAB-Tablette (Sigma) vollständig in 1 ml dH₂O gelöst und nach Zugabe von 1,6 µl NiCl₂ eine H₂O₂-Tablette (Sigma). In dieser Lösung wurden die Gewebe im Dunkeln bis zur Entwicklung eines braunen Niederschlages durch die enzymatische Umsetzung des DAB-Substrates inkubiert, die Reaktion bei ausreichender Färbung der Präparate in H₂O gestoppt und die Objekte in Aquatex eingedeckelt.

Tabelle 6: Erstantikörper für Paraffinschnitte

Antigen	Donor-Organismus	Konzentration	Quelle
Myc	Maus	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology
GFP	Maus	1 : 100	Roche
BrdU	Maus	1 : 20	Bio-Science Products

Tabelle 7: Biotinylierter Zweitantikörper

Antigen	Konjugat	Donor	Konzentration	Quelle
Maus-IgG	Biotin	Ziege	1 : 1000	Vector Laboratories

Zitratpuffer

100 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
pH 6 mit Zitronensäure

ABC-Lösung

1% Lösung A, ABC-Kit (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories)
1% Lösung B, ABC-Kit (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories)
PBS

3 ERGEBNISSE

3.1 Expressionsanalyse von *Cst* im Neuralrohr

Frühere *whole mount* Expressionsanalysen der Embryonalstadien E7,5 bis E12,5 von Mäusen haben gezeigt, dass *Cst* in mehreren Geweben, u.a. im entstehenden Herzen und Neuralrohr exprimiert wird (Hurtado *et al.*, 2002). *Whole mount in situ* Hybridisierungen sowohl von Mäuse- als auch von Hühnerembryonen dienten ebenso als experimenteller Ansatz für einen Vergleich der *Cst*-Expression mit der Expression von Markergenen innerhalb des Neuralrohres. Hiernach wurde angenommen, dass in der Maus während der Stadien E10,5 und E11,5 eine Überlappung der Expressionsdomänen von *Cst* und *Math1* (dP1) sicher und die von *Cst* und *Ngn1* (dP2) wahrscheinlich ist. Für Hühnerembryonen korrespondierender Entwicklungsstadien (HH20, HH24) ergab ein Vergleich der Expressionsdomänen mittels *whole mount in situ* Hybridisierung, dass *Cst* zwar dauerhaft in einem Bereich ähnlich der *Cath1*-Domäne (dP1), aber erst im Stadium HH24 wahrscheinlich auch in dP2-Vorläuferzellen exprimiert wird. Als Ergebnis wurde festgehalten, dass die Expressionsdomäne von *Cst* in Mäuse- und Hühnerembryonen innerhalb des Neuralrohres auf die dorsalen, neuronalen Vorläuferzellen dP1 und dP2 begrenzt ist (le Viseur, 2002).

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass der experimentelle Ansatz, mittels *whole mount in situ* Hybridisierung die Expressionsdomänen verschiedener Gene einzeln nachzuweisen und anschließend miteinander zu vergleichen, mit Nachteilen behaftet ist. Bei der Verwendung mehrerer verschiedener Embryonen ist es neben möglichen qualitativen Schwankungen auch aufgrund individueller morphologischer Unterschiede schwierig, exakt analoge Bereiche miteinander in Beziehung zu setzen und zu vergleichen. Die Darstellung einer eventuellen Koexpression auf zellulärem Niveau, um z.B. die Grenzbereiche von Expressionsdomänen näher zu charakterisieren, ist entsprechend gar nicht möglich. Eine genauere Analyse erlaubt dagegen die Methode der *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten. Diese birgt den Vorteil, dass die Expression verschiedener Gene anhand eines Embryos dargestellt und verglichen werden kann. Morphologische Variationen, wie sie auch bei Objekten ähnlicher Entwicklungsstufen auftreten, werden damit ausgeschlossen und Unterschiede, die aus der Präparation oder Aufarbeitung einzelner Embryonen resultieren, brauchen nicht berücksichtigt zu werden. Allerdings ist auch die Methode der *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten nicht geeig-

net, die Koexpression mehrerer Gene auf zellulärem Niveau darzustellen. Eine weiterführende experimentelle Alternative dafür ist die Immunohistochemie. Hierbei können mittels spezifischer Antikörper die Produkte verschiedener Gene innerhalb einer Zelle nachgewiesen werden.

Um die anfänglichen Analysen zu vertiefen und das Expressionsmuster von *Cst* im dorsalen Neuralrohr von Mäuse- und Hühnerembryonen der Stadien E10,5 und E11,5 bzw. HH20 und HH24 genauer zu charakterisieren, wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. T. Theil *in situ* Hybridisierungen (2.3.5) sowie Antikörperfärbungen auf Paraffin- (2.8.2) und Kryostatschnitten (2.8.1) angefertigt. Auf direkt alternierenden Schnittpräparaten wurde die *Cst*-Expressionsdomäne mit denen für die unterschiedlichen Vorläuferzellpopulationen dP1, dP2 und dP3 bis dP5 charakteristischen Expressionsmuster der proneuralen Gene *Math1*, *Ngn2* und *Mash1* im Maus- bzw. *Cath1*, *Ngn1*, *Cash1* im Hühnchenembryo verglichen. Die in Abb. 11A-D dargestellten *in situ* Hybridisierungen zeigen, dass die *Cst*-Expression in Mausembryonen bereits im Stadium E10,5 angrenzend an das Lumen des Neuralrohres, vollständig mit den Bereichen überlappt, in denen die Markergene *Math1* und *Ngn2* transkribiert werden, folglich wird *Cst* also von Zellen der neuronalen Vorläuferzellpopulationen dP1 und dP2 exprimiert. Darüber hinaus kann mit der in Abb. 11E dargestellten Antikörperfärbung gegen *Cst* und *Mash1* belegt werden, dass sich die Expression von *Cst* mit der dorsalsten Region der *Mash1*-Expressionsdomäne überschneidet, d.h. dem Bereich, der die dP3-Zellpopulation repräsentiert. Im Stadium E10,5 kann außerdem eine bisher noch nicht beschriebene Expression von *Cst* in lateralen Regionen des Neuralrohres detektiert werden (Abb. 11D, Pfeil), die darauf hindeutet, dass *Cst* nicht nur von Vorläuferzellen sondern auch von postmitotischen Zellen exprimiert wird. Diese Domäne reicht im Stadium E10,5 zwar von der dorsalen Hälfte des Neuralrohres bis in die ventrale, ist im späteren Stadium E11,5 aber auf den ventralen Bereich beschränkt (Abb. 11I). Eine zusätzliche Antikörperfärbung gegen BrdU (2.5.1.2), das in der S-Phase befindliche, proliferierende neurale Vorläuferzellen markiert, zeigt, dass sich diese *Cst*-exprimierenden Zellen benachbart zur ventrikulären Zone des Neuralrohres befinden und jüngst gebildete Neuronen (Abb. 11J) sind. Im Stadium E11,5 erscheint die dorsale Expressionsdomäne von *Cst* (Abb. 11D, I) sowie der Bereich der *Math1*-Expression (Abb. 11A, F) weniger ausgedehnt als im Stadium E10,5. Dieses Phänomen geht mit der fortschreitenden Entwicklung des Neuralrohres, bei der die Populationen neuronaler Vorläuferzellen kleiner werden, einher.

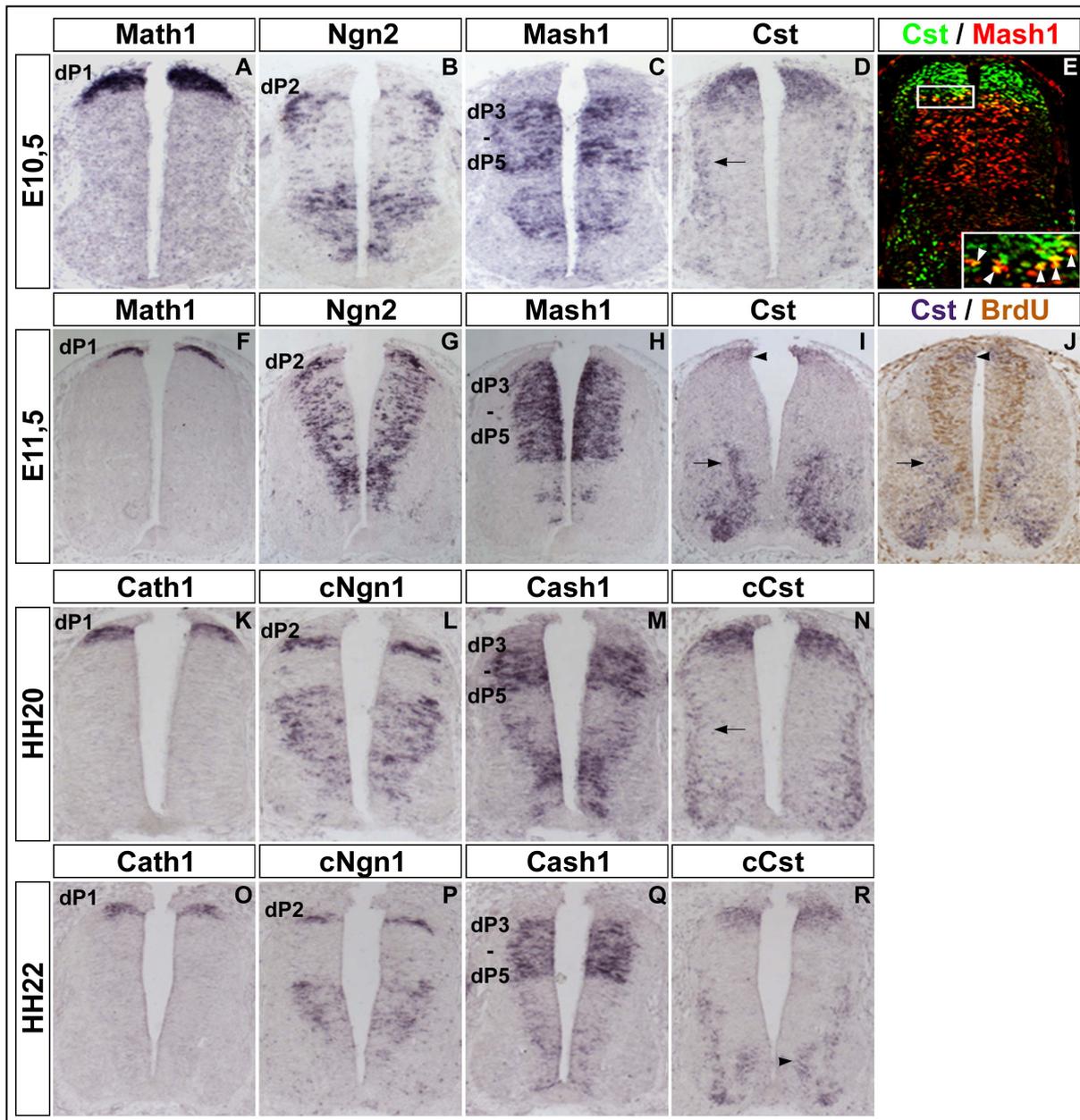


Abb. 11: Expression von Cst im Neuralrohr von Maus- und Hühnchenembryonen.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffin- (14 μm) und Kryostatschnitte (20 μm) durch das Neuralrohr von Mausembryonen des Stadiums E10,5 (A-E) und E11,5 (F-J) sowie von Hühnerembryonen des Stadiums HH20 (K-N) und HH22 (O-R). Es wurden *in situ* Hybridisierungen gegen *Math1* (A, F), *Ngn2* (B, G), *Mash1* (C, H), *Cst* (D, I, J), *Cath1* (K, O), *cNgn1* (L, P), *Cash1* (M, Q) und *cCst* (N, R) sowie Antikörperfärbungen gegen Cst (E), Mash1 (E) und BrdU (J) durchgeführt. Im Stadium E10,5 und E11,5 wird *Cst* in dorsalen Vorläuferzellen, angrenzend an die Dachplatte exprimiert (D, E, I, J). Diese Expressionsdomäne überlappt mit der von *Math1* (A, F) und *Ngn2* (B, G). (E) Eine Doppel-Immunofluoreszenz-Färbung von Cst (grün) und Mash1 (rot) offenbart die gleichzeitige Expression beider Proteine in den dorsalsten Vorläuferzellen der Mash1-Domäne (Ausschnittsvergrößerung, Pfeilspitzen), durch die Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz erscheinen diese Zellen gelb. (D, I, J) Zusätzlich zur dorsalen Expressionsdomäne von *Cst* (I, Pfeilspitze), ist die Transkription von *Cst* auch in kürzlich gebildeten Neuronen im ventralen Neuralrohr nachweisbar (D, Pfeil, I, Pfeil). (J) zeigt eine Doppel-Färbung der *Cst*-mRNA (blau) und einer Antikörperfärbung gegen BrdU (braun). (N, R) In den Stadien HH20 und HH22 wird *cCst* in dorsalen Vorläuferzellen, überlappend mit den Expressionsdomänen von *Cath1* (K, O) und *Ngn1* (L, P) exprimiert. Die Expressionsdomäne von *cCst* überschneidet sich wahrscheinlich auch mit der dorsalsten Region der *Cash1*-Expression (M, Q). Die Transkription von *cCst* ist ebenfalls in der Mantelzone des Neuralrohres (N, R) und in Motorneuronen (R, Pfeilspitze) detektierbar.

Die korrespondierenden *in situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten von Hühnchenembryonen der Stadien HH20 und HH22 zeigen ein Expressionsmuster von *Cst* (Abb. 11N, R) im Vergleich zu den Markergenen *Cath1* (Abb. 11K, O), *Ngn1* (Abb. 11L, P) und *Cash1* (Abb. 11M, Q), das dem in Mausembryonen entspricht. Dies zeigt, dass *Cst* in den neuronalen Vorläuferzellen dP1 und dP2 exprimiert wird und legt den Schluss nahe, dass sich die *Cst*-Expressionsdomäne auch auf dP3-Vorläuferzellen erstreckt. Außerdem wird für *Cst* im Stadium HH20 ebenfalls eine laterale Expressionsdomäne detektiert (Abb. 11N, Pfeil), die sich in Analogie zum Mausembryo später (HH22) in ventrale Bereiche des Neuralrohres zurückzieht. Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse auf eine evolutionär konservierte Expression von *Cst* in neuronalen Vorläuferzellen im dorsalen Neuralrohr und in jüngst gebildeten Neuronen in ventralen Bereichen schließen.

3.2 Funktion von *Cst* während der Musterbildung im Rückenmark

Schon in vorhergehenden Studien wurde, um Hinweise auf die Funktion von *Cst* im dorsalen Neuralrohr zu erhalten, der Einfluss einer ektopischen Expression von *Cst* auf die Musterbildungs- und Differenzierungsprozesse im Neuralrohr untersucht. Dafür wurde ein, für 986 AS kodierendes Fragment einer *Cst*-cDNA der Maus (RIKEN-EST-Klon *Gene accession number* BB026049) in den Expressionsvektor pCS2+MT inseriert und zur *in ovo* Elektroporation in Hühnchenembryonen verwendet. Als Ergebnis dieser Experimente wurde zum einen festgehalten, dass *Cst* in der Lage ist, Vorläuferzellen zu veranlassen aus dem Zellzyklus auszutreten und zu differenzieren. Im Weiteren wurde gezeigt, dass durch die ektopische Expression des *Cst*-Fragmentes keine zusätzliche Bildung von dI 2, 3, 4 oder 6-Interneuronen hervorgerufen wird (le Viseur, 2002).

Nach der Veröffentlichung dreier weiterer *Cst*-cDNA tragender EST-Klone (*Gene accession numbers* AK048565, BB807051, AV242702) konnte durch Sequenzanalysen gezeigt werden, dass mehrere alternative Spliceprodukte sowohl für den 5'-, als auch den 3'-Bereich der *Cst*-cDNA möglich sind (persönliche Mitteilung Dr. T. Theil), daneben aber ein Stopp-Kodon in der von le Viseur verwendeten Sequenz nicht verifiziert werden konnte. Für weiterführende Experimente wurde aus den zur Verfügung stehenden EST-Klonen eine Sequenz kombiniert, die für ein *Cst*-Protein kodiert, das 1166 AS umfasst und die fünf bereits beschriebenen *Cst*-Motive (1.4) enthält.

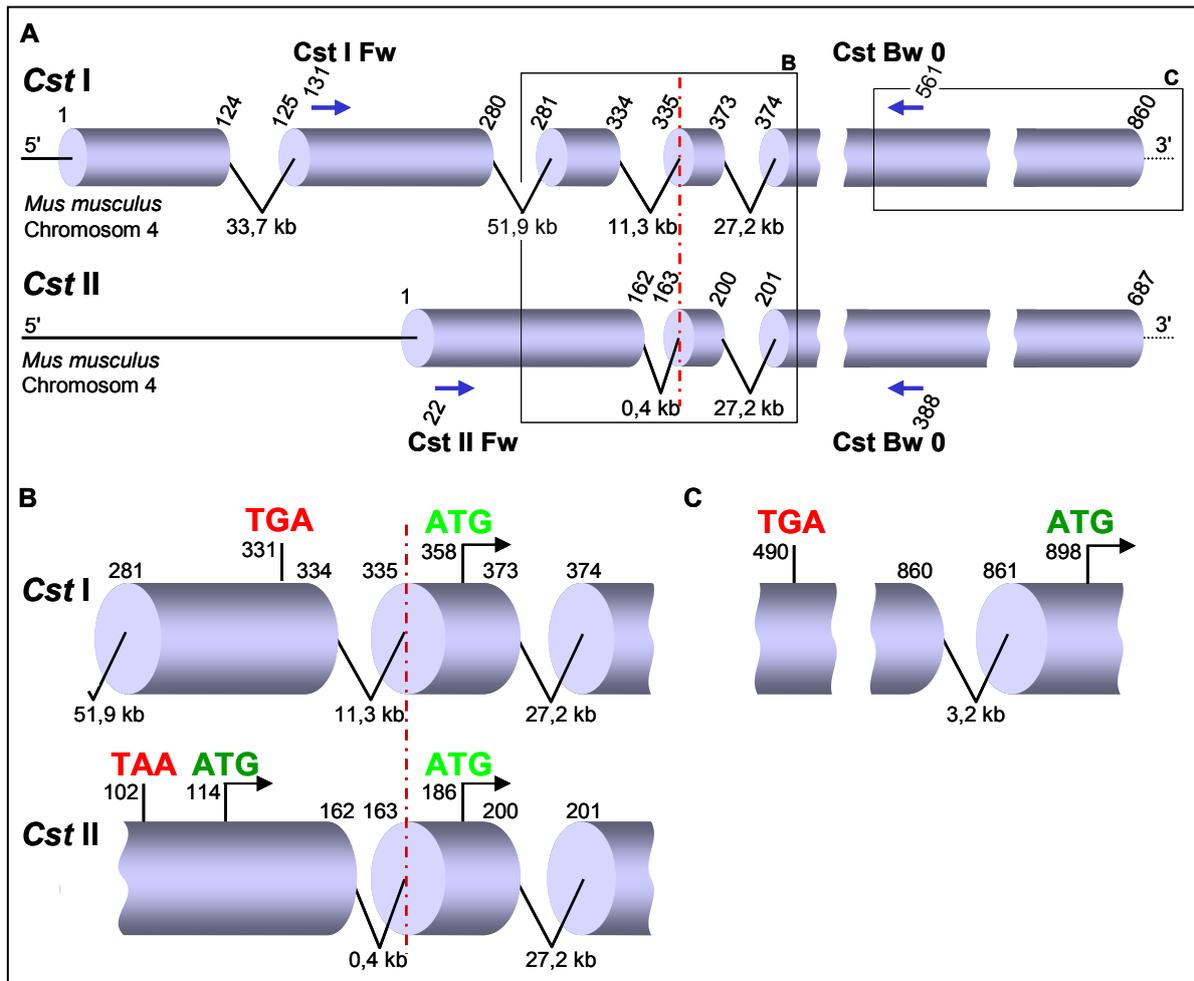


Abb. 12: Cst I und Cst II stellen alternative Spliceprodukte dar.

(A-C) Die Abbildung zeigt schematisch verschiedene Möglichkeiten der Exon-Intron-Struktur des *Cst*-Gens auf Chromosom 4 der Maus, abgeleitet aus dem Vergleich der cDNA-Sequenzen unabhängiger EST-Klone mit der Sequenz genomischer DNA. Exone sind jeweils als Zylinder, Introns als Linie nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Nummerierung der Exongrenzen bezieht sich auf die Sequenzpositionen der cDNA der verschiedenen EST-Klone, die Größe der Introns ist in kb angegeben. (A) Die Sequenzvarianten *Cst I* und *Cst II* unterscheiden sich in ihrem Exon-Intron-Muster im 5'-Bereich bis zur angegebenen Markierung (rote, gestrichelte Linie). Ab der Markierung sind die Sequenzen identisch. Die blauen Pfeile markieren die Positionen der sequenzspezifischen Oligonukleotide *Cst I Fw*, *Cst II Fw* und *Cst Bw 0*, für den spezifischen Nachweis von *Cst I* und *Cst II* mittels RT-PCR. (B) Ausschnittsvergrößerung der beiden Sequenzen *Cst I* und *Cst II*. Gezeigt sind die für die Translation relevanten Start (ATG, hell-, dunkelgrün)- und die vorhergehenden Stopp-Kodons (TGA, TAA, rot). Im 5'-Bereich weist die *Cst II*-Sequenz ein zusätzliches Start-Kodon (dunkelgrün) auf, dass den Leserahmen um 72 Basen im Vergleich zur *Cst I*-Sequenz erweitert. (C) Die von le Viseur verwendete Sequenz beinhaltet im Vergleich zu *Cst I* ein zusätzliches Stopp-Kodon (TGA, rot) und das translationsrelevante Start-Kodon (ATG, dunkelgrün) befindet sich damit im Gegensatz zu *Cst I* erst 540 Basen später im folgenden Exon.

Diese, im folgenden *Cst I* genannte Sequenz ergänzt die in der Arbeit von le Viseur verwendete nun um 180 AS im 5'-Bereich. Eine Zusammenstellung der *Cst I*- und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz befindet sich im Anhang (7.2.1). In Abb. 12 sind zum Vergleich schematische Ausschnitte der in dieser Arbeit verwendeten Sequenz (*Cst I*), exemplarisch eine weitere *Cst*-mRNA (*Cst II*) des 5'-Bereiches (Abb. 12A, B) und ein Ausschnitt der von le

Viseur verwendeten Sequenz (Abb. 12C) in Form eines Exon-Intron-Modelles dargestellt. Die Sequenzen *Cst I* und *Cst II* unterscheiden sich wie in Abb. 12A gezeigt zum Teil im 5'-Bereich ihrer Exon-Intron-Struktur, sind aber ab der markierten Position (Abb. 12A, B rote, gestrichelte Linie) identisch. Nahe dieser Position befindet sich entsprechend auf beiden dargestellten Sequenzen auch das gleiche Start-Kodon (ATG, hellgrün) für die Translation des *Cst*-Proteins mit einer Länge von 1166 AS (Abb. 12B). Neben den vorausgehenden Stopp-Kodons (TGA, TAA, rot) ist in Abb. 12B auch ein alternatives Start-Kodon (ATG, dunkelgrün) der *Cst II*-Sequenz dargestellt, dass den Leserahmen im Vergleich zur *Cst I*-Sequenz um 72 Basen erweitern würde. Dagegen zeigt Abb. 12C anhand von *Cst I* den Abschnitt der von le Viseur verwendeten Sequenz, in dem das offene Leseraster durch ein weiteres Stopp-Kodon (TGA, rot) unterbrochen wird und dadurch im Vergleich zu *Cst I* die Translation erst 540 Basen (ATG, dunkelgrün) später beginnt.

Die zusätzlich in Abb. 12A mit blauen Pfeilen gekennzeichneten Positionen der beiden Sequenzen zeigen Bindestellen für unterschiedliche Oligonukleotide (*Cst I* Fw, *Cst II* Fw, *Cst Bw 0*) mit denen im Folgenden spezifisch beide Sequenzvarianten unabhängig voneinander nachgewiesen werden sollten. Das in den beiden Oligonukleotidpaaren *Cst I* Fw/*Cst Bw 0* und *Cst II* Fw/*Cst Bw 0* verwendete 3'-Oligonukleotid *Cst Bw 0* bindet in einem Sequenzabschnitt, der wie dargestellt (Abb. 12A) für beide *Cst*-Varianten identisch ist. Die Bindestellen der beiden unterschiedlichen 5'-Oligonukleotid *Cst I* Fw und *Cst II* Fw wurden hingegen so gewählt, dass sie in nicht übereinstimmenden Exonsequenzen liegen, diese Oligonukleotide also dazu verwendet werden können, spezifisch die verschiedenen *Cst*-mRNAs zu detektieren. Zur Verifizierung, dass diese *Cst I*-Sequenz tatsächlich so in Mausembryonen als mRNA existent ist, wurde die Gesamt-RNA von Embryonen der Stadien E10,5 und E11,5 mittels RT-PCR analysiert. Dafür wurden im folgenden Mausembryonen der Stadien E10,5 und E11,5 isoliert (2.6.1), die Gesamt-RNA präpariert (2.3.1), mittels reverser Transkription (RT, 2.2.17) in cDNA umgeschrieben und diese in eine PCR-Analyse (2.2.16) mit den beschriebenen spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Für das mit dem Oligonukleotidpaar *Cst I* Fw/*Cst Bw 0* synthetisierte Amplifikat der *Cst I*-Sequenz wurde eine Länge von 430 bp erwartet. Das Oligonukleotidpaar *Cst II* Fw/*Cst Bw 0* sollte ein Amplifikat der *Cst II*-Sequenz mit einer von Länge 370 bp generieren. Abb. 13 zeigt die PCR-Produkte der verschiedenen Ansätze nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.2.8) und bestätigt, dass sowohl die für die vorliegende Arbeit im weiteren relevante *Cst I*-Sequenz als auch die *Cst II*-Variante in den Embryonalstadien E10,5 und E11,5 endogen als mRNA vorhanden sind.

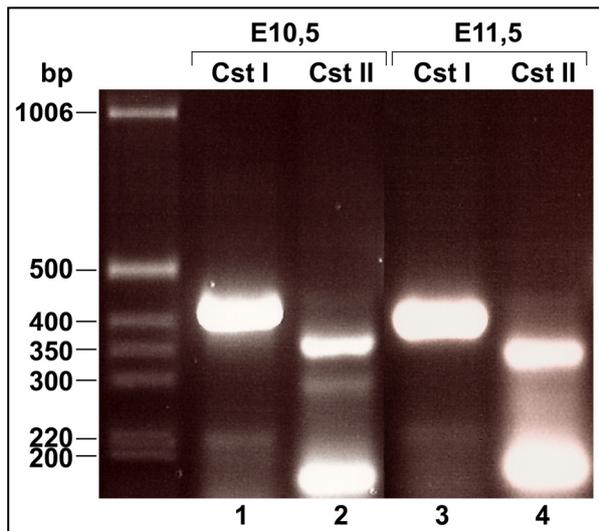


Abb. 13: RT-PCR zur Verifizierung der Cst I-mRNA.

Dargestellt ist das Ergebnis einer RT-PCR mit den für die Cst I- und Cst II-mRNA spezifischen Oligonukleotiden Cst I Fw/Cst Bw 0 und Cst II Fw/Cst Bw 0. Die Spuren 1 und 3 enthalten das Cst I-spezifische PCR-Produkt mit einer Länge von 430 bp, die Spuren 2 und 4 zeigen das Cst II-spezifische PCR-Produkt mit einer Länge von 370 bp für die Stadien E10,5 (Spuren 1, 2) und E11,5 (Spuren 3, 4). Die RT-PCR dient als Nachweis für eine bestimmte Variante des 5'-Bereiches der Cst-mRNA in der Gesamt-RNA von Mausembryonen definierter Stadien. Die Amplifizierung von genomischer DNA kann wegen der Intronumspannenden Verteilung der spezifischen Oligonukleotide ausgeschlossen werden.

Die für fünf Cst-Motive und 1166 AS kodierende Region der bestätigten Cst I-Sequenz wurde nun ebenfalls in den bereits von le Viseur (2002) verwendeten Expressionsvektor pCS2+MT kloniert und zur Charakterisierung der Funktion von Cst zur *in ovo* Elektroporation von Hühnchenembryonen eingesetzt. Der pCS2+MT-Vektor (Abb. 14) enthält einen Cytomegalus-Virus (CMV)-Promotor, der eine hohe Expressionsrate in jeder Zelle sicherstellt, eine für sechs Epitope des humanen bHLH-Leuzin-Zipper-Proteins c-Myc kodierende Sequenz und eine SV40 polyA-Region. Weiterhin befindet sich auf dem Plasmid ein Ampicillinresistenz-Gen zu Selektionszwecken und eine *multiple cloning site* (MCS), in die Sequenzen so gerichtet inseriert werden können, dass aus der Promotor-kontrollierten Expression Fusionsproteine mit N-terminalen cMyc-Epitopen resultieren. So wird erreicht, dass die Fusionsproteine nach der Expression in Geweben mit, gegen das cMyc-Epitop gerichteten, kommerziell erhältlichen Antikörpern detektiert werden können. Die Klonierungsstrategie für die Insertion der Cst-Sequenz wurde unter Berücksichtigung des, durch die cMyc-Epitop-Sequenzen bereits vorgegebenen, offenen Leserahmens erstellt.

Die Region des Translation-Startkodons wurde dafür mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide Cst Fw 18 und Cst Bw 6 (Tabelle 1) amplifiziert und durch die Oligonukleotid-immanenten Restriktionsschnittstellen so modifiziert, dass dieses mit *EcoRI/BamHI* (358-651) geschnittene PCR-Produkt zusammen mit einem 2,4 kb langen *BamHI/NotI* (651-3005) und einem 1,2 kb umfassenden *NotI/AvrII* (3005-4228) Fragment der Cst-cDNA in den mit *EcoRI/XbaI* geöffneten Vektor unter Einhaltung des offenen Leserahmens kloniert werden konnte. Die Angaben in den Klammern beziehen sich auf die Position der Nukleotide in der Cst I-Sequenz (7.2.1). In Abb. 15 ist schematisch das Klonierungsprodukt der verknüpften

cMyc und Cst kodierenden Sequenzen dargestellt, aus dem nach Promotor-gesteuerter Expression und anschließender Translation ein Myc-Cst-Fusionsprotein resultiert.

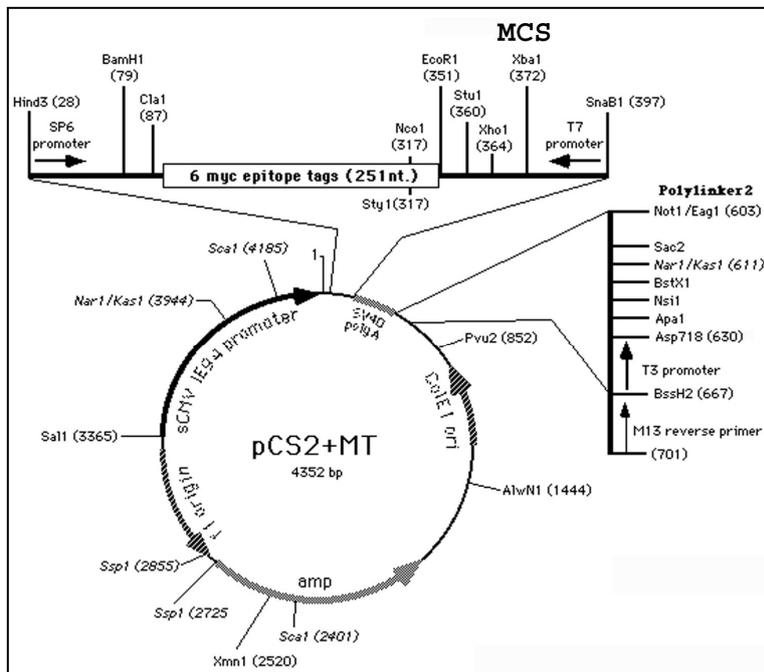


Abb. 14: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCS2+MT.

Das Plasmid enthält einen CMV-Promotor, eine für sechs cMyc-Epitope kodierende Sequenz, eine *multiple cloning site*, eine SV40 polyA-Sequenz und ein Ampicillin-resistenz-Gen. Die Cst-cDNA wurde unter Fortführung des offenen Leserahmens der cMyc-Epitope zwischen die Schnittstellen von EcoRI und XbaI inseriert. (Quelle: modifiziert, nach Laboratory of Randall Moon, University of Washington, Howard Hughes Medical Institute, Department of Pharmacology)

Im Folgenden sollen Überexpressionsstudien in Form von *in ovo* Elektroporationsexperimenten (2.5) mit dem neuen cMyc-Cst-Konstrukt weiterführende Einblicke in die Funktion von Cst im dorsalen Neuralrohr geben. Die Methode der *in ovo* Elektroporation nach Maramatsu *et al.*, 1997 ermöglicht grundsätzlich die Manipulation der Genexpression während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Geweben des Huhns. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in ovo* Elektroporation dazu eingesetzt Neuralrohrzellen mit Expressionsplasmiden zu transfizieren, die neben ausgesuchten Gensequenzen transkriptionsrelevante regulatorische Elemente tragen und eine zellautonome Expression der eingeführten Gensequenz induzieren.

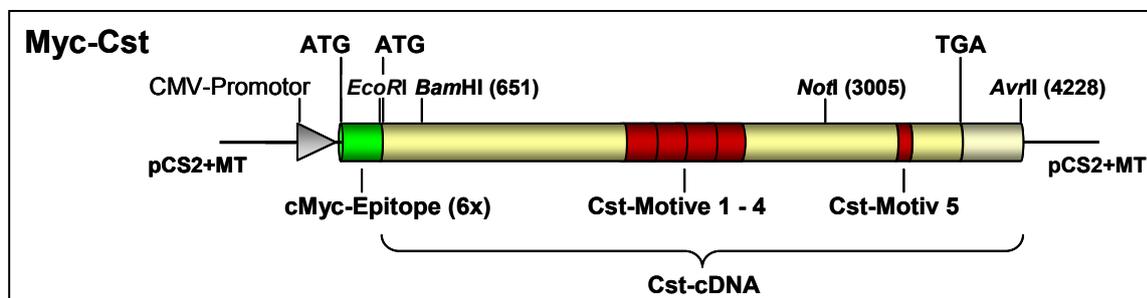


Abb. 15: Schematische Darstellung des Myc-Cst-Konstruktes.

Markiert sind die Positionen des CMV-Promotors, der Cst-cDNA, der für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, die Start-Kodons (ATG) der cMyc-Epitope und Cst sowie dessen Stopp-Kodon (TGA). Das Cst-Start-Kodon wurde nur zum Erhalt der vollständigen für fünf Cst-Motive kodierenden Sequenz berücksichtigt und ist durch die vorangestellten ATGs der cMyc-Sequenz für die Translation des cMyc-Cst-Fusionsproteins ohne Relevanz.

Dazu wird die Plasmid-DNA in das Lumen des Neuralrohres injiziert und der Embryo danach einem elektrischen Feld ausgesetzt. Dadurch wird erreicht, dass Zellmembranen kurzfristig so permeabel werden, dass die DNA von den an das Lumen des Neuralrohres grenzenden Zellen aufgenommen werden kann. Zudem wird der Embryo so in dem elektrischen Feld positioniert, dass die partiell negativ geladenen DNA jeweils nur in Zellen einer, nämlich der Anode zugewandten Seite des Neuralrohres eindringt. Da die Zellen der zur Kathode gelegenen Seite hingegen keine Plasmid-DNA aufnehmen, bietet diese Versuchsanordnung den Vorteil, dass im Rahmen eines Experimentes innerhalb desselben Organismus auch eine gleichbehandelte wildtypische Kontrolle zum direkten Vergleich vorliegt.

Die fortschreitende Entwicklung im frühen dorsalen Neuralrohr wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren gesteuert, die auch grundlegende Proliferations- und Differenzierungsprozesse aufeinander abstimmen und regulieren. Wie bereits gezeigt (3.1), wird *Cst* zusammen mit den, Differenzierung induzierenden, basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren *Math1*, *Mash1* (Nakada *et al*, 2004), (Cai *et al*, 2000, Farah *et al*, 2000) und *Ngn1/2* (Helms *et al*, 2003, Sun *et al*, 2001) in den neuronalen Vorläuferzellen dP1-dP3 exprimiert. Daraus ergibt sich die Frage, ob auch *Cst* das Potential hat, auf Proliferations- oder Differenzierungsmechanismen Einfluss zu nehmen. Erste Hinweise auf die Funktion von *Cst* gibt die Arbeit von le Viseur, in der festgestellt wurde, dass es sich bei Zellen mit ektopischer Expression eines ähnlichen Myc-Cst-Konstruktes (s.o.) um differenzierte Neuronen handelt (le Viseur, 2002), die sich in der Mantelzone des Neuralrohres befinden. Folgende Überexpressionsanalysen sollen nun genaueren Aufschluss über das Schicksal Myc-Cst exprimierender Zellen geben. In diesen Experimenten wurde das Expressionsplasmid (Abb. 15) mittels der *in ovo* Elektroporation (2.5) in Zellen des Neuralrohres von Hühnerembryonen in einem Entwicklungsstadium zwischen HH10 und HH12 eingeschleust. Kurz vor der Isolierung der Embryonen 24 h bzw. 48 h nach der Elektroporation wurden diese mit BrdU behandelt (2.5.1.1). BrdU wird nur während der S-Phase der Mitose als Thymidin-Analogon bei der DNA-Replikation eingebaut und kann durch einen spezifischen Antikörper (α -BrdU) detektiert werden. Durch das eng vorgegebene Zeitfenster von 2 h in denen Zellen BrdU aufnehmen und einbauen können, werden im Neuralrohr ausschließlich akut proliferierende Zellen und damit die basale Seite der ventrikuläre Zone markiert. Nach der Isolierung wurden die Embryonen für Antikörperfärbungen auf Kryoschnitten (2.8.1) aufbereitet. Die Verwendung von Erst-Antikörpern aus unterschiedlichen Spezies (Tabelle 4) und Fluoreszenz-Farbstoffgekoppelter Zweit-Antikörper (Tabelle 5) ermöglicht, dass nach der Anregung mit Licht definierter Wellenlängen, auf einem Präparat mehrere verschiedene Antigen-Antikörper-

Komplexe durch ihre unterschiedlichen Fluoreszenzfarben gleichzeitig nachgewiesen werden können. Befinden sich darüber hinaus die unterschiedlich z.B. grün und rot fluoreszierenden Komplexe in geringer räumlicher Entfernung zueinander überlagert sich die emittierende Strahlung zu einer weiteren Farbvariante, im genannten Beispiel zu gelb.

Bei in dieser Arbeit durchgeführten *in ovo* Elektroporationen wurde neben dem bereits vorgestellten Myc-Vektor u.a. auch das Expressionsplasmid pCAGGS (Abb. 16) verwendet. Dieses enthält nach einem CMV-Enhancer, β -Actin-Promotor und einer MCS eine IRES (*internal ribosomal entry site*)-Sequenz vor einem Abschnitt, der für ein kernlokalisiertes GFP (grün fluoreszierendes Protein) kodiert. Wird in die MCS eine weitere kodierende Sequenz vor der des GFP eingefügt, ermöglicht das IRES-Element die Translation beider Proteine von nur einem Transkript. Die Expression des *downstream* gelegenen GFP als Folge der *in ovo* Elektroporation dient zum einen zur Detektion der Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben und nun ektopisch exprimieren und unterstützt zusätzlich die Annahme, dass die Transkription beider Gene erfolgreich war. Die grüne Fluoreszenz des GFP kann durch die Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge gleich einem mit Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten Antikörper leicht detektiert werden. Der leere pCAGGS-Vektor, ohne zusätzliche kodierende Sequenz wurde im folgenden Experiment zur Kontrolle eingesetzt, um eventuell auftretende, elektroporationsbedingte Artefakte auszuschließen.

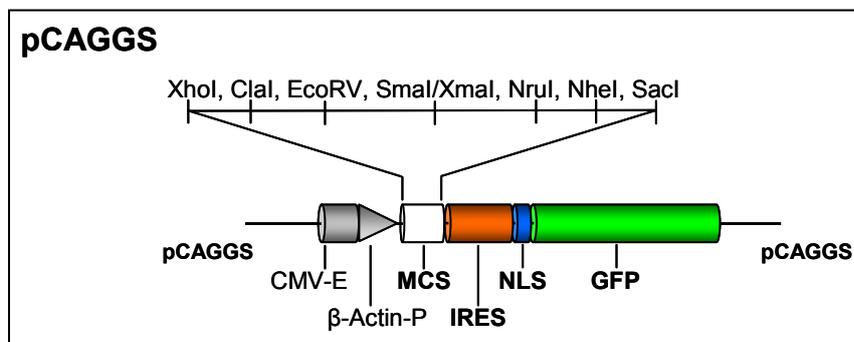


Abb. 16: Schematische Darstellung des pCAGGS (IRES-GFP)-Vektors.

Dargestellt sind der CMV-Enhancer (CMV-E), der β -Actin-Promotor (β -Actin-P), die *multiple cloning site* (MCS), das IRES (*internal ribosomal entry site*)-Element, die Kernlokalisierungssequenz (NLS) und die für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) kodierende Sequenz des pCAGGS-Expressionsplasmides. In die MCS kann eine zweite kodierende Sequenz vor die des GFPs inseriert werden. Das IRES-Element ermöglicht die Translation beider Proteine von nur einem Transkript.

In Abb. 17 sind die Ergebnisse der *in ovo* Elektroporation mit Myc-Cst dargestellt. In dieser und allen folgenden Abbildungen transversaler Neuralrohrschnitte elektroporierter Embryonen zeigt die linke Seite des Neuralrohres immer die ektopische Expression des eingeschleusten Konstruktes, während die rechte Seite nur das wildtypisch Expressionsmuster endogener

Markergene repräsentiert. 24 h nach der Elektroporation (nE) (Abb. 17A, E) befinden sich die Embryonen in ihrer Entwicklung zwischen Stadium HH16 und HH18 und die durch BrdU markierte ventrikuläre Zone nimmt zu diesem Zeitpunkt noch fast die gesamte Breite des Neuralrohres ein.

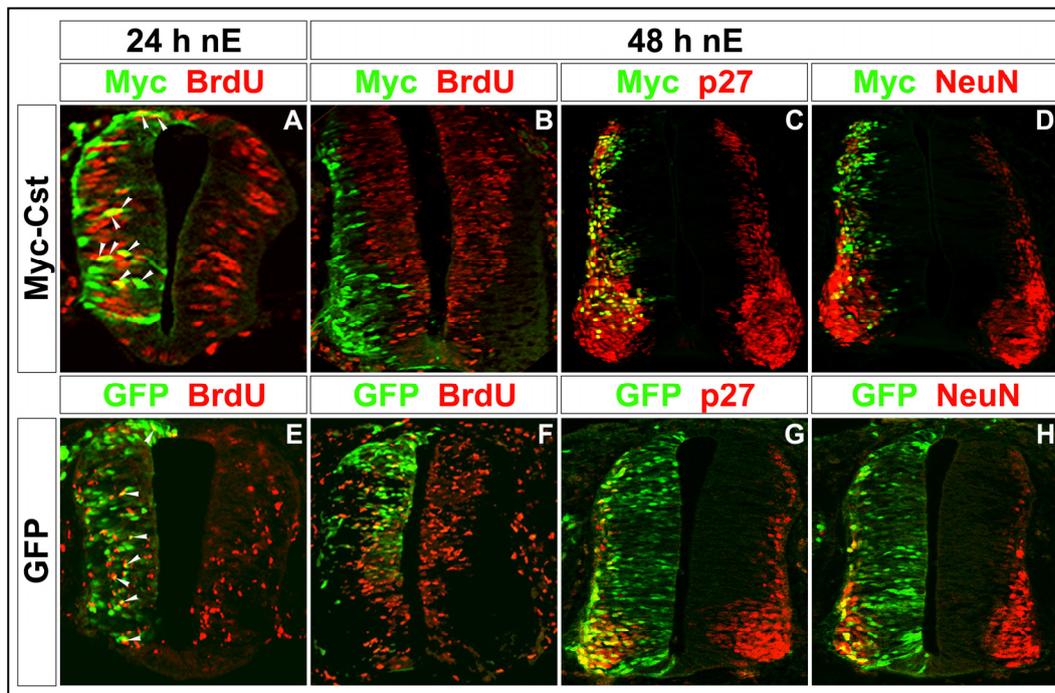


Abb. 17: Cst induziert Differenzierung.

Die Abbildung zeigt transversale Kryostatschnitte (20 µm) von Embryonen des Stadiums HH18 (A, E) und HH20-HH22 (B-D, F-H) 24 h bzw. 48 h nach der Elektroporation (nE) mit Myc-Cst (A-D) oder GFP (E-H). Es wurden Antikörperfärbungen gegen Myc (A-D, grün), BrdU (A, B, E, F, rot), p27 (C, G, rot) und NeuN (D, H, rot) durchgeführt. 24 h nE sind sowohl Myc⁺ (A) als auch GFP⁺ Zellen (E) über die gesamte Breite der elektroporierten Seite des Neuralrohres detektierbar, darunter jeweils auch einige proliferierende Zellen; die zusätzlich BrdU⁺ sind (Pfeilspitzen). 48 h nE befindet sich im Gegensatz zu GFP⁺ (F) keine Myc⁺ Zellen (B) mehr in der durch BrdU markierten ventrikulären Zone. Anders als bei der gleichmäßigen Verteilung GFP exprimierender Zellen (G, H) zwischen ventrikulärer und Mantelzone, befinden sich die meisten Myc⁺ Zellen in der Mantelzone und exprimieren die neuronalen Marker p27 (C) und NeuN (D).

Wie die Antikörperfärbung gegen Myc (grün) und BrdU (rot) in Abb. 17A zeigt, befinden sich 24 h nE Myc-Cst exprimierende Zellen (Myc⁺, grün) sowohl im lateralen Bereich des Neuralrohres, außerhalb der durch BrdU markierten ventrikulären Zone als auch noch nahe des Lumens und sind zum Teil BrdU positiv (BrdU⁺, rot, Myc⁺/BrdU⁺, gelb, Pfeilspitzen). Dies bedeutet, dass sich die letztgenannten Zellen sicher in einem proliferierenden Zustand befinden. Eine ähnliche Verteilung ergibt auch die in Abb. 17E dargestellte Elektroporation mit dem GFP-Kontrollplasmid. Hier können ebenfalls zum einen Zellen detektiert werden, die sich außerhalb der ventrikulären Zone oder nahe des Lumens befinden und nur GFP (grün) exprimieren oder in der VZ liegen und gleichzeitig BrdU⁺ (BrdU⁺, rot, GFP⁺/BrdU⁺, gelb, Pfeilspitzen) sind.

48 h nE (HH20-HH22) gibt es jedoch keine Hinweise mehr auf einen proliferierenden Status von Myc^+ -Zellen, da keine $\text{Myc}^+/\text{BrdU}^+$ -Zellen mehr detektierbar und alle Myc-Cst exprimierenden Zellen lateral zur ventrikulären Zone, in der Mantelzone lokalisiert sind (Abb. 17B). Dies steht klar im Gegensatz zu der weiterhin gleichmäßigen Verteilung der GFP^+ -Zellen über die gesamte Breite der elektroporierten Seite des Neuralrohrs, von Bereichen nahe des Lumens bis zur Mantelzone, auch 48 h nE (Abb. 17F). Die Position der Myc^+ -Zellen lateral der ventrikulären Zone und die Beobachtung, dass alle Myc-Cst exprimierenden Zellen BrdU negativ (BrdU^-) sind, deutet darauf hin, dass es sich um postmitotische Neuronen handelt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Antikörperfärbungen gegen p27 und NeuN durchgeführt. p27 ist ein Zellzyklusgen, das für ein Cdk-inhibierendes Protein (CIP) kodiert (Polyak *et al.*, 1994). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der neuronalen Differenzierung und dient als Marker für postmitotische Neuroepithel-Zellen sowie differenzierte Neuronen (Levine *et al.* 2000, Dyer *et al.* 2001, Li *et al.* 2002). NeuN wird ebenfalls in differenzierten Neuronen (Mullen *et al.* 1992) jedoch später als p27 exprimiert. Doppelfärbungen gegen Myc und p27 (Abb. 17C) oder NeuN (Abb. 17D) ergeben nun, dass die meisten Myc-Cst exprimierenden Zellen tatsächlich auch p27^+ oder NeuN^+ sind, während nur ein geringer Anteil der GFP^+ -Zellen diese Marker differenzierter Neuronen exprimiert (Abb. 17G, H). Ein Unterschied in der Expression der betrachteten Marker p27 und NeuN zwischen der linken Seite des Neuralrohres mit ektopischer Expression der eingeschleusten Plasmide und der wildtypischen rechten Hälfte wurde sowohl 24 h als auch 48 h nE weder für GFP noch für Myc-Cst elektroporierte Embryonen festgestellt. Da die Elektroporation des Kontrollplasmids pCAGGS keinen Einfluss auf Proliferations (BrdU)- oder Differenzierungsprozesse (p27, NeuN) hat, kann angenommen werden, dass durch GFP^+ -Zellen die normale Verteilung von Zellen zwischen der ventrikulären und Mantelzone des Neuralrohres 24 h bzw. 48 h nach einer Elektroporation widergespiegelt wird. Somit ist das Phänomen, dass sich alle Myc^+ -Zellen 48 h nE lateral der ventrikulären Zone befinden, eindeutig auf die ektopische Expression von Myc-Cst zurückzuführen. Dies bedeutet, dass durch die Expression von Cst die frühzeitige neuronale Differenzierung proliferierender Vorläuferzellen gefördert wird.

3.3 Einfluss von Cst auf die Subtypspezifizierung von Neuronen des Rückenmarks

Endogen wird Cst in dorsalen Vorläuferzellen bestimmter Populationen (dP1-dP3) exprimiert, aus denen verschiedene neuronale Subtypen mit unterschiedlicher Spezifität hervorgehen. Die

ektopische Expression von Myc-Cst fördert zudem frühzeitig die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen, was dazu führt, dass 48 h nE Myc⁺-Zellen nicht mehr in proliferierenden Zellen, sondern ausschließlich außerhalb der ventrikulären Zone detektiert werden. Aus diesen Beobachtungen kann die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Cst auch einen Einfluss auf die Spezifizierung neuronaler Subtypen haben könnte. Zur Beantwortung dieser Frage und zur weiteren Charakterisierung der Funktion von Cst wurden 48 h nach der *in ovo* Elektroporation mit Myc-Cst *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen auf Kryo- und Paraffinschnitten gegen spezifische endogene Marker der verschiedenen Typen dorsaler und ventraler Inter- bzw. Motoneuronen angefertigt. Die Expression des Markers *Lh2b* ist charakteristisch für dI1-Interneuronen (Lee *et al.*, 2000), *Lim1/2* kennzeichnet die dorsalen und ventralen Interneuronen dI2, dI4, dI6 und V0 bis V2 (Gowan *et al.*, 2001) und *Isl1/2* (*Islet*) wird nur in den dorsalen Interneuronen dI3 sowie in Motoneuronen exprimiert (Ericson *et al.*, 1992). Typisch für die ventralen Neuronen V1 und V2 ist die jeweilige Expression von *En1* (*Engrailed*) bzw. *Chx10* (*Chox*) (Ericson *et al.*, 1997) und die Expression von *MNR2* ist spezifisch für Motoneuronen.

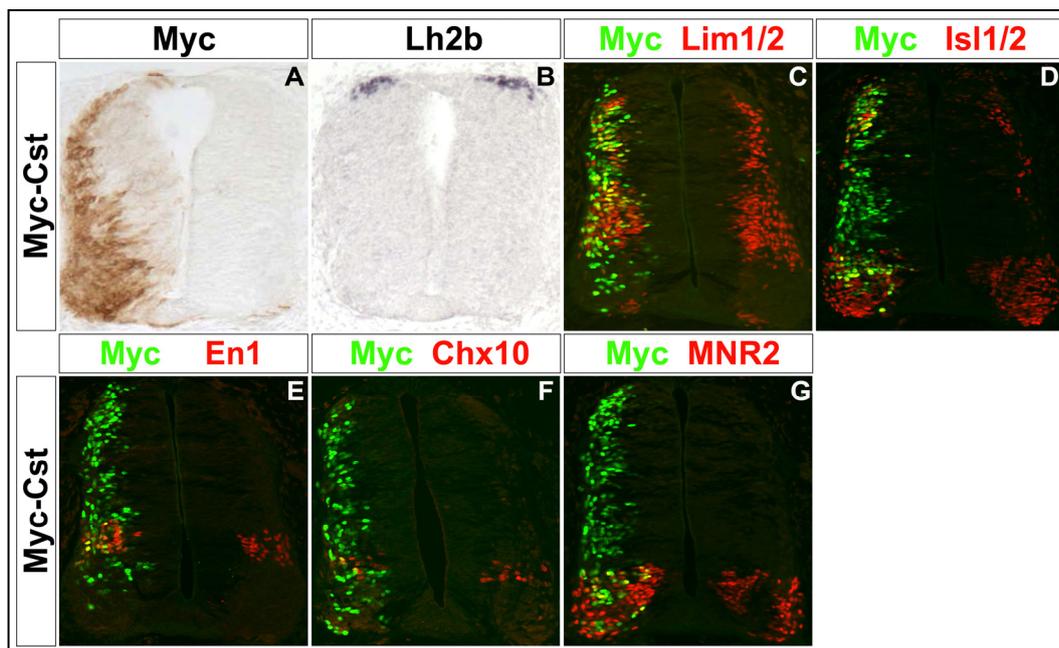


Abb. 18: Cst hat keinen Einfluss auf die Subtypspezifizierung von Interneuronen des Rückenmarks.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffin- und Kryostatschnitte (14 μ m bzw. 20 μ m) von Embryonen des Stadiums HH22 48 h nE mit Myc-Cst. Es wurden *in situ* Hybridisierungen gegen *Lh2b* (B, blau, dI1) und Antikörperfärbungen gegen Myc (A, braun, C-G, grün), *Lim1/2* (C, rot, dI2, dI4, dI6, V0-V2), *Isl1/2* (D, rot, dI3, MN), *En1* (E, rot, V1), *Chx10* (F, rot, V2) und *MNR2* (G, rot, MN) durchgeführt. Nach der Elektroporation sind Myc⁺-Zellen über die gesamte Länge der dorso-ventralen Achse der elektroporierten Seite des Neuralrohres detektierbar. Innerhalb einer jeden Markerdomäne sind doppelt positive Zellen nachweisbar, wobei die Expressionsmuster der einzelnen Marker zwischen der elektroporierten (linken) und der wildtypischen (rechten) Seite des Neuralrohres keine Unterschiede aufweisen.

48 h nach der Elektroporation von Myc-Cst sind Myc⁺-Zellen durchgängig über die gesamte Länge der dorso-ventralen Achse der elektroporierten Seite des Embryos (Abb. 18A, C-G) und damit potentiell innerhalb einer jeden Subpopulation von Neuronen, unterscheidbar anhand der jeweiligen Expression der oben genannten Marker (Abb. 18B-G), detektierbar. Tatsächlich können außer für dl1-Interneuronen durch Antikörperfärbungen in jeder einzelnen Domäne differenzierter Neuronen neben ausschließlich subtypspezifisch markierten (rot) oder Myc-Cst exprimierenden Zellen (grün) auch doppelt positive Zellen (Myc⁺/Marker⁺, gelb) nachgewiesen werden. Für den Bereich der dl1-Interneuronen gibt der Vergleich der Expressionsdomänen von Myc-Cst (Abb. 18A) und *Lh2b* (Abb. 18B) auf alternierenden Schnittpräparaten einen Hinweis auf deren gleichzeitige Expression. Die durch die Doppelfärbungen nachgewiesene Koexpression von Myc-Cst und den spezifischen Markern bestätigt noch einmal den differenzierten neuronalen Status der Myc-Cst exprimierenden Zellen 48 h nach der Elektroporation. Wie aber der Vergleich mit der wildtypischen Neuralrohrseite offenbart, bleiben die Expressionsmuster sowohl der betrachteten dorsalen als auch der ventralen Inter- und Motorneuronenmarker trotz der ektopischen Expression von Myc-Cst unverändert. Demnach interferiert die Myc-Cst-Expression nicht mit dem jeweiligen Differenzierungsprogramm des korrespondierenden neuronalen Zelltyps und führt alleine weder zu einer vermehrten Bildung noch zu einer Verringerung eines bestimmten dorsalen oder ventralen Neuronentyps.

Die Ergebnisse dieser *in ovo* Elektroporationsexperimente zeigen also, dass Myc-Cst nach 48 h zwar in einer Vielzahl verschiedener, differenzierter Neuronen exprimiert wird, diese aber unverändert mit dem Differenzierungsprogramm entsprechend ihrer Position auf der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres fortfahren. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression von Cst alleine keinen Einfluss auf die Subtypspezifizierung hat.

3.4 Molekulare Mechanismen der durch Cst induzierten neuronalen Differenzierung

Während der Neurogenese wird durch die sorgfältige Kombination von Proliferations- und Differenzierungsmechanismen erreicht, dass bestimmte unterschiedliche neuronale Subtypen in korrekter Anzahl entstehen. Dazu sind zum einen Faktoren notwendig, die durch die Regulation des Zellzyklus die Menge und die Größe der Vorläuferzellpopulationen kontrollieren und zum anderen solche, die die Differenzierung der Vorläuferzellen in spezifische Neuronen

steuern. Durch die Untersuchung des Einflusses der ektopischen Expression von Myc-Cst auf solche Schlüsselfaktoren kann vielleicht der bereits gezeigte Effekt von Cst, frühzeitig neuronale Differenzierung zu fördern, den Mechanismen der Proliferation und Differenzierung kontrollierenden Prozessen zugeordnet werden.

3.4.1 Einfluss von Cst auf Schlüsselfaktoren der Proliferation und neuronaler Differenzierung

Die Synthesephase (S) und die mitotische Teilung (M) eines Zellzyklus werden durch die Phasen G_1 (M- G_1 -S) und G_2 (S- G_2 -M) voneinander getrennt. Zur Überschreitung bestimmter Kontrollpunkte während der Phasen G_1 und G_2 zur Fortsetzung des Zellzyklus bedarf es der Komplexbildung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CdK) mit verschiedenen Cyclinen. Folglich kann der Zellzyklus und damit die Proliferation auch durch eine Inaktivierung der CdKs unterbrochen werden. Ein solcher Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen ist das bereits erwähnte p27, das somit als ein potentieller Kandidat zu betrachten ist, durch dessen Induzierung andere Faktoren differenzierende Wirkung entfalten können. So fördern proneurale Faktoren wie Math1 oder Ngn1, deren Aktivität zum Austritt der Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus, ihrer Wanderung aus der ventrikulären Zone und neuronaler Differenzierung führt (Cau *et al.*, 2002, Nakada *et al.*, 2004, Parras *et al.*, 2002, Perez *et al.*, 1999), auch die Expression von p27 (Farah *et al.*, 2000).

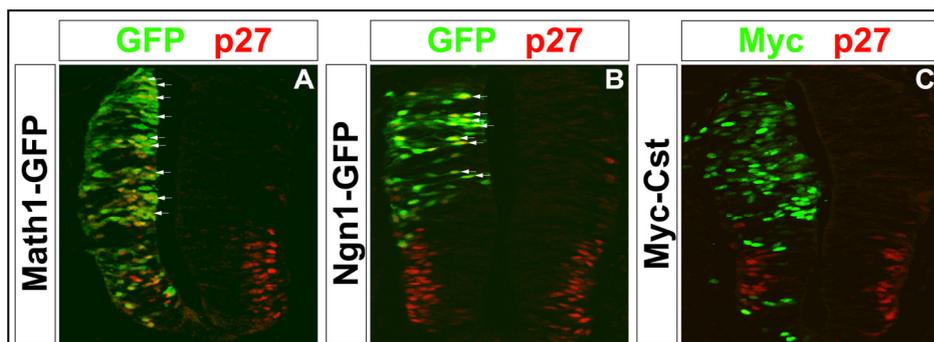


Abb. 19: Induktion von p27 durch Math1 und Ngn1 aber nicht durch Cst.

Die Abbildung zeigt transversale Kryoschnitte (20 μm) von Embryonen des Stadiums HH17 24 h nE mit Math1-GFP (A), Ngn1-GFP (B) und Myc-Cst (C). Es wurden Antikörperfärbungen gegen p27 (A-C, rot) und Myc (C, grün) durchgeführt, GFP (grün) repräsentiert die Math1 (A) bzw. Ngn1 (B) exprimierenden Zellen. Das zu diesem Zeitpunkt eigentlich erst in wenigen, ventral gelegenen Zellen des Neuralrohres exprimierte p27 wird durch die ektopische Expression von Math1 und Ngn1 auch in weiter dorsal gelegenen Regionen und in der Nähe des Lumens induziert (Pfeile, GFP⁺/p27⁺, gelb). Nach der Elektroporation mit Myc-Cst weist das Expressionsmuster von p27 zwischen der elektroporierten (linken) und der wildtypischen (rechten) Seite des Neuralrohres keine Unterschiede auf. Es werden keine Myc⁺/p27⁺-Zellen detektiert.

Zur Beantwortung der Frage, ob Cst ebenfalls durch die Aktivierung von p27 Differenzierungsprozesse reguliert, wurden schon 24 h nach der ektopischen Expression von Myc-Cst, Math1 (in pCAGGS) und Ngn1 (in pCAGGS) durch *in ovo* Elektroporation Antikörperfärbungen auf Kryoschnitten angefertigt und die Expression von p27 untersucht. Zu diesem Zeitpunkt hat die ektopische Expression sowohl von Math1-GFP (Abb. 19A, grün) als auch Ngn1-GFP (Abb. 19B, grün) bereits zu einer erheblichen Induktion von p27 (rot) im Neuralrohr der elektroporierten Embryonen geführt (Abb. 19A, B, GFP⁺/p27⁺, gelb, Pfeile), so dass auch außerhalb der endogenen Expressionsdomäne von p27 zahlreiche weitere p27⁺-Zellen nachgewiesen werden können. Im Gegensatz dazu wird durch die ektopische Expression von Myc-Cst kein vergleichbarer Effekt hervorgerufen (Abb. 19C). Zum einen bleibt die endogene Expressionsdomäne von p27 unverändert und zum anderen können keine Zellen detektiert werden, die sowohl Myc⁺ als auch p27⁺ sind. Dies zeigt, dass Cst anders als die proneuralen Faktoren Math1 und Ngn1 nicht die Expression von p27 induziert.

Der kontinuierliche Ablauf des Zellzyklusgeschehens ist aber nicht nur durch die Inhibierung der CdKs sondern auch durch Eingriffe in die Expression der an der Komplexbildung beteiligten Cycline zu beeinflussen. Die Cycline lassen sich entsprechend ihres Vorkommens in die zwei Klassen G₁-Phase- und mitotische (G₂) Cycline unterteilen und sind in jedem Zellzyklus einem Kreislauf von Synthese und Degradation unterworfen. Die Analyse von Verlustmutanten und Experimente mit in Kultur gehaltenen Zellen haben u.a. gezeigt, dass ein Funktionsverlust der Gene *CyclinB3* (G₂), D1 und D2 (G₁) zur Folge hat, dass proliferierende Zellen nicht mehr die Mitosephase erreichen (Minshull *et al.*, 1989), den Zellzyklus vorzeitig verlassen und mit der Differenzierung beginnen (Fantl *et al.*, 1999, Fantle *et al.*, 1995, Hu *et al.*, 2001). Dem beobachteten Effekt, dass Cst, in neuronalen Vorläuferzellen Differenzierung induziert, könnte daher eine Inhibierung der Expression von *Cyclinen* zu Grunde liegen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde 24 h nE der Einfluss der ektopischen Expression von Myc-Cst auf die Genexpression von *CyclinB3*, D1 und D2 durch Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse zeigt allerdings, dass die Expressionsmuster der oben genannten *Cycline* unter dem Einfluss von Myc-Cst (Abb. 20A, B und Daten nicht gezeigt) unverändert bleiben.

Andere Faktoren beeinflussen die Entwicklung des Neuralrohres durch die Inhibierung neuronaler Differenzierung. Dazu gehört auch der basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor Hes5. Für Proteine der Hes-Familie sind zurzeit zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen bekannt (Ross *et al.*, 2003). Zum einen binden sie in Form von Homo- oder

Heterodimeren an sequenzspezifische DNA-Elemente, sogenannte N-Boxen (CACNAG), und inhibieren dadurch die Expression von, für neuronale Differenzierung notwendigen, proneuralen Genen wie z.B. *Mash1* (Chen *et al.*, 1997, Davis *et al.*, 2001). Andererseits interagieren Hes-Proteine auch direkt, physikalisch mit proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren. Sie vermitteln unter Beteiligung weiterer Proteine die Bildung eines Repressorkomplexes (Giagtzoglou *et al.*, 2003), der die Expression der Zielgene proneuraler Faktoren und damit deren Fähigkeit, neuronale Differenzierung auszulösen, verhindert (Alifragis *et al.*, 1997, Sasai *et al.*, 1992). Der differenzierungsfördernde Effekt von Cst könnte also durch die Inhibierung der Expression von *Hes5* verursacht werden. Wie in Abb. 20C dargestellt, hat die ektopische Expression von Myc-Cst jedoch keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von *Hes5*.

Ein weiterer Kandidat für die Inhibierung neuronaler Differenzierung im Neuralrohr ist das Helix-Loop-Helix (HLH)-Protein *Id2* (Martinsen *et al.*, 1998). Für die Wirkungsweise der Faktoren der *Id*-Familie sind ebenfalls mehrere Mechanismen beschrieben. Den HLH-Proteinen fehlt ein Bereich basischer Aminosäuren, der für eine Bindung an DNA notwendig wäre, und als solche bilden sie mit bHLH-Transkriptionsfaktoren Heterodimere (Jen *et al.*, 1997), die folglich nicht an DNA binden können. Darüber hinaus inhibieren *Id*-Proteine neuronale Differenzierung, indem sie mit E-Proteinen Dimere bilden, die als Kofaktoren für proneurale bHLH-Proteine zur Aktivierung der Transkription ihrer Zielgene essentiell sind (Norton, 2000). Andererseits unterstützen Mitglieder der *Id*-Familie die Fortsetzung der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen, indem sie Faktoren der Retinoblastoma (*Rb*)-Gruppe inhibieren und dadurch die Aktivierung Zellzyklus fördernder Genen ermöglichen (Iavarone, *et al.*, 1994). Eine Veränderung des Expressionsmusters von *Id2* durch die ektopische Expression von Myc-Cst, die den positiven Einfluss von Cst auf die Differenzierung erklären könnte, wurde nicht beobachtet (Abb. 20D). Somit ist der Differenzierungseffekt von Cst nicht auf eine Reprimierung der Expression von *Hes5* oder *Id2*, zurückzuführen.

Zur weiteren Klärung, wie Cst Differenzierung induziert, wird im Folgenden die Wirkung der ektopischen Myc-Cst Expression auf das Expressionsverhalten proneuraler Gene wie *Ngn1* oder *Cash1*, die für die neuronale Differenzierung von Vorläuferzellen im dorsalen Neuralrohr sowohl notwendig als auch hinreichend sind (Bertrand *et al.*, 2002), untersucht. Denkbar ist, dass Cst die Expression proneuraler Gene verstärkt und auf diesem Weg aktiv Differenzierungsprozesse unterstützt. Diese Annahme kann jedoch nicht durch *in ovo* Elektroporationsexperimente und anschließende *in situ* Hybridisierung bestätigt werden, da die ektopische

Expression von Myc-Cst keine Veränderung im Expressionsmuster von *Ngn1* oder *Cash1* verursacht (Abb. 20E und Daten nicht gezeigt).

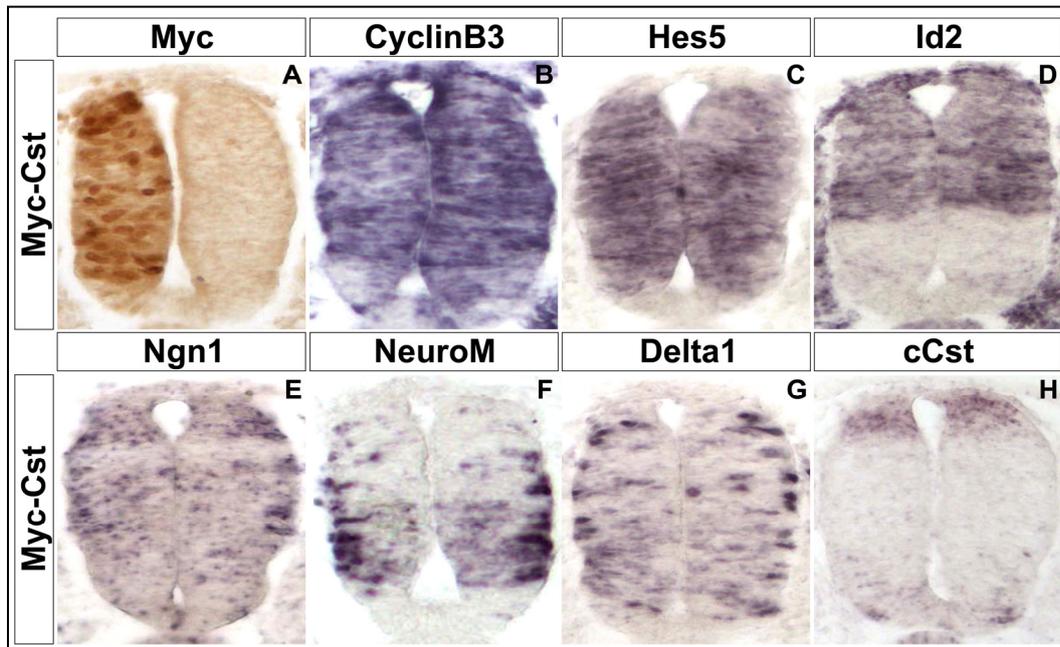


Abb. 20: Molekulare Mechanismen Cst-induzierter neuronaler Differenzierung.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffinschnitte (14 µm) von Embryonen des Stadiums HH17 24 h nE mit Myc-Cst. Es wurden Antikörperfärbungen gegen Myc (A) und *in situ* Hybridisierungen gegen *CyclinB3* (B), *Hes5* (C), *Id2* (D), *Ngn1* (E), *NeuroM* (F), *Delta1* (G) und *cCst* (H) durchgeführt. Nach der Elektroporation sind Myc⁺-Zellen über die gesamte Länge und Breite der elektroporierten Seite des Neuralrohres detektierbar, dennoch weisen die Expressionsmuster der einzelnen Marker zwischen der elektroporierten (linken) und der wildtypischen (rechten) Seite des Neuralrohres keine Unterschiede auf.

Cst fördert Differenzierungsprozesse zwar nicht auf der Ebene proneuraler Gene, könnte statt dessen aber auf die Expression *downstream* gelegener Zielgene Einfluss nehmen. Ein bekanntes Zielgen der proneuralen Faktoren ist *NeuroM*, das ebenfalls für ein bHLH-Protein kodiert. *NeuroM* wird in allen Zellen auf der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres zu dem Zeitpunkt exprimiert, wenn Zellen die ventrikuläre Zone verlassen und mit der Migration in die Mantelzone beginnen (Roztocil *et al.*, 1997). Ein weiteres Zielgen ist der Ligand *Delta1* aus der Notch-Delta-Signalkaskade, durch die der Mechanismus der lateralen Inhibition vermittelt wird. Dieser, in der ventrikulären Zone stattfindende Prozess reguliert kontinuierlich den Anteil differenzierender Zellen und gewährleistet somit, dass während der Neurogenese beständig Populationen proneuraler Vorläuferzellen erhalten bleiben (Henrique *et al.*, 1995). Wie in Abb. 20F und G dargestellt ist, wird die Expression der proneuralen Zielgene *NeuroM* und *Delta1* durch die ektopische Expression von Myc-Cst nicht verändert. Somit kann der differenzierungsfördernde Einfluss von Cst auch nicht auf diese Ebene der Regulation proneuraler Zielgene eingeordnet werden.

Daneben hat die ektopische Expression von Myc-Cst im Neuralrohr von Hühnerembryonen auch keinen Einfluss auf das endogene *Cst*-Expressionsmuster (Abb. 20H), womit ein autoregulatorischer Mechanismus ausgeschlossen werden kann.

Im Weiteren gibt es neben dem durch den aktivierten Notch-Rezeptor induzierten Mechanismus der lateralen Inhibition Hinweise auf weitere Faktoren, die der Neurogenese aktiv entgegenwirken und einen undifferenzierten oder sogar proliferierenden Zustand von Zellen erhalten. So unterbinden die Mitglieder der *high mobility group* (HMG)-Box Familie Sox1-3 (Kamachi *et al.*, 2000) zwar nicht die Expression proneuraler bHLH-Gene, blockieren aber die Kapazität der entsprechenden proneuralen bHLH-Proteine, weiterführende Schritte neuronaler Differenzierung zu induzieren. Außerdem scheint das Vermögen proneuraler Proteine, die Generierung von Neuronen aus Vorläuferzellen zu dirigieren, u.a. auf der Fähigkeit zu basieren, die Expression der Gene Sox1-3 zu reprimieren (Bylund *et al.*, 2003, Graham *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Expression von Sox2 neuronale Differenzierung inhibiert und charakteristische Merkmale von Vorläuferzellen aufrechterhält. Übereinstimmend damit führt die Inhibierung von Sox2 zu einer Delaminierung von Vorläuferzellen aus der ventrikulären Zone und dem Verlassen des Zellzyklus, was mit einem Verlust vorläuferzelltypischer Marker und der statt dessen einsetzenden Expression von Markern früher neuronaler Differenzierung einhergeht (Graham *et al.*, 2003).

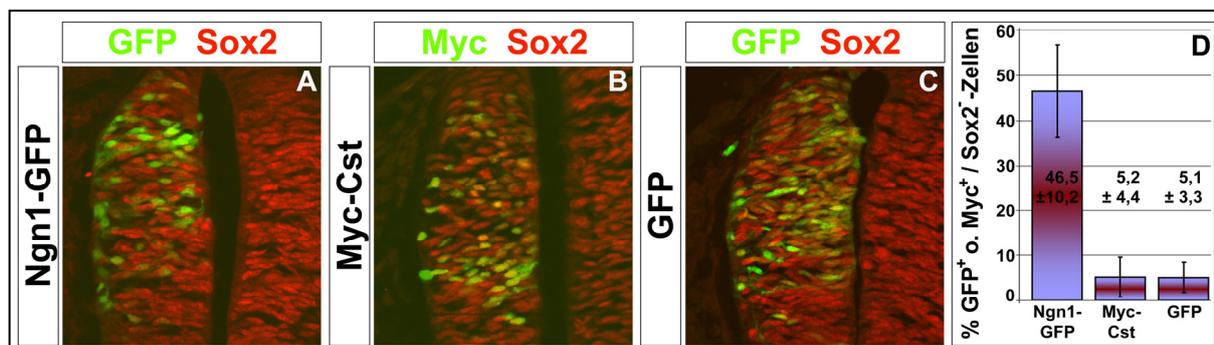


Abb. 21: Einfluss von Myc-Cst auf die Sox2 Expression.

Die Abbildung zeigt transversale Kryoschnitte (20 µm) von Embryonen des Stadiums HH16 20 h nE mit Ngn1-GFP (A), Myc-Cst (B) und GFP (C). Es wurden Antikörperfärbungen gegen Myc (B) und dem in Vorläuferzellen exprimierten Sox2 (A-C) durchgeführt. In (A) repräsentiert GFP (grün) Ngn1 exprimierende Zellen. 20 h nE wurde in etwa 50% (47% ± 10%) aller Ngn-GFP exprimierenden Zellen die Expression von Sox2 herunterreguliert (A, D), dagegen hat Myc-Cst (B, D) genau wie GFP auch (C; D) keinen Einfluss auf die Expression von Sox2.

Im Hinblick auf die Frage, ob der Differenzierungseffekt von Cst auf der Inhibierung der Expression von Sox2 basiert, wurde 20 h nE mit Myc-Cst der Anteil der Myc⁺-Zellen ermittelt, in denen Sox2 nicht weiter detektierbar war. Parallel dazu wurden *in ovo* Elektroporationen

mit Ngn1 (in pCAGGS) als bekannter Sox2-Inhibitor sowie dem für die Neurogenese irrelevanten GFP (Abb. 17E-H) durchgeführt, um die Effizienz von Myc-Cst bewerten zu können. 20 h nE ist bereits in annähernd der Hälfte ($47\% \pm 10\%$) aller Ngn-GFP exprimierenden Zellen Sox2 herunterreguliert ($\text{GFP}^+/\text{Sox2}^-$) und durch Antikörperfärbung nicht mehr nachweisbar (Abb. 21A, D). Im Unterschied dazu sind nach der ektopischen Expression von Myc-Cst nur $5\% (\pm 4\%)$ aller Myc^+ -Zellen auch Sox2^- ($\text{Myc}^+/\text{Sox2}^-$) (Abb. 21B, D). Eine vergleichbare Zahl ($5\% \pm 3\%$) an GFP^+ aber Sox2^- -Zellen ($\text{GFP}^+/\text{Sox2}^-$) wird auch nach der Elektroporation des GFP-Kontrollplasmids (Abb. 21C, D) beobachtet, wodurch deutlich wird, dass Cst seinen Einfluss auf die Neurogenese nicht über die Inhibierung von Sox2 ausübt.

Bisher konnte also gezeigt werden, dass die ektopische Expression von Myc-Cst in Vorläuferzellen eine frühzeitige neuronale Differenzierung unterstützt, ohne weiteren Einfluss auf die Spezifizierung der verschiedenen untersuchten Subtypen dorsaler sowie ventraler Inter- und Motorneuronen zu nehmen. Wie die Ergebnisse der bisherigen Experimente nahe legen, resultiert dieser Effekt von Cst auf die Neurogenese jedoch nicht aus einer Unterbrechung des Zellzyklus, durch die Aktivierung des CdK-Inhibitors p27 oder der transkriptionellen Inhibierung verschiedener, zur Fortsetzung des Zellzyklus essentieller *Cycline*. Ebenso kann ausgeschlossen werden, dass Cst durch die Aktivierung der Expression proneuraler Gene oder die Inhibierung der Expression negativer Regulatoren proneuraler Genfunktion die Neurogenese fördert. Zudem nimmt Cst weder Einfluss auf die Expression proneuraler Zielgene, die den Beginn der Migration mitotisch nicht weiter aktiver Zellen markieren noch auf solche, die über die Notch/Delta-Signalkaskade den Mechanismus der lateralen Inhibition steuern. Im Weiteren konnte festgestellt werden, dass Cst auch nicht die Fähigkeit proneuraler bHLH-Transkriptionsfaktoren besitzt, die Expression von Sox2 zu inhibieren um neuronale Differenzierung zu induzieren. Insgesamt weisen die Ergebnisse an dieser Stelle eher daraufhin, dass Cst entweder unabhängig von den proneuralen Genen oder in Kooperation mit ihnen Neurogenese kontrolliert.

3.4.2 Die zentralen Cst-Motive binden spezifisch die Castor Ziel-Sequenz

Transkriptionsfaktoren sind mit wenigen Ausnahmen Proteine, die an Enhancer- oder Promotorregionen binden um die Transkription eines bestimmten Genes zu aktivieren oder reprimieren. Im Allgemeinen kann die Struktur eines Transkriptionsfaktors in verschiedene Domänen unterteilt werden. Eine DNA-bindende Domäne, mit der eine spezifische DNA-Sequenz er-

kannt werden kann und eine transkriptionsaktivierende oder trans-aktivierende Domäne, die als Aktivator oder auch als Repressor auf ein Gen wirkt, an dessen Promotor oder Enhancer der Transkriptionsfaktor gebunden hat. Zusätzlich können noch eine oder mehrere Regionen dazu bestimmt sein, mit anderen Proteinen in Wechselwirkung zu treten (Janning *et al.*, 2004). Für den aus *Drosophila* bekannten Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Castor konnte bereits gezeigt werden, dass er für die Transkription von *POU*-Homöoboxgenen sowohl als negativer als auch positiver Regulator dient (Kambadur *et al.*, 1998). So fungiert Castor zum einen als direkter Repressor von *pdm-1* und *pdm-2*, ist aber gleichzeitig notwendig für die vollständige Expression der Gene *drf* und *I-POU* (1.4). Aus der sequenzspezifischen DNA-Bindung konnte außerdem auch eine Ziel-Sequenz für das *Drosophila* Castor Protein ermittelt werden (Kambadur *et al.*, 1998).

Sequenzanalysen zeigen, dass die aus den *Cst*-cDNAs verschiedener Spezies abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Bereich der *Cst*-Motive eine extensive Übereinstimmung zueinander und gleichfalls eine deutliche Ähnlichkeit mit der Zinkfinger-Domäne des *Drosophila* Castor Proteins aufweisen (Hurtado *et al.*, 2002, le Viseur, 2002, persönliche Mitteilung Dr. T. Theil). Daher ist zum einen die Frage nahe liegend, ob die zentrale *Cst*-Zinkfinger-Domäne ebenfalls DNA bindet und weiter, ob die aus *Drosophila* bekannte Ziel-Sequenz ebenso als spezifisches Bindemotiv erkannt wird. Um die DNA bindenden Eigenschaften der zentralen *Cst*-Motive zu untersuchen, wurde diese Domäne als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-Fusionsprotein) in Bakterien exprimiert, aufgereinigt (2.4.1) und in Gelretardationsexperimenten (2.4.2) eingesetzt. Dafür wurde zunächst die für 244 AS kodierende Sequenz der ersten vier *Cst*-Motive in den Vektor pGEX-4T3 (Pharmacia) kloniert. Dieser pGEX-4T3 Vektor enthält einen *tac*-Promotor, für eine effiziente Expression des Fusionsproteins, eine für die ersten 225 Aminosäuren der Glutathion S-Transferase (GST) kodierende Sequenz und eine SV40 polyA-Region. Die Translation des Proteins kann durch die Bindung von IPTG an den Repressor induziert werden. Weiterhin befindet sich zu Selektionszwecken auf dem Plasmid ein Ampicillinresistenz-Gen und eine MCS, in die Sequenzen so gerichtet inseriert werden können, dass aus der Promotor-kontrollierten Expression Fusionsproteine mit N-terminalem GST-Anteil resultieren. So wird der Vorteil erreicht, gezielt das Fusionsprotein durch eine Affinitätschromatographie (2.4.1) aufzureinigen zu können. Die Klonierungsstrategie für die Insertion der vier *Cst*-Motive wurde unter Berücksichtigung des, durch die GST-Sequenz bereits vorgegebenen, offenen Leserahmens erstellt. Die Region der *Cst*-Motive 1-4 wurde dafür mittels PCR, mit den Oligonukleotiden *Cst* Fw 15 und *Cst* Bw 15 (Tabelle 1) amplifiziert und durch Oligonukleotid-immanente Restriktionsschnittstellen so modifiziert,

dass dieses mit *EcoRI/XhoI* geschnittene PCR-Produkt in den ebenfalls mit *EcoRI/XhoI* geöffneten Vektor unter Einhaltung des offenen Leserahmens kloniert werden konnte. In Abb. 22A ist schematisch das Klonierungsprodukt der verknüpften GST und Cst-Motiv1-4 kodierenden Sequenz dargestellt, aus dem nach der Translation ein GST-CstM1-4-Fusionsprotein resultiert. Ebenfalls abgebildet (Abb. 22B) ist das durch Affinitätschromatographie aufgereinigte Protein, dessen Größe im Rahmen der experimentellen Auswertgenauigkeit dem theoretischen Molekulargewicht des Fusionsproteins von 56 kDa entsprach. Das aufgereinigte GST-Cst_{M1-4} Protein wurde anschließend in Gelretardationsexperimenten eingesetzt.

Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass ein stabiler Protein-DNA-Komplex messbar langsamer durch ein natives Polyacrylamidgel wandert als die freien Einzelkomponenten. Kann in einer Retardationsanalyse zusätzlich zu der Bande schnell wandernder, ungebundener DNA auch eine Bande mit geringerer Wanderungsgeschwindigkeit detektiert werden, gilt diese als Beweis, dass die DNA durch das eingesetzte Protein gebunden werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Gelretardationsexperimente radioaktiv-markierte, doppelsträngige Oligonukleotide (2.2.18, 2.2.19), mit der aus *Drosophila* bekannten Castor Ziel-Sequenz #12 des *pdm-1* Promotors (Tabelle 1) zusammen mit dem aufgereinigten GST-Cst_{M1-4}-Protein inkubiert und die Ansätze anschließend mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie analysiert. Abb. 22C zeigt die Ergebnisse mehrerer Gelretardationsansätze. In Spur 1 ist dargestellt, dass das Fusionsprotein die Oligonukleotide bindet, die der aus *Drosophila* bekannten Castor Ziel-Sequenz #12 des *pdm-1* Promotors entsprechen, denn neben den freien Oligonukleotiden in der Bande am unteren Bildrand kann noch eine weitere Bande mit kürzerer Laufstrecke detektiert werden. Diese stellt den DNA-Protein-Komplex dar, der auch unter gelelektrophoretischen Bedingungen noch stabil ist, was wiederum ein Beleg für die spezifische Wechselwirkung zwischen Protein und DNA ist. Dass diese Wechselwirkung tatsächlich nicht obligatorisch und die DNA-Bindung zudem allein auf die Cst-Motive zurückzuführen ist, wird anhand der entsprechenden Kontrolle bewiesen. Der isolierte GST-Anteil ist nicht fähig DNA zu komplexieren und folglich kann, wie in Spur 6 gezeigt, außer freien Oligonukleotiden keine weitere Bande detektiert werden. Die zentrale Zinkfingerdomäne des Cst-Proteins ist also prinzipiell zur Bindung an DNA fähig. Um im Weiteren zu überprüfen, ob die DNA-Bindung sequenzspezifisch ist, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierfür werden den Ansätzen mit konstanten Proteinmengen neben den radioaktiv-markierten Oligonukleotiden noch steigende Mengen nicht-markierte Oligonukleotide zunächst gleicher Sequenz zugefügt, die nun um die Bindungsstellen der Proteinmoleküle konkurrieren.

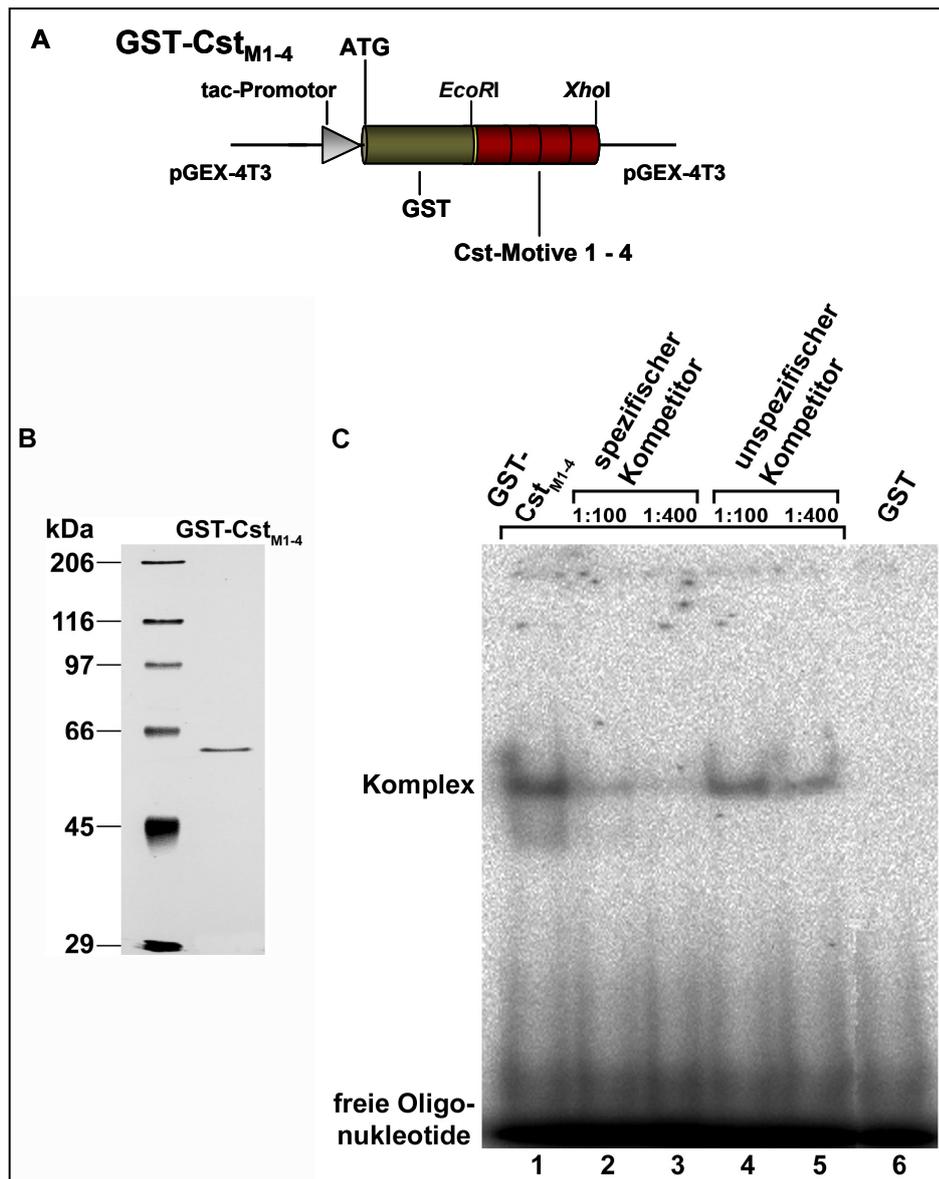


Abb. 22: Das Fusionsprotein GST-Cst_{M1-4}.

(A) Schematische Darstellung des GST-Cst_{M1-4}-Konstruktes in einem pGEX-4T3 Vektor zur Herstellung eines Fusionsproteins. Hinter die für die ersten 225 AS der Glutathion-S-Transferase kodierende Sequenz (GST) wurde unter Einhaltung des offenen Leserahmens die für die 244 AS der ersten vier Cst-Motive kodierende Sequenz (Cst_{M1-4}) in den mit *EcoRI*/*XhoI* geöffneten Vektor pGEX-4T3 kloniert. (B) Dargestellt ist das affinitätsaufgereinigte Fusionsprotein GST-Cst_{M1-4} in einem silbergefärbten, denaturierenden Polyacrylamidgel. (C) Exponat eines nativen Polyacrylamidgeles nach Gelretardationsexperimenten. (Spur 1-5) 50 ng GST-Cst_{M1-4} Fusionsprotein bzw. GST-Protein (Spur 6) wurden mit radioaktiv markierten Oligomeren inkubiert und die entstandenen DNA-Protein-Komplexe gelelektrophoretisch von freien Oligonukleotiden getrennt. Während das GST-Protein alleine nicht an die eingesetzten Oligonukleotide bindet (Spur 6), führt die Verwendung von GST-Cst_{M1-4}-Fusionsproteinen (Spuren 1-5) zur Bildung spezifischer Komplexe. Die Spuren 2 und 3 zeigen Kompetitionsansätze mit einem Überschuss an nicht-markierten Oligomeren mit der bekannten Castor Ziel-Sequenz #12 des *pdm-1* Promotors, die Spuren 4 und 5 mit unspezifischen Kompetitor-Oligonukleotiden der *Emx2*-Enhancer-Sequenz.

Statistisch überwiegt dann die Anzahl der Komplexe in denen nicht-markierte Oligonukleotide gebunden werden, was nach der Retardation und Autoradiographie eine geringere Bandenintensität zur Folge hat. Wie der Vergleich der Bandenintensitäten in den Spuren 1, 2 und 3 in

Abb. 22C zeigt, wird schon bei einem einhundertfachen Überschuss ein Teil der markierten Oligonukleotide bei der Komplexbildung ersetzt und ein vierhundertfacher Überschuss ist ausreichend, die Bandenintensität auf ein Minimum zu reduzieren. In den weiterführenden Konkurrenzexperimenten werden neben den markierten Oligonukleotiden mit der Castor Ziel-Sequenz des *pdm-1*-Promotors nicht-markierte Oligonukleotide mit der für Castor unspezifischen Sequenz des *Emx2*-Enhancers eingesetzt. In diesen Ansätzen bleibt die Intensität der Komplexbanden allerdings erhalten (Abb. 22C, Spur 4, 5). Folglich richtet sich die Komplexbildung nicht allein nach der statistischen Verteilung der zur Verfügung stehenden Oligonukleotide. Stattdessen dominiert dabei vielmehr die Affinität der GST-Cst_{M1-4}-Proteine für die markierten Oligonukleotide mit der Castor-spezifischen Ziel-Sequenz, auch wenn deren relative Konzentration nur gering ist. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse also, dass die Cst-Motive 1-4 *in vitro* die Fähigkeit besitzen, DNA mit der Castor Ziel-Sequenz spezifisch zu binden.

3.4.3 Elektroporation mit Repressor- und Aktivator-Konstrukten

Nachdem nun bereits der Domäne der Cst-Motive 1-4 eine spezifische, DNA-bindende Funktion zugeordnet werden konnte, ist es im Folgenden von Interesse zu untersuchen, ob die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors Cst frühzeitig Neurogenese zu unterstützen, auf der Aktivierung oder Reprimierung von Genexpression basiert. Die experimentelle Strategie ist, den DNA-bindenden Bereich des Cst-Proteins mit etablierten Repressor- bzw. Aktivator-Domänen andere Proteine zu verknüpfen, die Funktion dieser Fusionsproteine anschließend in Überexpressionsstudien zu analysieren und mit bisherigen Ergebnissen zu vergleichen. Je nachdem ob Cst als transkriptioneller Aktivator oder Repressor fungiert, sollte nur das korrespondierende Konstrukt den bereits gezeigten Einfluss von Myc-Cst auf die Differenzierung grundsätzlich reproduzieren (Abb. 17). Im Gegensatz dazu könnte durch die ektopische Expression des funktionell gegensätzlichen Konstruktes sogar auch ein gegenteiliger Effekt hervorgerufen werden, was ebenso ein starker Hinweis auf die Funktionsweise von Cst wäre. Für das folgende *in ovo* Elektroporationsexperiment wurden daher die vier zentralen DNA-bindenden Cst-Motive 1-4 mit bekannten Transkription aktivierenden bzw. reprimierenden Domänen verknüpft. Als Aktivator-domäne wurde das E1A Element aus dem Adenovirus (Lillie *et al.*, 1989) gewählt und alternativ dazu die Repressordomäne des Engrailed-Proteins (Smith *et al.*, 1996) aus *D. melanogaster* (Han *et al.*, 1993). Diese beiden Elemente wurden bereits jeweils in pCS2+MT-Vektoren (s.o.) kloniert und freundlicherweise von T. Pieler zur Verfü-

gung gestellt (Marine *et al.*, 1997). Die Region der Cst-Motive 1-4 wurde wie zuvor (3.4.2) mittels PCR amplifiziert und durch Oligonukleotid-immanente Restriktionsschnittstellen so modifiziert, dass dieses mit *EcoRI/XhoI* geschnittenen PCR-Produkt in die gleichermaßen geöffneten Vektoren unter Einhaltung der offenen Leserahmen sowohl der Myc-Tags als auch der, sofern vorgesehen, bereits eingefügten Domänen kloniert werden konnte. Die resultierenden Konstrukte Myc-Cst_{M1-4}-E1A (A) und Myc-Cst_{M1-4}-EngR (B) sind schematisch in Abb. 23 dargestellt. Gezeigt ist auch das zur Kontrolle gefertigte und elektroporierte Konstrukt Myc-Cst_{M1-4} (C), dass ausschließlich die Region der Cst-Motive 1-4 im pCS2+MT-Expressionsvektor beinhaltet.

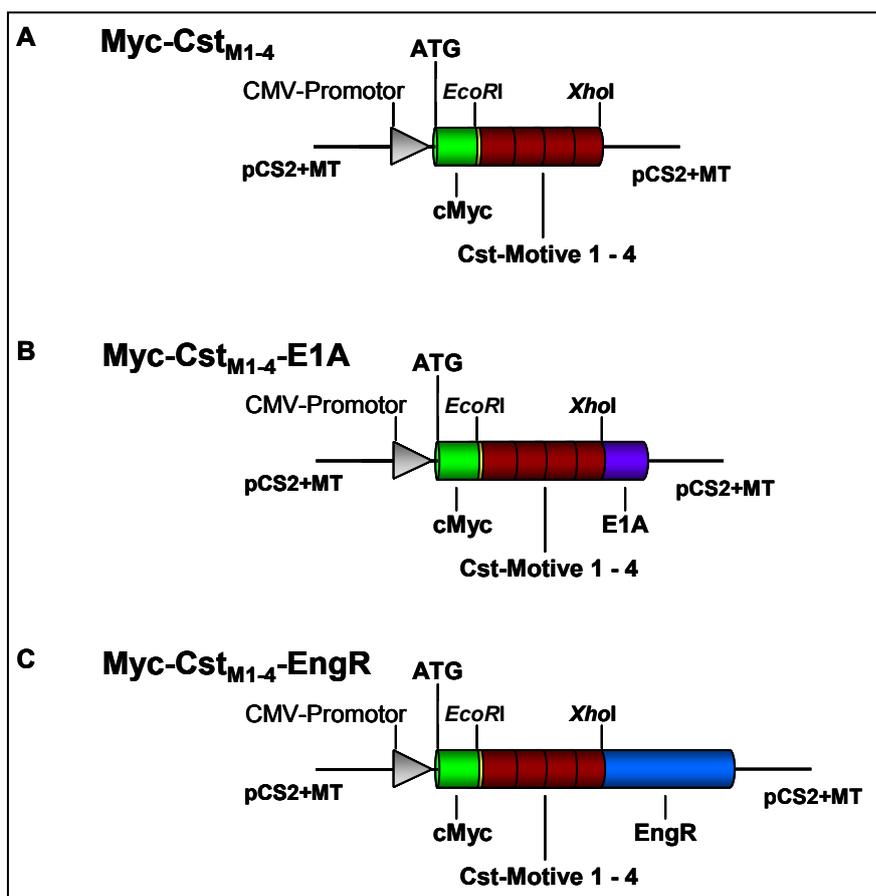


Abb. 23: Schematische Darstellung der Myc-Cst_{M1-4}, Myc-Cst_{M1-4}-E1A- und Myc-Cst_{M1-4}-EngR-Konstrukte.

Zur Herstellung des Myc-Cst_{M1-4}-Konstruktes (A) wurde die Domäne der Cst-Motive 1-4 unter Fortführung des offenen Leserahmens der cMyc-Epitope zwischen die Schnittstellen von *EcoRI* und *XhoI* des Expressionsvektors pCS2+MT inseriert. Ebenfalls unter Einhaltung des Leserahmens enthalten die Konstrukte Myc-Cst_{M1-4}-E1A (B) zusätzlich die Sequenz der transaktivierenden Domäne E1A des Adenovirus und das Konstrukt Myc-Cst_{M1-4}-EngR (C) die Sequenz der Repressordomäne des Engrailed-Proteins aus *D. melanogaster*.

48 h nE mit Myc-Cst_{M1-4}-E1A und Myc-Cst_{M1-4}-EngR befinden sich gleichermaßen die Myc⁺-Zellen lateral zur ventrikulären Zone und exprimieren gleichzeitig den Marker für differen-

zierte Neuronen p27 (Abb. 24A, B). Damit wird also sowohl durch das Repressor- als auch durch das Aktivator-Konstrukt das bereits dargestellte, durch das ungekürzte Myc-Cst hervorgerufene Expressionsmuster (Abb. 17D) reproduziert. Weiterhin zeigt das Expressionsmuster des ebenfalls elektroporierten Konstruktes Myc-Cst_{M1-4} (Abb. 24C) auch keinen wesentlichen Unterschied zu Myc-Cst, Myc-Cst_{M1-4}-E1A oder Myc-Cst_{M1-4}-EngR, obwohl dem Block aus vier Cst-Domänen, die jeweils zwei C₂H₂-Zinkfinger-Motive aufweisen, bisher nur DNA-bindende Funktion zugeordnet wurde. Somit kann aus diesen Experimenten zwar nicht abgeleitet werden, ob Cst als Transkriptionsaktivator oder -Repressor fungiert, jedoch zeigen die Ergebnisse, dass die zentrale Domäne der Cst-Motive ausreichend ist, um neuronale Differenzierung von Vorläuferzellen im Neuralrohr auszulösen.

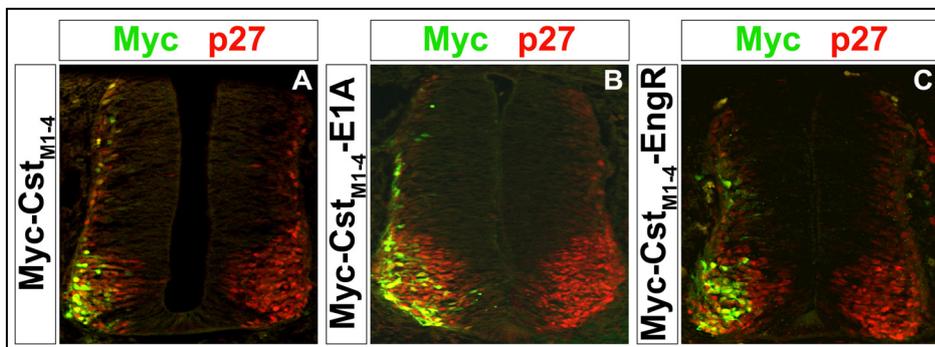


Abb. 24: Expression von Myc-Cst_{M1-4}, -E1A und -EngR in differenzierten Neuronen.

Die Abbildung zeigt transversale Kryoschnitte (20 µm) von Embryonen des Stadiums HH21 48 h nE mit Myc-Cst_{M1-4}-E1A (A), Myc-Cst_{M1-4}-EngR (B) und Myc-Cst_{M1-4} (C). Es wurden Antikörperfärbungen gegen Myc und dem in differenzierten Neuronen exprimierten p27 durchgeführt. Nach der ektopischen Expression aller drei Konstrukte befindet sich die überwiegende Mehrheit der Myc⁺-Zellen lateral der ventrikulären Zone und ist p27⁺.

3.5 Cst und negative Regulatoren der Differenzierung

In ovo Elektroporationsexperimente mit Myc-Cst haben bereits gezeigt, dass die Expression von Cst in Vorläuferzellen des Neuralrohres einen differenzierungsfördernden Charakter hat. So führt die ektopische Expression von Myc-Cst dazu, dass 48 h nE Myc⁺-Zellen ausschließlich lateral der ventrikulären Zone detektierbar sind und, wie spezifische Antikörperfärbungen u.a. gegen p27 belegen, als differenzierte Neuronen identifizieren werden können. Durch die weiteren bisherigen Analysen konnte allerdings noch kein positiver Befund zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Cst ermittelt werden. Um einen Einblick in die Cst induzierte Neurogenese zu erhalten, wurde im Folgenden untersucht, ob bereits bekannte negative Regulatoren bzw. Inhibitoren der Differenzierung ihrerseits einen Einfluss auf die differenzierende Wirkung von Cst ausüben können. In diesem experimentellen Ansatz wurde daher das Myc-

Cst-Konstrukt zusammen mit Expressionsplasmiden der differenzierungshemmenden Faktoren Hes5 oder Id2 koelektroporiert. 48 h nE wird ermittelt, ob Cst dem Differenzierung inhibierenden Effekt von Hes5 bzw. Id2 entgegenwirken kann. Dazu wurde durch den Marker p27 der Differenzierungszustand der Zellen bestimmt, in denen die Expressionsprodukte beider elektroporierten Plasmide nachgewiesen werden konnten.

3.5.1 Koelektroporation von Myc-Cst und Hes5-GFP

Basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren der Hes-Familie inhibieren nicht nur als transkriptionelle Repressoren die Expression proneuraler Gene sondern auch als direkte Interaktionspartner proneuraler Proteine deren Funktion, die Expression von Zielgenen zu induzieren und dadurch Differenzierung auszulösen. Auch Hes5 erhält nach diesem Prinzip den undifferenzierten, proliferativen Zustand neuronaler Vorläuferzellen aufrecht (Ishibashi *et al.*, 1995, Nakamura *et al.*, 2000, Ohtsuka *et al.*, 2001). Übereinstimmend damit können 48 h nE eines Hes5-GFP-Konstruktes (Tabelle 3) nur wenige Zellen detektiert werden, die trotz der ektopischen Hes5 Expression differenziert und daher durch p27 markierbar sind (Abb. 25A, GFP⁺/p27⁺, gelb, Pfeilspitzen). Lediglich 5,2% ($\pm 1,5\%$) der GFP exprimierenden Zellen sind auch p27⁺ (Abb. 25E). Dagegen ist die Anzahl der GFP⁺/p27⁺-Zellen nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Hes5-GFP sichtlich höher (Abb. 25B, GFP⁺/p27⁺, gelb, Pfeilspitzen).

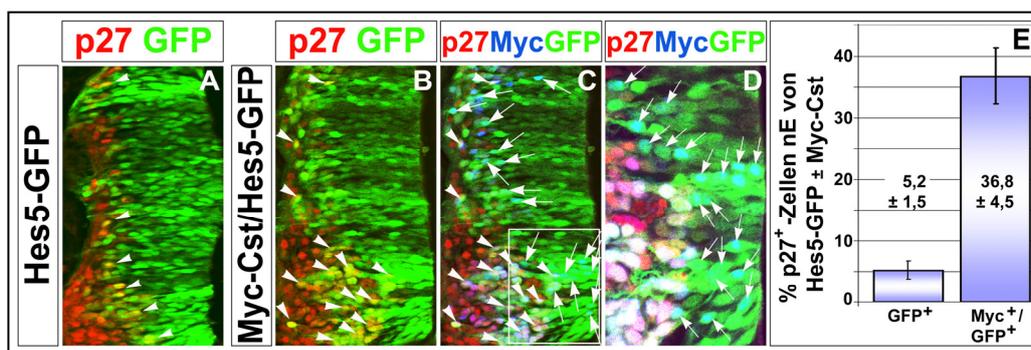


Abb. 25: Koelektroporation von Myc-Cst und Hes5-GFP.

Die Abbildung zeigt transversale Kryostatschnitte (20 μ m) der elektroporierten Neuralrohrseite von Embryonen des Stadiums HH22 48 h nach der Elektroporation mit Hes5-GFP (A) bzw. nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Hes5-GFP (B-D). Es wurden Antikörperfärbungen gegen p27 (A-D, rot) und Myc (B, D, blau) durchgeführt, GFP (grün) repräsentiert Hes5 exprimierende Zellen. (E) Es wurden jeweils 5 elektroporierte Embryonen untersucht, Σ 5343 Zellen bei der Einzel- und Σ 4549 Zellen bei der Koelektroporation ausgezählt. Durch die ektopische Expression von Hes5-GFP wird neuronale Differenzierung inhibiert, so dass nur wenige elektroporierte Zellen p27 exprimieren (GFP⁺/p27⁺, gelb) (A, Pfeilspitzen, E). Nach der Koelektroporation ist die Anzahl der GFP⁺/p27⁺-Zellen (gelb) deutlich höher (B, Pfeilspitzen). Diese Zellen exprimieren außer Hes5-GFP und p27 auch Myc-Cst (Myc⁺/GFP⁺/p27⁺, weiß) (C, Pfeilspitzen, D). Der weit größere Anteil Hes5-GFP und Myc-Cst exprimierender Zellen (Myc⁺/GFP⁺, türkis) bleibt jedoch undifferenziert und ist p27⁻ (C, D, Pfeile, E).

Tatsächlich exprimieren nun mehr als ein Drittel ($36,8\% \pm 4,5\%$) der Zellen in denen beide Expressionsprodukte ($\text{Myc}^+/\text{GFP}^+$) nachgewiesen werden konnten zusätzlich p27 (Abb. 25C-E, $\text{Myc}^+/\text{GFP}^+/\text{p27}^+$, weiß, Pfeilspitzen), wodurch diese Zellen als differenzierte Neuronen ausgewiesen werden. Andererseits bedeutet dies aber auch, dass knapp zwei Drittel ($63,2\% \pm 4,5\%$) aller gleichzeitig Myc-Cst und Hes5-GFP exprimierenden Zellen 48 h nE noch nicht p27 exprimieren und damit nicht differenziert sind (Abb. 25C, D, $\text{Myc}^+/\text{GFP}^+/\text{p27}^-$, türkis, Pfeile). Für diese Analyse wurden jeweils 5 elektroporierte Embryonen untersucht, $\Sigma 5343$ Zellen bei der Einzel- und $\Sigma 4549$ Zellen bei der Koelektroporation ausgezählt. Auffällig bei den koelektroporierten Embryonen ist die relativ große Rate der Zellen, die nur Hes5-GFP ektopisch exprimieren im Vergleich zur Menge der $\text{Myc}^+/\text{GFP}^+$ -Zellen, ein Phänomen, das in anderen Koelektroporationsexperimenten nicht beobachtet wurde (Abb. 28F, Abb. 30G).

Die Ergebnisse zeigen, dass der starke negative Einfluss von Hes5 auf die Differenzierung durch die Koelektroporation mit Myc-Cst um ein Vielfaches reduziert werden kann. Dies bedeutet, dass in einem Teil der Zellen trotz der Inhibierung der Aktivität proneuraler Gene und bHLH-Faktoren durch Hes5 die Wirkung von Myc-Cst ausreichend ist, Differenzierung zu initiieren. Dennoch schränken sich die ektopisch exprimierten Faktoren Myc-Cst und Hes5-GFP gegenseitig in ihrer Wirkung auf das Differenzierungs- bzw. Proliferationsverhalten der Zellen ein. Auch wenn der Anteil der differenzierten Hes5-GFP exprimierenden Zellen durch die Wirkung von Myc-Cst um den Faktor 7 erhöht wird, bleibt in der Mehrzahl der Zellen die Wirkung von Hes5-GFP ausreichend auch in der Gegenwart von Myc-Cst weiterhin die neuronale Differenzierung zu inhibieren.

3.5.2 Koelektroporation von Myc-Cst und Id2-GFP

Mitglieder der Id-Familie einschließlich Id2 sind HLH-Proteine und wirken auf verschiedene Weisen inhibierend auf die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen. Durch die direkte Interaktion mit diesen HLH-Faktoren werden einerseits für die Funktion proneuraler Proteine essentielle Kofaktoren unzugänglich, andererseits können bHLH-Proteine nicht mehr an DNA binden (Martinsen *et al.*, 1998). Darüber hinaus werden mit der Inhibierung von Rb-Faktoren durch Id2 negative Regulatoren des Zellzyklus außer Kraft gesetzt (Iavarone, *et al.*, 1994). Damit korrelieren die Ergebnisse der *in ovo* Elektroporation eines Id2-GFP-Konstruktes (Tabelle 3), die zeigen, dass 48 h nE nur wenige Zellen mit ektopischer Id2-GFP Expression gleichzeitig p27 exprimieren und demnach differenziert sind ($13,8\% \pm 3,3\%$) (Abb. 26A,

GFP⁺/p27⁺, gelb, Pfeilspitzen, E). Dieser Anteil GFP⁺/p27⁺-Zellen ist dagegen in mit Myc-Cst und Id2-GFP koelektroporierten Embryonen deutlich größer (Abb. 26B, GFP⁺/p27⁺, gelb). Anders als bei der Koelektroporation mit Hes5-GFP, ist in diesem experimentellen Ansatz die Mehrheit der Myc⁺/GFP⁺-Zellen (74,5% ± 3,7%) bereits differenziert und exprimiert daher auch p27 (Abb. 26C-E, Myc⁺/GFP⁺/p27⁺, weiß).

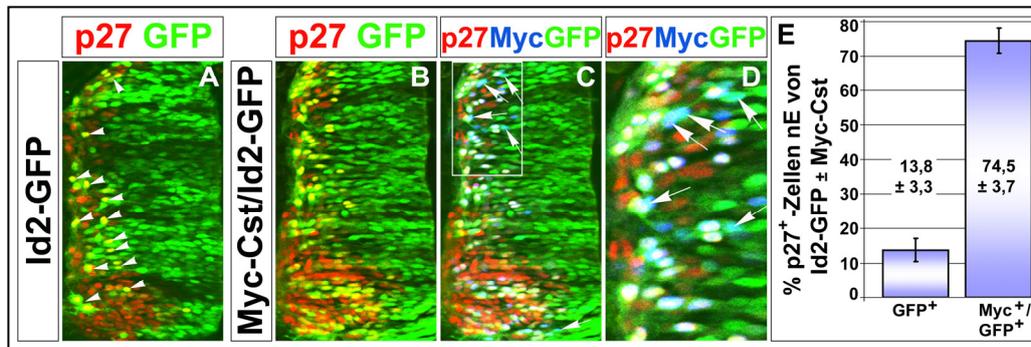


Abb. 26: Koelektroporation von Myc-Cst und Id2-GFP.

Die Abbildung zeigt transversale Kryostatschnitte (20 μm) der elektroporierten Neuralrohrseite von Embryonen des Stadiums HH22 48 h nach der Elektroporation mit Id2-GFP (A) bzw. nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Id2-GFP (B-D). Es wurden Antikörperfärbungen gegen p27 (A-D, rot) und Myc (B, D, blau) durchgeführt, GFP (grün) repräsentiert Id2 exprimierende Zellen. (E) Es wurden jeweils 5 elektroporierte Embryonen untersucht, $\Sigma 6811$ Zellen bei der Einzel- und $\Sigma 6089$ Zellen bei der Koelektroporation ausgezählt. Durch die ektopische Expression von Id2-GFP wird neuronale Differenzierung inhibiert, so dass nur wenige elektroporierte Zellen p27 exprimieren (GFP⁺/p27⁺, gelb) (A, Pfeilspitzen, E). Nach der Koelektroporation ist die Anzahl der GFP⁺/p27⁺-Zellen (gelb) deutlich größer (B). Ein Großteil der Myc-Cst und Id2-GFP exprimierenden Zellen ist bereits differenziert und somit p27⁺ (Myc⁺/GFP⁺/p27⁺, weiß) (C-E). Deutlich weniger Zellen, die beide Faktoren ektopisch exprimieren bleiben undifferenziert und sind demnach p27⁻ (Myc⁺/GFP⁺, türkis) (C, D, Pfeile, E).

Entsprechend gering ist die Anzahl der Zellen, die sowohl Myc-Cst als auch Id2 exprimieren aber nicht p27⁺ sind (25,5% ± 3,7%) (Abb. 26C, D, Myc⁺/GFP⁺/p27⁻, türkis, Pfeile, E). Auch für diese Analyse wurden jeweils 5 elektroporierte Embryonen untersucht sowie $\Sigma 6811$ Zellen bei der Einzel- und $\Sigma 6089$ Zellen bei der Koelektroporation ausgezählt. Ebenso wie im zuvor gezeigten Experiment ist der Befund, dass auch nach dieser Koelektroporation eine beachtliche Menge Zellen nachweisbar ist, die wiederum ausschließlich Id2-GFP oder Myc-Cst exprimieren. Es liegt nahe anzunehmen, dass diesem Effekt, der nun in beiden mit Myc-Cst und einem Neurogenese inhibierenden Faktoren durchgeführten Koelektroporationen beobachtet wurde, die gleiche Ursache zu Grunde liegt. Letztendlich zeigen die Ergebnisse der Koelektroporationsexperimente mit Myc-Cst und Id2-GFP, dass Cst die durch Id2 induzierte Blockade der neuronalen Differenzierung weitgehend aufhebt und andererseits, dass der differenzierungsfördernde Effekt von Cst kaum durch die Gegenwart von Id2 beeinflusst wird. Wie die vergleichsweise geringe Anzahl nicht differenzierter Myc⁺/GFP⁺-Zellen belegt, kann der

inhibitorische Einfluss von Id2 auf die Neurogenese nur in wenigen Myc-Cst exprimierenden Zellen aufrechterhalten werden.

Die Ergebnisse der Koelektroporationsexperimente mit Myc-Cst und Hes5- bzw. Id2-GFP zeigen, dass der inhibitorische Effekt dieser beiden negativen Regulatoren der Differenzierung in der Gegenwart von Cst Einschränkungen unterworfen und unterschiedlich effizient ist. Bei der Inhibierung durch Hes5 wird sowohl die Aktivität proneuraler Gene als auch die proneuraler bHLH-Proteine reprimiert und trotzdem gelingt es Cst in einem Teil der Zellen die Folgen dieser Inhibierung zu kompensieren und dennoch Differenzierung auszulösen. Da bereits ausgeschlossen werden konnte, dass Cst auf die Expression proneuraler Gene oder deren Zielgene Einfluss nimmt, resultiert das Ergebnis der Koelektroporationsexperimente nicht daraus, dass Cst die proneurale Genaktivität trotz der Blockade wiederherstellt, sondern weist vielmehr darauf hin, dass Cst Differenzierung durch einen Weg alternativ zu bHLH-Faktoren induzieren kann. Im Weiteren basiert der Wirkungsmechanismus von Id2 ebenso auf einer Einschränkung der Aktivität proneuraler bHLH-Faktoren, zudem stabilisiert Id2 aber auch noch die Progression des Zellzyklus durch die Inhibierung von Rb-Proteinen. Dass Cst in den Koelektroporationsexperimenten den Effekt von Id2 in der Mehrheit der Zellen aufhebt, zeigt, dass Cst in Vorläuferzellen parallel zur Funktion proneuralen Faktoren den Austritt aus dem Zellzyklus vermitteln könnte.

3.6 Cst und proneurale bHLH-Transkriptionsfaktoren

Während der Neurogenese führt die Expression unterschiedlicher proneuraler bHLH-Transkriptionsfaktoren in den verschiedenen Vorläuferzellpopulationen der ventrikulären Zone des dorsalen Neuralrohres sowohl zur neuronalen Differenzierung als auch zur Spezifizierung neuronaler Subtypen. Die proliferierenden Zellen der Populationen dP1, dP2 und dP3-dP5 grenzen sich durch die spezifische Expression der proneuralen Gene *Math1*, *Ngn1* und *Mash1* voneinander ab und generieren als Folge der proneuralen Genaktivität die unterschiedlichen dorsalen Interneuronen dI1, dI2 bzw. dI3-dI5. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Bildung der verschiedenen Typen dorsaler Interneuronen nicht nur allein von bHLH-Faktoren gesteuert wird, sondern dass zudem weitere, meist noch unbekannte Kofaktoren in die Subtypspezifizierung involviert sind (Helms *et al.*, 2005, Nakada *et al.*, 2004, Müller *et al.*, 2005). Auch für Cst konnte bereits gezeigt werden, dass es in den Vorläuferpopulationen dP1, dP2 und dP3 exprimiert wird und zudem differenzierungsfördernde Eigenschaften besitzt, ohne

jedoch subtypspezifizierend wirksam zu sein oder die Expression der bereits untersuchten Regulatoren der Proliferation oder Differenzierung zu beeinflussen. Die bisherigen Ergebnisse deuten eher daraufhin, dass die differenzierungswirksame Funktion von Cst über einen von den bHLH-Faktoren unabhängigen Mechanismus verläuft und legen daher die Fragestellung nahe, ob Cst als Kofaktor proneuraler Gene bei der Subtypspezifizierung fungiert. Um die Kompetenz von Cst als Kofaktor proneuraler bHLH Proteine zu untersuchen, wurden Koelektroporationen mit Myc-Cst und Expressionskonstrukten von *Math1*, *Ngn1* und *Cash1* (Tabelle 3) durchgeführt. 48 h nach der jeweiligen Koelektroporation wurde durch *in situ* Hybridisierungen (2.3.5) bzw. Antikörperfärbungen auf Paraffin- (2.8.2) und Kryoschnitten (2.8.1) ermittelt, ob durch Cst die subtypspezifizierende Funktion von *Math1*, *Ngn1* oder *Cash1* beeinflusst wird.

3.6.1 Koelektroporation von Myc-Cst und Math1

Durch die Expression des proneuralen Gens *Math1* wird die Population proliferierender Vorläuferzellen dP1 darauf programmiert, dorsale Interneuronen des Typs 1 (dI1) zu generieren (Birmingham *et al.*, 2001, Helms *et al.*, 1998). Übereinstimmend damit führt die Inaktivierung von *Math1* zu einem Verlust und die Überexpression zu einer Vermehrung der dI1-Interneuronen (Gowan *et al.*, 2001). Allerdings ist nach der ektopischen Expression von *Math1* durch *in ovo* Elektroporation auch zu beobachten, dass die Bildung zusätzlicher dI1-Interneuronen auf dorsale Regionen des Neuralrohres beschränkt bleibt. Deshalb kann angenommen werden, dass die Kompetenz von *Math1* begrenzt ist und für die Subtypspezifizierung zusätzliche Faktoren erforderlich sind (Gowan *et al.*, 2001, Nakada *et al.*, 2004). Zum gleichen Ergebnis führen auch die in dieser Arbeit durchgeführten *in ovo* Elektroporationen mit *Math1*. 48 h nE ist die Anzahl der, durch die spezifische Expression von *Lh2b* detektierbaren dI1-Interneuronen um den Faktor 3 ($3,19 \pm 0,91$) im Vergleich zur wildtypischen Seite des Neuralrohres erhöht (Abb. 27 B, D und Nakada *et al.*, 2004) und obwohl die ektopische Expression von *Math1* nachweislich die gesamte dorso-ventrale Achse überspannt, werden nur in dorsalen und medialen Bereichen des Neuralrohres zusätzliche dI1-Interneuronen gebildet (Abb. 27A, B). Im Gegensatz dazu ist das Resultat der Koelektroporation von Myc-Cst und *Math1* (Abb. 27E, H) eine weitreichende, 6 fache ($6,33 \pm 1,38$) Vermehrung der dI1-Interneuronen (Abb. 27D), die sich nun deutlich auch auf den ventralen Bereich der elektroporierten Seite des Neuralrohres erstreckt (Abb. 27F).

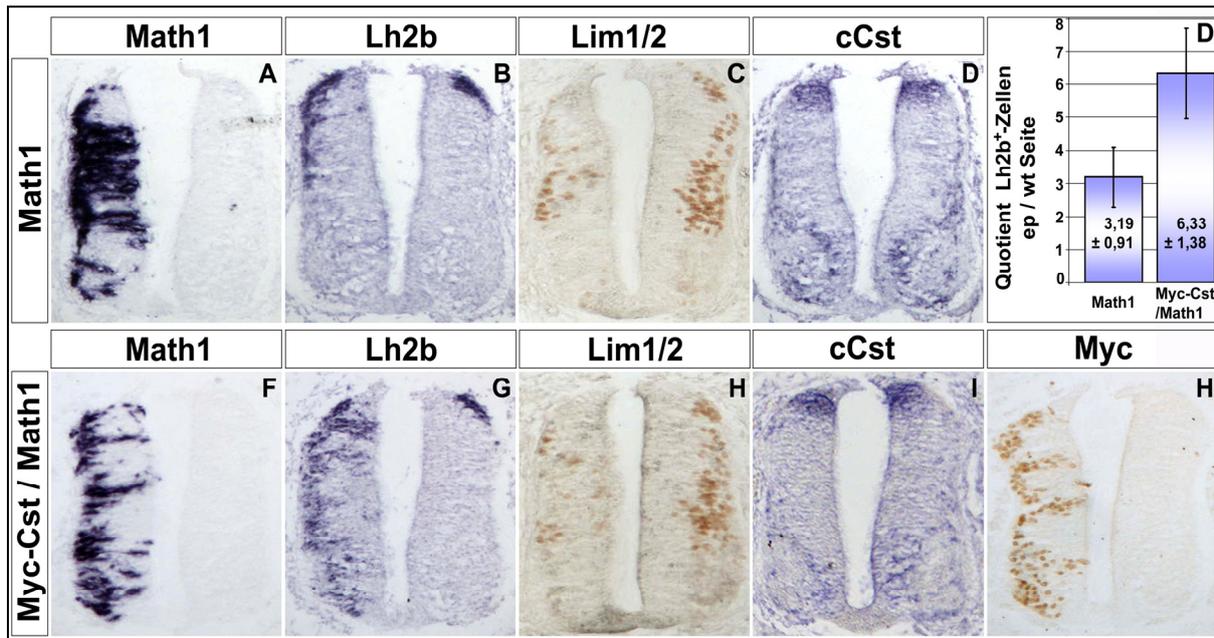


Abb. 27: Koelektroporation von Myc-Cst und Math1.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffinschnitte (14 μ m) von Embryonen des Stadiums HH22 48 h nach der Elektroporation mit Math1 (A-D) bzw. nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Math1 (F-J). Es wurden *in situ* Hybridisierungen gegen *Math1* (A, F), *Lh2b* (B, G) und *cCst* (D, I) sowie Antikörperfärbungen gegen *Lim1/2* (C, H) und *Myc* (J) durchgeführt. Durch die ektopische Expression von *Math1* (A) werden beschränkt auf dorso-mediale Bereiche der elektroporierten Seite des Neuralrohres vermehrt *Lh2b*⁺ dI1-Interneuronen gebildet (B, E). Nach der Koelektroporation von Myc-Cst (J) und Math1 (F) werden *Lh2b*⁺-Zellen auch in der ventralen Hälfte des Neuralrohres detektiert (G). Die Anzahl *Lim1/2*⁺ dorsaler und ventraler Interneuronen ist in Folge der ektopischen Expression von *Math1* (\pm Myc-Cst) reduziert (C, H), das endogene Expressionsmuster von *cCst* im Neuralrohr der elektroporierten Embryonen ist nicht verändert (D, I).

Einhergehend mit der Ausbreitung der dI1-Interneuronenpopulation wird sowohl bei der Einzelelektroporation von Math1 als auch bei der Koelektroporation beobachtet, dass die Anzahl der *Lim1/2*⁺ Interneuronen dI2, dI4 und dI6 sowie V0 bis V2 massiv reduziert wird (Abb. 27C, H). Dies zeigt, dass die zusätzlichen dI1-Interneuronen nicht *de novo* gebildet werden, sondern, dass stattdessen das Schicksal bereits vorhandener Zellen in den dI1-Interneuronentyp umgewandelt wird. Daneben bleibt das endogene Expressionsmuster von *Cst* im Neuralrohr elektroporierter Hühnerembryonen nach der ektopischen Expression von *Math1* in beiden experimentellen Ansätzen unverändert (Abb. 27D, I). Diese Ergebnisse zeigen, dass die sonst an einen dorsalen Zell-Kontext gebundene Kompetenz von Math1, das Zellschicksal von Vorläuferzellen spezifisch auf den dI1-Interneuronensubtyp festzulegen, in der Gegenwart von *Cst* ausgedehnt wird und offenbar nicht mehr einer regionalen Limitierung unterworfen ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass *Cst* mit dem proneuralen Faktor Math1 bei der Spezifizierung von dI1-Interneuronen kooperiert.

Im Folgenden stellt sich die Frage, ob *Cst* auch mit den anderen proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren bei der Spezifizierung weiterer Interneuronensubtypen kooperiert.

3.6.2 Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP

Die Expression des proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktors Ngn1 ist nicht nur charakteristisch für die Vorläuferzellpopulation dP2, sondern im Weiteren auch notwendig, damit im Laufe der Neurogenese aus diesen Vorläuferzellen dl2-Interneuronen hervorgehen, wie durch die Untersuchung von Verlustmutanten und die Analyse von Überexpressionsstudien gezeigt werden konnte (Gowan *et al.*, 2001, Helms *et al.*, 2003, Kriks *et al.*, 2005). In den folgenden *in ovo* Elektroporationsexperimenten wird zur Detektion der dl2-Interneuronen, in Ermangelung eines für diesen neuronalen Subtypen spezifischen Markers, die Expression der Faktoren Lim1/2 und Pax2 betrachtet. Diese kennzeichnen zwar übereinstimmend die dorsalen und ventralen Interneuronen dl4, dl6 und V0 bis V2, alleine Lim1/2 wird aber außerdem noch in den nachzuweisenden dl2-Interneuronen exprimiert. Als dl2-Interneuronen werden demnach auch nach der Elektroporation nur solche Zellen identifiziert, die zwar Lim1/2 exprimieren nicht aber Pax2 (Abb. 28A, B und D, E).

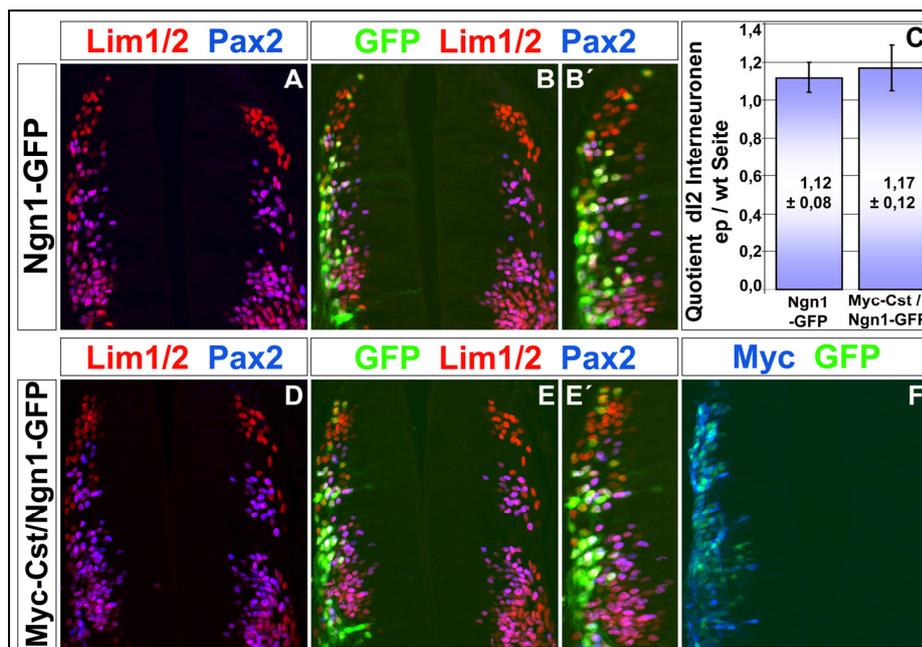


Abb. 28: Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP.

Die Abbildung zeigt transversale Kryostatschnitte (20 μ m) von Embryonen des Stadiums HH21 48 h nach der Elektroporation mit Ngn1-GFP (A-B') bzw. nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP (D-E'). Es wurden Antikörperfärbungen gegen Lim1/2 (A, B, D, E, rot), Pax2 (A, B, D, E, blau) und Myc (F, blau) durchgeführt, GFP (B, E, grün) repräsentiert Ngn1 exprimierende Zellen. Pax2 und Lim1/2 kennzeichnen gleichsam dl4, dl6, V0-V2 (Lim1/2⁺/Pax2⁺, violett) und nur Lim1/2 zusätzlich noch dl2-Interneuronen (Lim1/2⁺/Pax2⁻, rot) (A, D). Durch die ektopische Expression von Ngn1 wird die dl2-Population im Vergleich zur wildtypischen Hälfte des Neuralrohres geringfügig vergrößert (Lim1/2⁺/Pax2⁻, rot und Lim1/2⁺/Pax2⁻/GFP⁺, gelb) (B und B', E und E'). Die gleichzeitige Expression von Myc-Cst (GFP⁺/Myc⁺, türkis) (F) nach der Koelektroporation, hat keinen messbaren Einfluss auf die Ngn1-induzierte Bildung von dl2-Interneuronen (C).

48 h nach der Elektroporation eines Ngn1-GFP-Expressionsplasmides ist eine wohl moderate jedoch reproduzierbare Vermehrung der dl2-Interneuronenpopulation ($Lim1/2^+/Pax2^-$) um den Faktor 1,15 ($\pm 0,08$) zu verzeichnen (Abb. 28C), wobei eine Vielzahl der ektopisch Ngn1 exprimierenden, GFP^+ -Zellen anderen Interneuronensubtypen zuzuordnen sind (Abb. 28B). Eine Vergrößerung der dl2-Population ist so auch nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP feststellbar (Abb. 28D, E), wobei sich die relative Zunahme der dl2-Interneuronen ($1,17 \pm 0,1$) nicht messbar von derjenigen unterscheidet, die durch die Einzelelektroporation von Ngn1-GFP erzielt wurde (Abb. 28C). Da die Majorität der GFP^+ -Zellen auch Myc-Cst exprimiert (Abb. 28F), belegen diese Befunde, dass Cst das dl2-spezifisierende Potential von Ngn1 weder fördernd noch inhibierend beeinflusst. Die Ergebnisse deuten somit insgesamt daraufhin, dass Ngn1 bei der Bildung von dl2-Interneuronen nicht mit Cst interagiert. Die Analyse der Ergebnisse der Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP liefern also einen ersten Hinweis dafür, dass Cst trotz der überlappenden endogenen Expressionsdomänen im dorsalen Neuralrohr nicht universell mit proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren bei der entsprechenden Subtypspezifizierung bzw. Generierung der resultierenden Interneuronen kooperiert und die zuvor beobachtete Induktion von dl1-Interneuronen daher auf eine spezifische Interaktion von Math1 und Cst zurückzuführen sein kann.

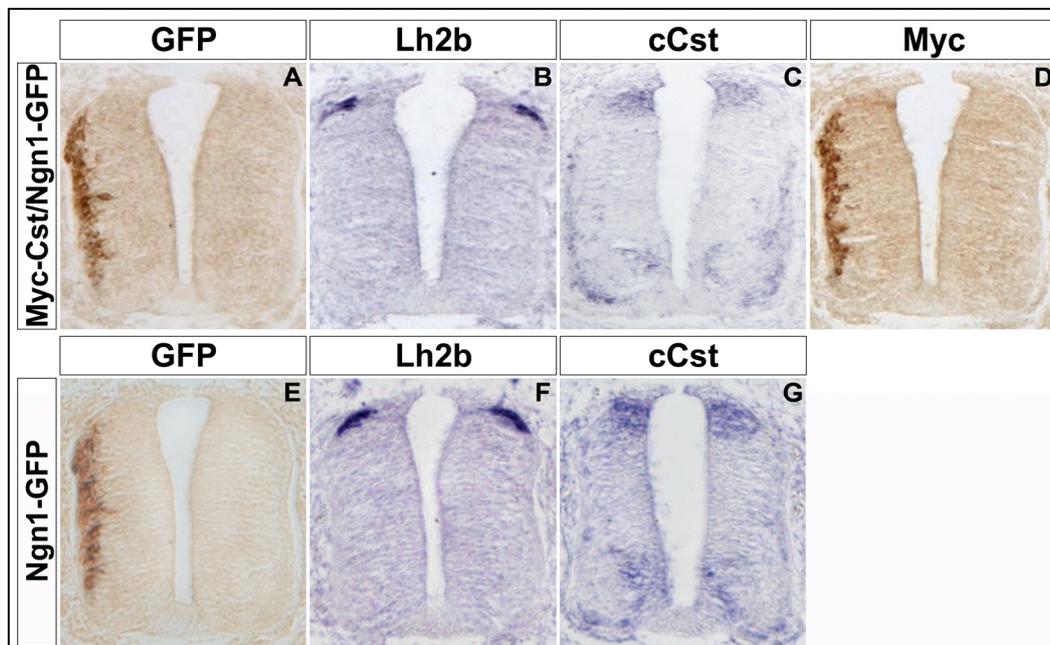


Abb. 29: dl1-Interneuronen nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffinschnitte (14 μ m) von Embryonen des Stadiums HH21 48 h nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP (A-D) und der Einzelelektroporation von Ngn1-GFP (E-G). Es wurden Antikörperfärbungen gegen GFP (A, E) und Myc (D) sowie *in situ* Hybridisierungen gegen *Lh2b* (B, F) und *cCst* (C, G) durchgeführt. Die Bildung der dl1-Interneuronen (B, F) sowie das endogene *Cst*-Expressionsmuster bleiben sowohl nach der Elektroporation von Ngn1-GFP als auch nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP unverändert.

Zudem ist nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Ngn1-GFP (Abb. 29A-D), wie auch nach der Einzelektroporation von Ngn1-GFP (Abb. 29E-G) das Expressionsmuster von *Lh2b* (Abb. 29B, F) als Indikator für die Population der dI1-Interneuronen, genauso wie die Expression des endogenen *Cst* (Abb. 29C, G) unverändert. Dadurch kann auch ausgeschlossen werden, dass in der Gegenwart von *Cst*, das Potential von Ngn1 zur Subtypspezifizierung so modifiziert wird, dass zusätzlich dI1- statt dI2-Interneuronen generiert werden.

3.6.3 Koelektroporation von Myc-Cst und Cash1-GFP

Anders als die zuvor betrachteten proneuralen Faktoren *Math1* und *Ngn1*, deren Expression typisch ist für jeweils eine bestimmte Vorläuferzellpopulation, wird *Mash1* bzw. das homologe Gen *Cash1* in Hühnerembryonen in den Zellgruppen dP3, dP4 und dP5 in der ventrikulären Zone des Neuralrohres exprimiert (Johnson *et al.*, 1990, Jasoni *et al.*, 1994). Aus diesen *Cash1* exprimierenden Vorläuferzellen gehen zwar die drei verschiedenen Interneuronentypen dI3, dI4 und dI5 hervor, dennoch ist die *Cash1*-Expression für die Spezifizierung der einzelnen Subtypen wahrscheinlich von unterschiedlicher Relevanz. Kürzlich wurde bekannt, dass die Inaktivierung von *Mash1* zu einem Verlust von dI3- und dI5-Interneuronen führt, gleichzeitig aber auch eine Vermehrung der dI4-Interneuronen bewirkt (Helms *et al.*, 2003). Übereinstimmend damit steigt die Anzahl der dI3- (Nakada *et al.*, 2004, Krites *et al.*, 2005) und dI5-Interneuronen durch die Überexpression von *Mash1*, während die Menge der dI4-Interneuronen abnimmt (Helms *et al.*, 2003). Zu einem vergleichbaren Ergebnis führen auch die in dieser Arbeit durchgeführten *in ovo* Elektroporationsexperimente mit einem *Cash1*-GFP-Expressionsplasmid. Die dI3-Interneuronenpopulation, detektierbar durch die Expression von *Isl1/2*, ist 48 h nE im Vergleich zur wildtypischen Seite des Neuralrohres um den Faktor 1,80 ($\pm 0,26$) vergrößert (Abb. 30A, E). Dass die Anzahl der ebenfalls *Isl1/2* exprimierenden Motoneuronen durch die ektopische Expression von *Cash1*-GFP beeinflusst wird, kann hingegen ausgeschlossen werden, da das Expressionsmuster des spezifischen Motoneuronen-Markers *MNR2* unverändert bleibt und zudem keine Überlappung mit GFP⁺-Zellen zu beobachten ist (Abb. 30B). Die Identität der GFP⁺-Zellen, die nicht *Isl1/2* exprimieren, wurde nicht weiter bestimmt, da es nahe liegt anzunehmen, dass es sich um dI5-Interneuronen handelt, *Cst* endogen aber nicht in Zellen der dP5 Population exprimiert wird. Die Koelektroporation von Myc-Cst und *Cash1*-GFP führt, wie der Vergleich mit der wildtypischen Neuralrohreseite zeigt, zu einer Vermehrung der dI3-Interneuronen (Abb. 30F, G) um den Faktor 1,86 ($\pm 0,31$), die sich damit nicht signifikant von derjenigen unterscheidet, die nach der Einzele-

lektroporation von Cash1-GFP festgestellt wurde (Abb. 30E). Wie in Abb. 30J dargestellt, exprimiert die Mehrheit der GFP⁺-Zellen ebenfalls Myc-Cst, woraus geschlossen werden kann, dass Cst die dI3-spezifisierende Aktivität von Cash1 nicht beeinflusst.

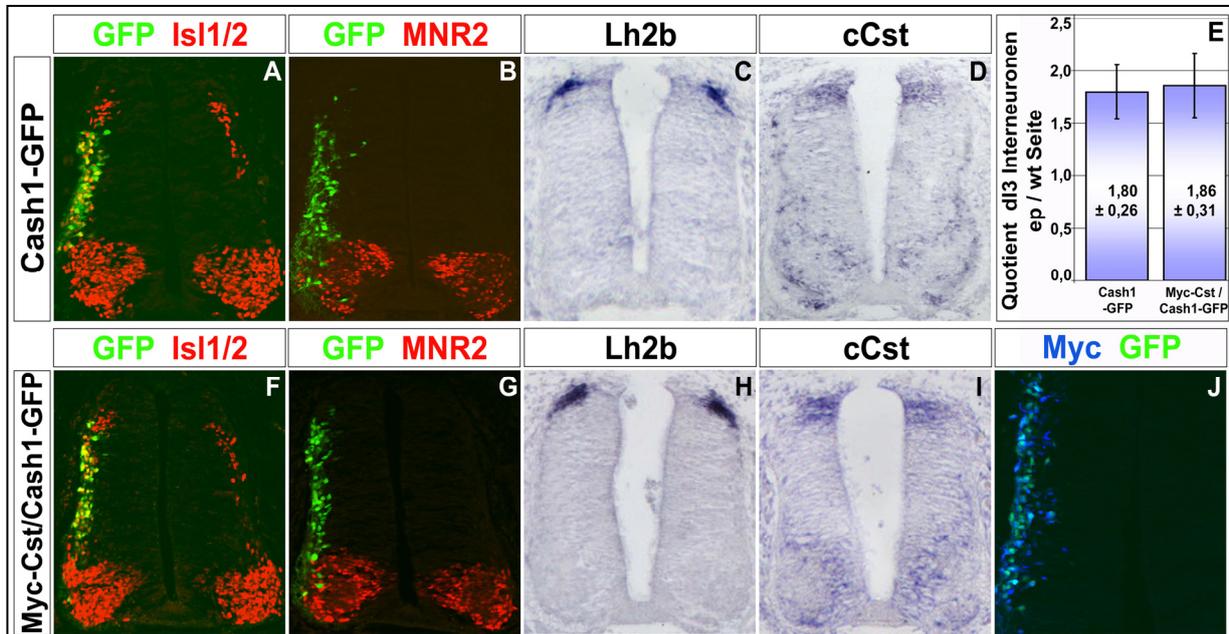


Abb. 30: Koelektroporation von Myc-Cst und Cash1-GFP.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffin- (14 µm) und Kryostatschnitte (20 µm) von Embryonen des Stadiums HH22 48 h nach der Elektroporation mit Cash1-GFP (A-D) bzw. nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Cash1-GFP (F-J). Es wurden Antikörperfärbungen gegen Isl1/2 (A, F, rot), MNR2 (B, G, rot) und Myc (J, blau) sowie *in situ* Hybridisierungen gegen *Lh2b* (C, H) und *cCst* (D, I) durchgeführt, GFP (A, B, E, F, J, grün) repräsentiert Cash1 exprimierende Zellen. Isl1/2 markiert sowohl dI3-Interneurone als auch Motoneurone, MNR2 dagegen ausschließlich letztere. Durch die ektopische Expression von Cash1-GFP werden vermehrt Isl1/2⁺ dI3-Interneurone gebildet (A), während das Expressionsmuster von MNR2 (Motoneurone) (B) unverändert bleibt. Die gleichzeitige Expression von Myc-Cst (GFP⁺/Myc⁺, türkis) (J) nach der Koelektroporation hat keinen messbaren Einfluss auf die Cash1-induzierte Bildung von dI3-Interneurone (E). Das endogene Cst-Expressionsmuster (D, I) sowie die Bildung der *Lh2b*⁺ dI1-Interneurone (C, H) bleiben nach beiden Elektroporationen unverändert.

Diese Ergebnisse unterstützen damit die Annahme, dass Cash1 bei der Bildung von dI3-Interneurone nicht mit Cst kooperiert. Die gleichzeitige ektopische Expression von Myc-Cst und Cash1-GFP hat, wie auch die Einzelektroporation von Cash1-GFP, zudem keinen Einfluss auf die Ausdehnung der Population der *Lh2b*⁺ dI1-Interneurone (Abb. 30C, H) oder das endogene Cst-Expressionsmuster (Abb. 30D, I), wodurch wiederum ausgeschlossen werden kann, dass durch die Überexpression von Myc-Cst ein Wechsel der subtypspezifizierenden Kompetenz von Cash1 hin zu dI1-Interneurone provoziert werden kann.

Zusammengefasst ergeben die Koelektroporationsexperimente mit Myc-Cst und Expressionsplasmiden der proneuralen Faktoren, dass das subtypspezifizierende Potential von Math1 in der Kombination mit Myc-Cst keiner regionalen oder Zellkontext gebundenen Beschrän-

kung mehr unterliegt. Auch wird die Anzahl der resultierenden dI1-Interneuronen, einhergehend mit der Expansion der Population über die gesamte dorso-ventrale Achse des Neuralrohres, im Vergleich zur Einzelelektroporation von *Math1*, erheblich gesteigert. Darüber hinaus kann weder ein messbarer Einfluss von *Myc-Cst* auf die Fähigkeit von *Ngn1* und *Cash1*, dI2- bzw. dI3-Interneuronen zu induzieren, festgestellt werden, noch werden durch die Kombination von *Ngn1* oder *Cash1* mit *Myc-Cst* ektopisch dI1-Interneuronen gebildet. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der nach der Koelektroporation von *Myc-Cst* und *Math1* beobachtete Effekt, aus einer spezifischen Kooperation dieser beiden Faktoren bei der Generierung von dI1-Interneuronen resultiert. Zudem kann ausgeschlossen werden, dass die Expression von *Cst* durch die proneuralen Faktoren *Math1*, *Ngn1* oder *Cash1* reguliert wird, da das endogene *Cst*-Expressionsmuster in allen *in ovo* Elektroporationsexperimenten unverändert bleibt.

3.7 Regulation der *Cst*-Expression

Die Entschlüsselung der Rolle des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Cst* innerhalb der Proliferations- und Differenzierungsprozesse während der Musterbildung im dorsalen Neuralrohr beinhaltet auch die Untersuchung der regulatorischen Mechanismen, denen die Expression von *Cst* unterworfen ist. Einen ersten Hinweis geben die Ergebnisse der vorangegangenen *in ovo* Elektroporationsexperimente mit proneuralen Faktoren, die zeigen, dass die Regulation der endogenen *Cst*-Expression nicht den bHLH-Transkriptionsfaktoren *Math1*, *Ngn1* oder *Cash1* unterliegt. Es ist also möglich, dass die Expression von *Cst* durch Faktoren gesteuert wird, die in der Hierarchie der Musterbildungsprozesse höher gestellt sind als proneurale Transkriptionsfaktoren. Näher betrachtet liegt die dorsale Expressionsdomäne von *Cst* (dP1-dP3) in einem Bereich des Neuralrohrs, in dem in der Dachplatte exprimierte und sezerniert Signalmoleküle der *Bmp*- und *Wnt*-Familien die Spezifizierung und das Wachstum dorsaler Zellgruppen kontrollieren (Chesnutt *et al.*, 2004, Wine-Lee *et al.*, 2004, Muroyama *et al.*, 2002). Die Analyse der nun folgenden *in ovo* Elektroporationsexperimente und Genverlustmutanten mittels Antikörper-Färbung (2.8.2) und *whole mount*- (2.3.4) oder *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten (2.3.5) sollen Aufschluss darüber geben, ob diese Signale aus der Dachplatte auch in die Regulation der *Cst*-Expression involviert sind.

3.7.1 Regulation der *Cst*-Expression durch Signalmoleküle aus der Dachplatte

Von der Dachplatte ausgehende Bmp-Signale induzieren zum einen die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wie Pax7, Msx1/2, Zic1 und Cath1 oder Ngn1 (Liem *et al.*, 1997, Timmer *et al.*, 2002, Panchision *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 1997, Aruga *et al.*, 2002) und werden zum anderen mit der Regulation der Expression von Wnt1 und Wnt3a, Signalmoleküle die ebenfalls in der Dachplatte gebildet und von dort sezerniert werden, in Verbindung gebracht (Marcelle *et al.*, 1997, Panchision *et al.*, 2001, Chesnutt *et al.*, 2004). Ein Inhibitor der Bmp-Signaltransduktion ist der sekretierte Faktor Noggin (Zimmermann *et al.*, 1996, Capdevila *et al.*, 1998), der durch direkte physikalische Wechselwirkung mit den verschiedenen, in der Dachplatte produzierten Bmp-Proteinen eine Interaktion mit deren Rezeptoren verhindert und damit den Fortlauf der Signalkaskade unterbricht (Chesnutt *et al.*, 2004). In Übereinstimmung damit ist 24 h nach der *in ovo* Elektroporation eines Noggin-Expressionsplasmides, koelektroporiert mit einem GFP-Expressionsvektor (Tabelle 3) als Marker für elektroporierte Zellen, zu beobachten (Abb. 31A), dass die Expression des Bmp-Zielgens *Msx1* im Vergleich zur wildtypischen Seite des Neuralrohres drastisch reduziert ist (Abb. 31C).

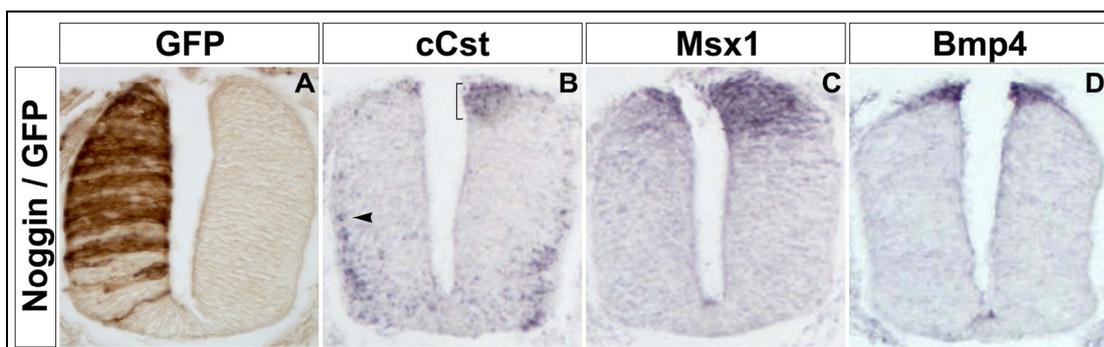


Abb. 31: Regulation der *Cst*-Expression durch Signalmoleküle aus der Dachplatte.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffinschnitte (14 μm) von Embryonen des Stadiums HH18 24 h nach der Koelektroporation mit Noggin und GFP. Es wurden Antikörperfärbungen gegen GFP (A) sowie *in situ* Hybridisierungen gegen *cCst* (B), *Msx1* (C) und *Bmp4* (D) durchgeführt. Durch die GFP-Expression wird der Bereich markiert in dem auch die sezernierten Noggin-Proteine wirksam sein sollten. Die GFP-Expression wird als Richtwert für den von der Elektroporation betroffenen Bereich des Neuralrohres betrachtet, indem die, nicht wie GFP kernlokalisierten, sondern sezernierten und damit nicht-zellautonom agierenden Noggin-Proteine potentiell ihre inhibitorische Wirkung auf die Bmp-Signaltransduktion entfalten. Die Expression des Bmp-Zielgens *Msx1* (C) ist wie die *Cst*-Expression in den dorsal gelegenen Vorläuferzellen (B, Klammer) drastisch reduziert. Hingegen ist die Expression von *Cst* in den weiter medial und ventral gelegenen, kürzlich gebildeten Neuronen unverändert (B, Pfeilspitze). Ebenso wird *Bmp4* weiterhin in den Zellen der Dachplatte exprimiert (D).

Tatsächlich führt die ektopische Expression von Noggin ebenso zu einem Verlust der *Cst*-Expression in den dorsal gelegenen Vorläuferzellen (Abb. 31B, Klammer), wohingegen jüngst gebildete Neuronen in medialen und ventralen Bereichen des Neuralrohres die Expression von *Cst* fortsetzen (Abb. 31B, Pfeilspitze), obwohl auch Zellen dieser Region die Expressionsplasmide aufgenommen haben, wie durch die repräsentative Expression des koelektroporierten GFP angezeigt wird. Entsprechend unabhängig von der Bindung der Noggin-Proteine an die gleichermaßen sezernierten Bmp-Faktoren und der daraus resultierenden Inhibition der Bmp-Signaltransduktion, wird dagegen die Transkription des *Bmp4*-Gens in den Zellen der Dachplatte aufrecht erhalten (Abb. 31D). Wie diese Ergebnisse zeigen, führt die ektopische Expression von Noggin zu einem Verlust der *Cst*-Expression in dorsalen Vorläuferzellen, woraus geschlossen werden kann, dass die von der Dachplatte ausgehende Signaltransduktion für die Aufrechterhaltung der Expression von *Cst* in Zellen dorsaler Vorläuferpopulationen notwendig ist. Da Bmps aber nicht nur direkt die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren induzieren, sondern auch die Expression der Wnt-Signalmoleküle regulieren (Marcelle *et al.*, 1997, Liem *et al.*, 1995, Panchision *et al.*, 2001), wird im Folgenden analysiert, ob für die Aufrechterhaltung der Expression von *Cst* in den dorsalen Vorläuferzellen des Neuralrohres Wnt-Signale notwendig sind.

3.7.2 Einfluss von Wnt auf die *Cst*-Expression

Die neben den Bmp-Faktoren in der Dachplatte generierten, sezernierten Signalmoleküle der Wnt-Familie, Wnt1 und Wnt3a, nehmen vor allem durch eine mitogene Wirkungsweise Anteil an der fein abgestimmten Koordination von Wachstum und Zelltypspezifizierung der verschiedenen, im dorsalen Neuralrohr entstehenden Populationen von Vorläuferzellen und Interneuronen. Die Analyse von Verlustmutanten (Muroyama *et al.*, 2002) und die Ergebnisse ektopischer Wnt-Expression (Megason *et al.*, 2002, Chesnutt *et al.*, 2004) oder Wnt-Signaltransduktion (Megason *et al.*, 2002, Zechner *et al.*, 2003) in Mäuse- (Dickinson *et al.*, 1994) und Hühnerembryonen untermauern die Annahme, dass Wnt-Signale aus der Dachplatte im Gegensatz zu Bmps keinen direkten Einfluss auf die Spezifizierung von dorsalen Interneuronen nehmen, sondern durch Regulation des Zell-Zyklus die Proliferation und das Wachstum dorsaler Zellpopulationen koordinieren. Neuere Studien zeigen darüber hinaus, dass durch Wnt-Signale aber auch die Expression des bHLH-Faktors Olig3 in den dorsalen Vorläuferzellen der Klasse A-Interneuronen reguliert wird, womit auch ein Einfluss auf die Bildung distinkter Vorläuferpopulationen verbunden ist (Müller *et al.*, 2005, Zechner *et al.*,

2007). Die Ergebnisse der folgenden Experimente sollen nun dazu beitragen die Frage zu beantworten, ob ebenso die Expression von *Cst*, durch Wnt-Signale reguliert wird. Die Analyse von *Wnt1*^{-/-};*Wnt3a*^{-/-}-Verlustmutanten hat bereits ergeben, dass die *Math1* exprimierenden dP1- und *Ngn1* exprimierenden dP2-Vorläuferzellpopulationen im Vergleich zum Wildtyp drastisch verkleinert sind und die *Mash1*-Expressionsdomäne (dP3-dP5) stattdessen in dorsale Richtung expandiert (Muroyama *et al.*, 2002). Im weiteren wird der Verlust von *Lh2b*⁺ dI1-Interneuronen beobachtet und die signifikante Reduktion der *Isl1/2*⁺ dI3 Population in Kombination mit einer deutlichen Zunahme von *Lim1/2*⁺ bzw. *Pax2*⁺ dI4 oder dI6-Interneuronen lässt vermuten, dass trotz der Erweiterung der *Mash1*-Expressionsdomäne die Gruppe der dP3-Vorläuferzellen ebenfalls minimiert ist. Einhergehend mit der Beobachtung, dass die verschiedenen dorsalen Vorläuferzellpopulationen durchaus angelegt werden und nur ihre Größe in Abhängigkeit vom Verlust der *Wnt1*- und *Wnt3a*-Signaltransduktion variiert, kann anhand von Schnittpräparaten (2.7.1) *whole mount in situ* hybridisierter Embryonen (2.3.4) gezeigt werden, dass auch eine Expression von *Cst* in den dorsalen Vorläuferzellen der *Wnt1*^{-/-};*Wnt3a*^{-/-} mutanten Embryonen vorhanden ist (Abb. 32A) auch wenn die Expressionsdomäne in Korrelation mit den geringeren Populationsgrößen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 32B) verkleinert ist.

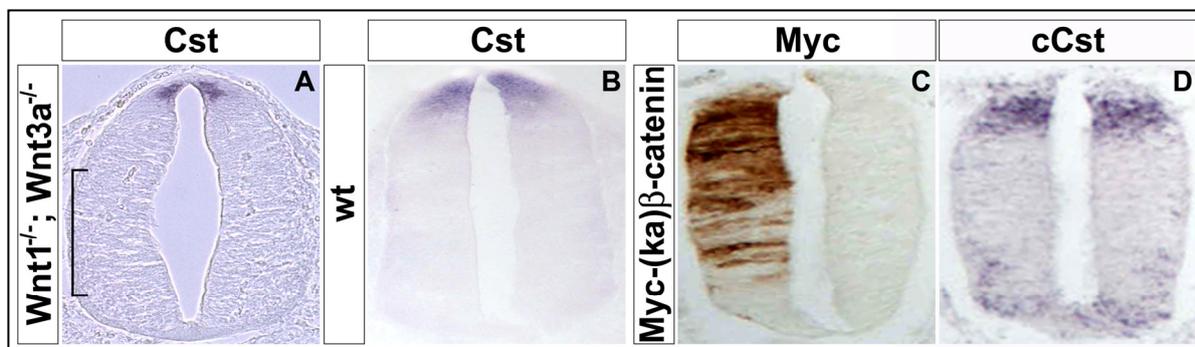


Abb. 32: Einfluss der Wnt-Signaltransduktion auf die Expression von *Cst*.

Die Abbildung zeigt die transversalen Kryoschnitte (25 µm) eines *Wnt1*^{-/-};*Wnt3a*^{-/-} mutanten (A) und eines wildtypischen Embryos (B) im Stadium E10,5 nach der *whole mount in situ* Hybridisierung gegen *Cst* und Paraffinschnitte (14 µm) von Embryonen des Stadiums HH18 24 h nach der Elektroporation mit *Myc*-(ka)β-catenin. Es wurden Antikörperfärbungen gegen *Myc* (C) sowie *in situ* Hybridisierungen gegen *cCst* (D) durchgeführt. Auch ohne *Wnt1* und *Wnt3a* Signale aus der Dachplatte bleibt die Expression von *Cst* in den noch vorhandenen dorsalen Vorläuferzellen erhalten (A). Weiter ventral gelegene Bereiche der *Cst*-Expressionsdomäne sind mit dieser Methode nicht detektierbar (A, Klammer, B). Dagegen wird nach der ektopische Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch die Elektroporation von *Myc*-(ka)β-catenin (C) keine Veränderung der *Cst*-Expression beobachtet (D).

Die weiter ventral gelegenen Bereiche der *Cst*-Expressionsdomäne sind dagegen sowohl im wildtypischen (Abb. 32B) als auch in *Wnt1*^{-/-};*Wnt3a*^{-/-} mutanten Embryonen nicht detektierbar (Abb. 32A, Klammer). Allerdings konnten diese Expressionsdomänen auch zuvor schon nicht

mit der Methode der *whole mount in situ* Hybridisierung dargestellt werden (le Viseur, 2002). Weiteren Aufschluss über den Einfluss der Wnt-Signaltransduktion auf die *Cst*-Expression im Neuralrohr geben im folgenden die Ergebnisse der *in ovo* Elektroporationsexperimente mit einer konstitutiv aktiven (ka) Form β -catenins, dessen Expression die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade simuliert und somit die transkriptionelle Regulation der Wnt-Zielgene bewirkt (Megason *et al.*, 2002, Zechner *et al.*, 2003). Wie in Abb. 32C und D dargestellt ist, hat die ektopische Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion durch die Elektroporation eines Myc-(ka) β -catenin-Konstruktes (Abb. 32C) keinen Einfluss auf die endogene Expression von *Cst* (Abb. 32D).

Bisher konnte also gezeigt werden, dass die Expression von *Cst* in Vorläuferzellen des dorsalen Neuralrohres sowohl bei einem Verlust der Signalmoleküle Wnt1 und Wnt3a fortgesetzt wird, als auch trotz ektopischer Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade unverändert bleibt. Diese Ergebnisse legen daher den Schluss nahe, dass von der Dachplatte ausgehende Signalmoleküle der Wnt-Familie weder für die Induktion noch für die Aufrechterhaltung der *Cst*-Expression notwendig sind. Der zuvor, nach der ektopischen Expression von Noggin beobachtete Verlust der *Cst*-Expression in den dorsalen Vorläuferzellen, ist daher auf die Inhibierung der Bmp-Signaltransduktion zurückzuführen.

3.7.3 Einfluss der Bmp-Signaltransduktion auf die *Cst*-Expression

Der Einfluss der von der Dachplatte ausgehenden Bmp-Signale auf die Musterbildung und das Differenzierungs- und Proliferationsverhalten von Zellen im dorsalen Neuralrohr wird durch sogenannte Bmp Rezeptoren (BmpR) vermittelt. So führt die gleichzeitige, mutationsbedingte Inaktivierung der Bmp Rezeptoren 1a und 1b in Mausembryonen u.a. zum Verlust von dP1-Vorläuferzellen und dI1- und dI2-Interneuronen (Wine-Lee *et al.*, 2004), während die ektopische Expression einer konstitutiv aktiven (ka) Form eines der beiden Rezeptoren in Hühnerembryonen ausreichend ist, um zell-autonom die Expression von Bmp-Zielgenen wie *Msx1* und *Msx2* zu induzieren oder die Population der *Cath1* exprimierenden dP1-Vorläuferzellen zu vergrößern (Timmer *et al.*, 2002). Damit vergleichbar sind die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten *in ovo* Elektroporationsexperimente mit einem (ka)BmpR1b-Konstrukt. Entsprechend der ektopischen Expression des (ka)BmpR1b, detektierbar durch das koelektroporierte GFP-Expressionsplasmid (Abb. 33A), wird über die gesamte Länge der dorso-ventralen Achse die Expression des Bmp-Zielgens *Msx1* (Abb. 33C)

und begrenzt auf das dorsale Drittel des Neuralrohres auch die Expression von *Msx2* (Abb. 33D) induziert. Tatsächlich führt die Aktivität des (ka)BmpR1b ebenfalls zur Ausdehnung der dorsalen Expressionsdomäne von *Cst* (Abb. 33B), jedoch erstreckt sich die ektopisch induzierte Transkription auch in diesem Fall nicht bis in die ventrale Hälfte des Neuralrohres. Dieses Ergebnis zeigt also, dass Bmp-Signale ausreichend sind, die Expression von *Cst* in dorsalen Vorläuferzellen zu induzieren.

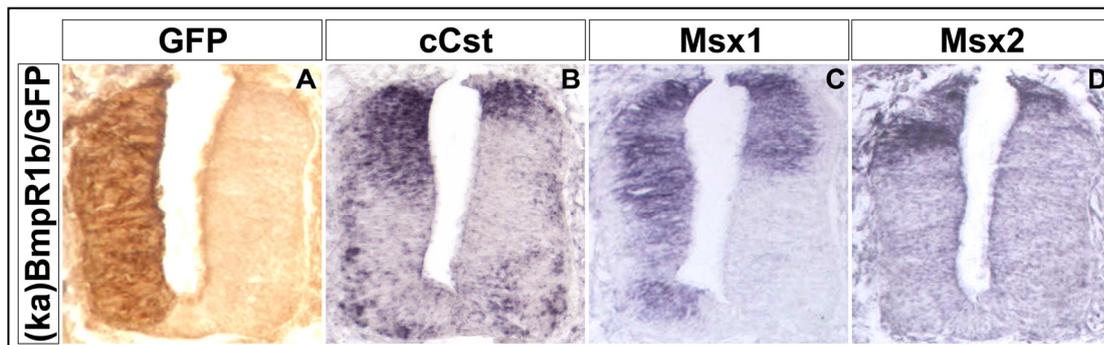


Abb. 33: Einfluss der Bmp-Signaltransduktion auf die *Cst*-Expression.

Die Abbildung zeigt transversale Paraffinschnitte (14 µm) von Embryonen des Stadiums HH18 24 h nach der Koelektroporation mit (ka)BmpR1b und GFP. Es wurden Antikörperfärbungen gegen GFP (A) sowie *in situ* Hybridisierungen gegen *cCst* (B), *Msx1* (C) und *Msx2* (D) durchgeführt. Die GFP-Expression markiert den Bereich in dem auch der zell-autonom wirkende (ka)BmpR1b exprimiert wird und die Bmp-Signalkaskade aktiviert. Die Expression des Bmp-Zielgens *Msx1* (C) wird in Korrelation mit der Aktivität des (ka)BmpR1b über die gesamte Länge der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres induziert. Die Expressionsdomänen von *Msx2* (D) und *cCst* (B) expandieren zwar ebenfalls, bleiben aber dennoch auf die dorsale Hälfte des Neuralrohres begrenzt.

Zusammengefasst ergeben die Analysen der *Wnt1*^{-/-}; *3a*^{-/-} Verlustmutanten und die Ergebnisse der *in ovo* Elektroporationsexperimente mit Noggin, (ka)β-catenin und (ka)BmpR1b, dass für die Regulation der Expression von *Cst* in den dorsalen Vorläuferzellen des Neuralrohres die Bmp-Signale der Dachplatte unabhängig von der Wnt-Signaltransduktion sowohl notwendig als auch hinreichend sind.

4 DISKUSSION

Es ist ein Thema der Entwicklungsbiologie aufzuklären, welche Mechanismen und Faktoren im umfangreichen Netzwerk der Musterbildung zusammenwirken und die Etablierung geordneter Gewebe- und Organstrukturen gewährleisten. Auch die Entwicklung des Zentralnervensystems beinhaltet die zeitlich und räumlich fein abgestimmte Bildung zahlreicher verschiedener neuronaler Zelltypen und die dorso-ventrale Musterbildung des Neuralrohres ist in diesem Zusammenhang ein interessantes Modell, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die den Musterbildungsprozessen zu Grunde liegen.

Im dorsalen Neuralrohr basiert die Spezifizierung der verschiedenen Neuronen entlang der dorso-ventralen Achse u.a. darauf, dass von der Dachplatte als Signalzentrum Signalmoleküle der TGF- β -Superfamilie sezerniert werden (Lee *et al.*, 1999, Liem *et al.*, 1995, Liem *et al.*, 1997), durch deren konzentrationsbezogene Wirkung das Genexpressionsverhalten von Vorläuferzellen in unterschiedliche Bahnen gelenkt wird (Müller *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 1998, Ma *et al.*, 1996, Sommer *et al.*, 1996, Timmer *et al.*, 2002). Charakteristisch für die betroffenen Vorläuferzellen entlang der dorso-ventralen Achse wird damit die Expression verschiedener bHLH- und HD-Transkriptionsfaktoren, deren wechselseitige inhibierende Wirkung die Ausbildung distinkter Vorläuferpopulationen manifestiert (Nakada *et al.*, 2004, Gowan *et al.*, 2001, Bermingham *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 1998, Helms *et al.*, 1998, Akazawa *et al.*, 1995, Ma *et al.*, 1996, Ma *et al.*, 1997, Perez *et al.*, 1999, Johnson *et al.*, 1990, Jasoni *et al.*, 1994). Die unterschiedlichen, spezifischen Genexpressionsmuster der verschiedenen Vorläuferpopulationen dienen aber nicht nur der Abgrenzung der einzelnen Domänen, sondern sind darüber hinaus eine essentielle Grundlage für die anschließende Differenzierung der Vorläuferzellen und Subtypspezifizierung der entstehenden dorsalen Interneuronen (Roelink *et al.*, 1995, Dodd *et al.*, 1998, Ericson *et al.*, 1997). Parallel dazu reguliert die von den TGF- β -Molekülen ausgelöste Signaltransduktion auch noch die Expression solcher Faktoren, die sowohl die Proliferations- als auch die Differenzierungsrate von Vorläuferzellen beeinflussen und verknüpft dadurch die bisher genannten Mechanismen der Musterbildung noch mit einer zeitlichen Komponente (Liem *et al.*, 1995, Marcelle *et al.*, 1997, Panchision *et al.*, 2001, Dickinson *et al.*, 1994, Megason *et al.*, 2002, Hu *et al.*, 2001, Timmer *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004,). Mit der Erforschung der Musterbildung im dorsalen Neuralrohr wurden zwar schon einige der beteiligten Faktoren und ihre Funktion identifiziert und charakterisiert, es gibt dar-

über hinaus aber auch noch diverse unaufgeklärte Aspekte und Hinweise auf weitere, bislang unbekannte Faktoren.

Der Identifizierung weiterer Kandidatengene dient oftmals die Klonierung *Drosophila* verwandter, entwicklungsrelevanter Kontrollgene. So ist der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Castor in *Drosophila* einer von mehreren Faktoren, die während der Neurogenese dazu beitragen das Schicksal neuronaler Vorläuferzellen und deren Nachkommen zeitlich koordiniert zu determinieren. Der Verlust von Castor führt zudem zu einer Unterentwicklung des Zentralnervensystems von *Drosophila* (Kambadur *et al.*, 1998, Brody *et al.*, 2000, Isshiki *et al.*, 2001). Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. T. Theil ein Gen *Cst* der Maus identifiziert, das weitreichende Homologien zu den Zinkfinger-Domänen des Castor-Proteins aus *Drosophila* aufweist und ersten Untersuchungen zu Folge, neben der Entwicklung des Herzens auch während der Neurogenese exprimiert wird (Hurtado *et al.*, 2002). Gerade der Befund, dass *Cst* in Mäusen während der Embryonalentwicklung sowohl im Neuralrohr als auch im Telencephalon und den wandernden faszialen Brancio-Motorneuronen exprimiert wird, hat die Vermutung nahe gelegt, dass *Cst* eine wichtige Funktion bei der Regulation neuronaler Subtypspezifizierung, sowie bei der Differenzierung und der Kontrolle wandernder neuronaler Zellen ausüben könnte (Hurtado *et al.*, 2002). Im Weiteren konnte tatsächlich anhand erster Überexpressionsstudien ermittelt werden, dass die ektopische Expression eines deletierten *Cst*-Konstruktes im Neuralrohr von Hühnchen Vorläuferzellen zur Differenzierung veranlasst. Jedoch konnte darüber hinaus eine Beeinflussung der neuronalen Identität differenzierter Neuronen durch *Cst* nicht nachgewiesen werden (le Viseur, 2002).

Die fortgesetzte Suche nach Sequenzen in embryonalen cDNA-Banken und die Identifizierung neuerer EST-Klone ergab zunächst weitere überlappende Klone des Gens der Maus, des Menschen, sowie einen einzelnen Hühnchen-Klon (Dr. T. Theil, persönliche Mitteilung, le Viseur, 2002). Den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller Spezies ist gemein, dass vier der typischen *Cst*-Motive (C₂-H₂C₂-H₂) in einer zentralen Domäne angeordnet sind, durch die das Castor-Protein aus *Drosophila* von anderen Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren unterschieden werden kann. Darüber hinaus beinhalten die postulierten Proteine von Maus und Mensch im C-terminalen Bereich ein zusätzliches, annähernd vollständiges fünftes *Cst*-Motiv (C-H₂C₂-H₂). Ausgehend vom Grad der Konservierung der Aminosäuresequenzen der *Cst*-Motive zwischen *Drosophila*, Mensch, Maus und Huhn, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten analysiert, ob die Zinkfinger-Domäne des *Cst*-Proteins der Maus die gleiche DNA-Bindungsspezifität aufweist wie die von Castor in *Dro-*

sophila. Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, können die zentralen Cst-Motive 1-4 des Mausproteins *in vitro* nicht nur grundsätzlich an DNA binden, sondern besitzen tatsächlich darüber hinaus eine größere Affinität zu der aus *Drosophila* bekannten Castor-Zielsequenz als zu alternativ angebotenen anderen Sequenzen (3.4.2). Die signifikante Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen innerhalb der Cst-Motive und die kongruente, Spezies übergreifende Bindungsspezifität für die bekannte Castor Zielsequenz, unterstützen die Annahme, dass mit *Cst* das zu *castor* homologe Gen in Vertebraten gefunden wurde. Damit ist es durchaus möglich, dass, wie auch schon durch die Ergebnisse der ersten Untersuchungen nahe gelegt wurde, *Cst* ebenso wie *Castor* in *Drosophila* an der Neurogenese beteiligt sein könnte und eine nähere Charakterisierung dazu beizutragen kann, die molekularen Prozesse der Entwicklung von Vertebraten detaillierter zu ergründen. Es war daher von Interesse, die Funktion von *Cst* während der Musterbildung intensiver zu analysieren und wenn möglich mit bereits bekannten Faktoren und Mechanismen in Verbindung zu bringen. Die Beobachtungen aus den in dieser Arbeit durchgeführten Überexpressionsstudien und Expressionsanalysen von *Cst* in wildtypischen Embryonen und Verlustmutanten erlauben, dass *Cst* in die Hierarchie der von der Dachplatte ausgehenden Signaltransduktion zur dorso-ventralen Musterbildung eingeordnet werden kann und legen eine Beteiligung sowohl an der Kontrolle neuronaler Differenzierung als auch der Regulation neuronaler Zelldifferenzierung nahe.

Während der Erstellung der vorliegenden Arbeit konnte durch weiterführende Sequenzanalysen und neuere Veröffentlichungen von EST-Klonen in der Arbeitsgruppe von Dr. T. Theil eine alternative *Cst*-Isoform der Maus ermittelt werden. Diese ist soweit mit der anfänglich vorgestellten Form von *Cst* identisch, umfasst aber zusätzlich zu den bereits bekannten, für *Cst* typischen fünf Zinkfinger-Motiven sechs weitere und damit insgesamt elf der C₂-H₂C₂-H₂-Elemente. Durch *Northern Blot* Analysen wurde bestätigt, dass während der Embryogenese der Maus zwei alternative *Cst*-Transkripte gebildet werden, deren unterschiedliche Größen mit der Länge der Sequenzen korrelieren, die für die fünf bzw. die elf Zinkfinger-Form von *Cst* kodieren (persönliche Mitteilung Dr. T. Theil). Zur Charakterisierung der alternativen Isoform durchgeführte *whole mount* sowie *in situ* Hybridisierungen an freipräparierten Gehirnen von Mausembryonen verschiedener Entwicklungsstadien haben gezeigt, dass die elf Zinkfinger Form von *Cst* in nahezu allen Bereichen des bisher publizierten Expressionsmusters (Hurtado *et al.*, 2002) nachweisbar ist (Lieven, 2004). Jedoch konnte in den trigeminalen Motoneuronen keine Expression dieser Isoform von *Cst* detektiert werden und in den Hinterwurzelganglien erst zu einem späteren Zeitpunkt als zuvor veröffentlicht. Die differentielle Darstellung der Expression allein der fünf Zinkfinger Form von *Cst* unabhängig von der län-

geren Version mittels *whole mount in situ* Hybridisierung war dagegen bisher nur äußerst eingeschränkt, im dorso-medialen Telencephalon und der Augenanlage möglich (Lieven, 2004). Dadurch wird zum einen zwar angedeutet, dass sich die Expression beider Isoformen überschneiden kann, zum anderen wird das bekannte *Cst*-Expressionsmuster insgesamt aber nicht vollständig reproduziert. Da für die Detektion der fünf Zinkfinger Form von *Cst* wegen der massiven Sequenzhomologien zwischen den beiden Isoformen nur ein relativ kleiner Sequenzabschnitt in dem, im allgemeinen sekundärstrukturreichen, untranslatierten 3'-Bereich des kürzeren Transkriptes zur Verfügung steht, wird vermutet, dass dieses Stück der Sequenz und damit auch die *whole mount in situ* Hybridisierung wahrscheinlich nicht hinreichend geeignet ist, zuverlässig und spezifisch das gesamte Expressionsmuster der kurzen *Cst*-Isoform darzustellen (Lieven, 2004). So legen die Ergebnisse zwar nahe, dass während der Embryonalentwicklung von Mäusen vornehmlich die lange Isoform von *Cst* exprimiert wird, schließen ohne eine weitere Verifizierung aber eine parallele oder eine im Mindestmaß partiell überlappende Expression der fünf Zinkfinger Form auch nicht aus. Eine experimentelle Strategie, um im Ansatz zu ergründen, ob und wenn ja welche der beiden nun bekannten *Cst*-Isoformen in den unterschiedlichen Bereichen des bisher beschriebenen *Cst*-Expressionsmusters repräsentiert ist, basiert auf der, im Vergleich zur *whole mount in situ* Hybridisierung weitaus sensitiveren Methode der RT-PCR. Mittels verschiedener, sequenzspezifischer Oligonukleotide könnten in sowohl präzise gewebe- als auch stadienspezifisch isolierter RNA auch kleinste Mengen der beiden bekannten Transkriptvarianten von *Cst* getrennt voneinander nachgewiesen werden. Alternativ dazu könnten auch weiterführende *Northern Blot* Analysen der nach den verschiedenen Gesichtspunkten isolierten RNA helfen, dass differenzielle Expressionsmuster der beiden *Cst*-Isoformen näher aufzuschlüsseln und so eventuell Hinweise darauf zu erlangen, welche Rolle diese Isoformen während der Embryonalentwicklung zu Teil wird. Allerdings wird es sowohl schwierig sein, die betreffenden, relativ kleinen embryonalen Gewebe exakt zu präparieren als auch anschließend daraus ausreichende Mengen RNA für die Analyse zu isolieren. Bereits in der Arbeitsgruppe von Dr. T. Theil durchgeführte Überexpressionsexperimente zur Untersuchung der Funktion der elf Zinkfinger umfassenden Isoform von *Cst* zeigen im Weiteren, dass diese lange *Cst*-Form ein ähnliches Potential besitzt, neuronale Differenzierung zu fördern (Lieven, 2004), wie die schon zuvor (le Viseur, 2002) und vornehmlich in dieser Arbeit untersuchte fünf Zinkfinger Form von *Cst*. Auch die ektopische Expression eines Myc-Tag versehenen Konstruktes der langen *Cst*-Form durch *in ovo* Elektroporation führt dazu, dass nach 48 h der größere Anteil Myc^+ Zellen die ventrikuläre Zone des Neuralrohres verlassen hat und ebenfalls p27 oder für

differenzierte Neuronen charakteristische Marker exprimiert, ohne aber darüber hinaus nachweisbar Einfluss auf die Subtypspezifizierung der entstehenden Neuronen zu nehmen (Lieven, 2004). Die im Rahmen der bisher durchgeführten Überexpressionsstudien gewonnenen Ergebnisse deuten demnach auf eine funktionelle Redundanz der beiden untersuchten *Cst*-Isoformen hin. Auch im Menschen wurde kürzlich zusätzlich zu dem bereits aus Sequenzdaten bekannten, für fünf Zinkfinger kodierenden Transkript des humanen *Cst*-Gens eine alternative Splice-Variante identifiziert, die wie die der Maus ebenfalls insgesamt elf der für *Cst* typischen C₂-H₂C₂-H₂-Motive umfasst (Liu *et al.*, 2006). Die Untersuchung verschiedener adulter Gewebe und humaner Zelllinien zeigt zum einen, dass auch postnatal mehrheitlich beide Transkripte parallel exprimiert werden und zum anderen, dass in ausgewählten Tumorzelllinien unter Differenzierung auslösenden Bedingungen die Transkriptionsrate von *Cst* massiv, um ein Vielfaches erhöht wird (Liu *et al.*, 2006). Diese Befunde sind eine interessante Erweiterung der bisher in verschiedenen Spezies durchgeführten Studien zur Charakterisierung der Funktion von *Cst* während der embryonalen Entwicklung und Neurogenese. Sie zeigen, dass die Expression von *Cst* gewebespezifisch auch postnatal erhalten bleibt und legen darüber hinaus nahe, dass die Funktion von *Cst* nicht nur für das reguläre Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten von Zellen wichtig ist, sondern, dass *Cst* dadurch unter Umständen auch einen Einfluss auf Prozesse der Karzinogenese ausüben könnte (Liu *et al.*, 2006). Diese weiterführenden Aspekte sind durchaus ein zusätzlicher Anreiz, die Funktion und Wirkungsweise von *Cst* näher zu charakterisieren und aufzudecken.

4.1 Die Expression von *Cst* im Neuralrohr von Vertebraten ist evolutionär konserviert

Nach ersten Untersuchungen der *Cst*-Expression im Neuralrohr durch *whole mount in situ* Hybridisierung wurde von le Viseur (2002) angenommen, dass die Expression von *Cst* in Mäuse- und Hühnerembryonen zwar ähnlich ist, sich aber dennoch in manchen Punkten unterscheidet. Die *Cst*-Expression wurde in Mausembryonen der Stadien E10,5 und E11,5 in den Vorläuferzellen der Populationen dP1 und dP2 detektiert und als gleich bleibend beschrieben. Dagegen wurde für Hühnerembryonen zum einen beobachtet, dass *Cst* während der vergleichbaren Entwicklungsstadien (HH20, HH22) nur im Bereich der dP1-Vorläuferzellen exprimiert wird, sich aber zum anderen die Expressionsdomäne im Verlauf der Entwicklung noch weiter ausdehnt und später (HH24) auch die dP2-Domäne umfasst. Eine Expression von

Cst in anderen Zellen oder Regionen des Neuralrohres als in den genannten Vorläuferpopulationen wurde nicht detektiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Expressionsmusters von *Cst* im Neuralrohr von Hühner- und Mausembryonen stützen sich auf *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen auf Paraffin- und Kryostatschnitten und ermöglichen eine präzisere und detailliertere Analyse als die Methode der *whole mount in situ* Hybridisierung. Dadurch konnte entgegen der bisherigen Annahme in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Cst* übereinstimmend sowohl in der Maus während der Stadien E10,5 und E11,5 als auch in Hühnchenembryonen gleicher Entwicklungsphasen kontinuierlich nicht nur in der dP1- sondern auch in der dP2-Domäne exprimiert wird. Zudem belegt die Antikörperfärbung gegen *Cst* und *Mash1*, dass die Expressionsbereiche der beiden Faktoren überlappen und einige Zellen im Grenzbereich der dorsalen *Mash1*-Expressionsdomäne gleichzeitig sowohl *Mash1* als auch *Cst* exprimieren. Dass die Expression von *Cst* aber nur in der dorsalsten Region der von dP3 bis dP5 reichenden *Mash1*-Expressionsdomäne detektiert wird, lässt vermuten, dass nur die Vorläuferzellen der dP3-Population *Cst* exprimieren. Da der gegen das Maus-Protein gerichtete, *Cst*-Antikörper das *Cst*-Protein im Hühnchen nicht detektiert, bleibt der Beweis, dass *Cst* auch hier in *Cash1*⁺-Zellen exprimiert wird, offen. Dennoch kann die Expression von *Cst* in diesen Vorläuferzellen als wahrscheinlich angenommen werden, da die Expressionsmuster in den beiden Spezies Maus und Huhn sowohl bezüglich ihrer Domänen als auch in ihrem Verlauf, nach einem Vergleich der gefärbten Schnittpräparate übereinstimmen. Das schließt die, erstmals im Rahmen dieser Arbeit detektierte Expression in jüngst gebildeten Neuronen im medio-lateralen und ventralen Bereich des Neuralrohres mit ein. Dass die räumlichen und zeitlichen Aspekte des Expressionsmusters in den verschiedenen untersuchten Spezies identisch sind, zeigt, dass die *Cst*-Expression evolutionär konserviert ist. Damit weist *Cst* eine Gemeinsamkeit mit zahlreichen anderen Genen wie z.B. den bereits beschriebenen bHLH- und HD-Transkriptionsfaktoren, *Bmps* oder *Shh* auf, deren Expression im Neuralrohr verschiedener Organismen ebenso konserviert vorzufinden ist (Ben-Arie et al., 1996, Diez del Corral et al., 2001, Hsieh, 2004). Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass die entsprechenden Faktoren in unterschiedlichen Spezies auch funktionell homolog wirken und der Musterbildung dienen, die in Vertebraten systematisch Parallelen aufweist und auf generell gleichen Mechanismen basiert (Lewis, 1996, Vetter et al., 2003, Alvarez-Medina et al., 2008, Timmer et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist die Annahme nahe liegend, dass auch *Cst* im Neuralrohr von Mäusen- und Hühnerembryonen die gleiche Funktion erfüllt, während gleichzeitig von Interesse ist, welche Position *Cst* im Gefüge der Musterbildung einnimmt.

4.2 Regulation der *Cst*-Expression durch Signale aus der Dachplatte

Eingebunden in die Entwicklung des Neuralrohres ist die Etablierung der verschiedenen neuronalen Zelltypen zum richtigen Zeitpunkt, in korrekter Anzahl und an definierter Position. Eine Voraussetzung dafür ist die Koordination der Programme, denen die Kontrolle der Proliferations- und Differenzierungsraten von Vorläuferzellen obliegt und den Prozessen der Subtypspezifizierung. Mehrere Studien untermauern die Wichtigkeit der Dachplatte für die Musterbildung im dorsalen Neuralrohr (Chizhikov *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2000, Manzanares *et al.*, 2000, Millonig *et al.*, 2000), und demonstrieren, dass den exprimierten Faktoren der Bmp- und Wnt-Familien eine essentielle Rolle bei dieser Koordination zugeschrieben werden kann (Chesnut *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004, Panchision *et al.*, 2001, Timmer *et al.*, 2002, Wine-Lee *et al.*, 2004). Zum einem gehören zu den bereits bekannten Zielgenen der Bmp-Signaltransduktion HD-Transkriptionsfaktoren der *Msx*- und Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren der *Zic*-Familie, durch deren Bmp-induzierte Expression in proliferierenden Vorläuferzellen die neuronale Differenzierung blockiert wird (Aruga *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004, Panchision *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 1997, Timmer *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu regulieren Bmps zum anderen aber auch die Expression der proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren wie *Math1* oder *Ngn1* (Chesnut *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004, Timmer *et al.*, 2002, Wine-Lee *et al.*, 2004), die ihrerseits sowohl notwendig als auch ausreichend sind, die Bildung neuronaler Zelllinien zu initiieren und neuronale Differenzierung zu fördern (Bertrand *et al.*, 2002). Darüber hinaus wird durch Bmps auch die Expression der Faktoren der Wnt-Familie kontrolliert (Chesnut *et al.*, 2004, Panchision *et al.*, 2001, Wine-Lee *et al.*, 2004), deren mitogene Wirkung wiederum zur Aufrechterhaltung des proliferativen Status der neuronalen Vorläuferzellen beiträgt (Megason *et al.*, 2002). Die Wnt-Signaltransduktion beeinflusst zudem noch die Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors *Olig3* und wirkt dadurch indirekt ebenfalls auf die Spezifizierung der dorsalen Interneuronen (Müller *et al.*, 2002, Müller *et al.*, 2005, Zechner *et al.*, 2007).

Die Dachplatte dirigiert also als ein übergeordnetes Signalzentrum die Musterbildung im dorsalen Neuralrohr durch die Regulation der Expression mehrerer verschiedener Faktoren, die für die Prozesse der Proliferation, Differenzierung und bzw. oder der Subtypspezifizierung unentbehrlich sind. In Bezug auf den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Cst*, der nach den bisherigen Erkenntnissen (diese Arbeit, Hurtado *et al.* 2002, le Viseur 2002, Cui *et al.*, 1992, Mellerick *et al.*, 1992, Isshiki *et al.*, 2001, Kambadur *et al.*, 1998) ein weiterer, potentiell an der

Musterbildung beteiligter Faktor ist, war daher die Frage nahe liegend, ob auch dessen Expression durch Signale aus der Dachplatte reguliert wird.

Die Ergebnisse der *in ovo* Elektroporationen mit Noggin, Myc-(ka) β -catenin und (ka)BmpR1b und die Analyse der $Wnt1^{-/-};Wnt3a^{-/-}$ -Verlustmutanten zusammengenommen bestätigen, dass die Signaltransduktion der Dachplatte auch die Expression von *Cst* in den Vorläuferzellen des dorsalen Neuralrohres reguliert. Der sekretierte Inhibitor Noggin bindet mehrere der in der Dachplatte gebildeten Bmps und verhindert dadurch deren Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren, wodurch eine Bmp-vermittelte Signaltransduktion unterbrochen wird (Chesnutt *et al.*, 2004). Nach der Überexpression von Noggin ist die *Cst*-Expression in den dorsalen Vorläuferpopulationen genauso drastisch reduziert wie die des bekannten Bmp-Zielgens *Msx1* (Abb. 31), ein Befund, der darauf hindeuten könnte, dass Bmps direkt in die *Cst*-Genregulation involviert sind. Eine geringfügige Expression in unmittelbarer Nähe der Dachplatte ist weiterhin sowohl für *Msx1* als auch *Cst* zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Konzentration der freien Bmp-Moleküle so nah am Ursprung der Sezernierung noch ausreichend ist, die Expression beider Gene zu aktivieren. Die Dachplatte bleibt, wie auch durch die *Bmp4*-Expression gezeigt, trotz der ektopischen Expression von Noggin in einer Hälfte des Neuralrohres, als Quelle der Bmp-Expression funktionell intakt. Neben der Interpretation, dass die Expression von *Cst* direkt durch Bmps beeinflusst wird, wäre es jedoch auch möglich, dass eine verminderte Wnt-Signaltransduktion zum Verlust der *Cst*-Expression geführt hat. Die drastische Reduktion der Bmp-Signaltransduktion durch Noggin kann auch zu einer Beeinträchtigung der ebenfalls Bmp-abhängigen *Wnt*-Expression in der Dachplatte führen und dadurch eine nachhaltige Verringerung der Wnt-Signaltransduktion zu Folge haben (Liem *et al.*, 1995, Marcelle *et al.*, 1997, Panchision *et al.*, 2001). Dagegen spricht jedoch deutlich, dass die Expression von *Cst* grundsätzlich in den dorsalen Vorläuferzellen der $Wnt1^{-/-};Wnt3a^{-/-}$ -Verlustmutanten erhalten bleibt (Abb. 32). Die geringe Ausdehnung der Expressionsdomäne kann mit der für diese Mutante typischen, verkleinerten Populationsgröße (Muroyama *et al.*, 2002) begründet werden. Auffällig ist dagegen, dass die weiter ventral gelegenen Bereiche der *Cst*-Expressionsdomäne nicht detektiert werden können. Dies gilt sowohl für die untersuchten mutanten als auch für die, der Kontrolle dienenden, wildtypischen Embryonen. Die Ursache dafür liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in der Methode der *whole mount in situ* Hybridisierung, der die Embryonen unterzogen wurden. Auch in früheren Arbeiten (le Viseur, 2002) war es nicht möglich, die medialen oder ventralen Anteile der Expressionsdomäne von *Cst* mittels dieser Methode nachzuweisen. Leider erlaubte die geringe Anzahl der $Wnt1^{-/-};3a^{-/-}$ mutanten Embryonen weder eine methodi-

sche Korrektur noch die Durchführung einer alternativen Analysestrategie. Trotzdem wird durch diese Untersuchung unterstrichen, dass nicht die Wnt-Signaltransduktion sondern eher die aus der Dachplatte stammenden Bmp-Signale eine notwendige Voraussetzung für die *Cst*-Expression im dorsalen Neuralrohr sind. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist im Gegensatz zu einer ektopischen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges (Abb. 32) die der Bmp-Signaltransduktion (Abb. 33) auch ausreichend, eine Ausdehnung der *Cst*-Expression im dorsalen Neuralrohr zu induzieren. Wie *Msx1* und *Msx2* ist auch die Expressionsdomäne von *Cst* nach der ektopischen Expression des konstitutiv aktiven Bmp-Rezeptors1b erweitert. Allerdings bleibt diese Erweiterung für *Cst* auf den dorsalen Bereich des Neuralrohres beschränkt, während *Msx1* über die gesamte dorso-ventrale Achse des Neuralrohres durch das zellautonom wirkende Bmp-Signal induziert wird. Gleichzeitig belegt die *Msx1*-Expression zum einen, dass durch die *in ovo* Elektroporation erfolgreich die gesamte dorso-ventrale Ausdehnung des Neuralrohres erfasst werden konnte und zum anderen, dass auch die Zellen der ventralen Hälfte des Neuralrohres die Kompetenz besitzen, das durch den aktiven Rezeptor simulierte Bmp-Signal zu interpretieren. Dass das Expressionsmuster von *Cst* in diesem Bereich unverändert bleibt, kann folglich bedeuten, dass hier außer Bmp entweder zusätzliche oder sogar gänzlich andere Faktoren die Expression von *Cst* kontrollieren. Da auch nach der Inhibierung der Bmp-Signaltransduktion durch Noggin keine Auswirkung auf die *Cst*-Expression in den ventralen Bereichen detektiert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass für die Expression von *Cst* in den jüngst gebildeten Neuronen, vielleicht einhergehend mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften von *Cst*, andere regulatorische Mechanismen vorliegen als in den dorsalen Vorläuferzellen. Ob der regulatorische Einfluss der Bmp-Signale auf die *Cst*-Expression in den dorsalen Vorläuferzellen zudem unmittelbar ist oder aber über Zwischenstufen erst nach der Expression weiterer, z.B. bereits bekannter Bmp-Zielgene oder noch nicht identifizierte Faktoren vermittelt wird, kann durch die bisherigen Experimente nicht bestimmt werden. Es ist allerdings möglich, einige Faktoren als potentielle Regulatoren auszuschließen. So stimmt zwar das Expressionsmuster der Bmp-Zielgene *Msx1* und *Msx2* sowohl wildtypisch als auch nach der Überexpression des kaBmpR1b mit dem von *Cst* in einigen Abschnitten überein, jedoch ist der Bereich der *Msx2*-Expression unter beiden Bedingungen kleiner als der von *Cst*, während die Expressionsdomäne von *Msx1* deutlich darüber hinausreicht. Damit käme *Msx1* zwar grundsätzlich in Frage, die Expression von *Cst* zu regulieren, diese Kombination würde aber zwangsläufig die Beteiligung weiterer Faktoren erfordern, von denen die aufgezeigte Begrenzung der *Cst*-Expression innerhalb der *Msx1*-Domäne abhängig wäre. Dass die *Cst*-Expression in manchen Bereichen der *Msx1*-

Expressionsdomäne ausbleibt, wäre dann entweder das Resultat einer lokalen Inhibierung durch gegenwärtige Faktoren oder aber durch das Fehlen notwendiger Kofaktoren zu erklären. Um zudem auch das Ergebnis der ektopischen Bmp-Signaltransduktion begründen zu können, müsste die Expression bzw. die Aktivität der Kofaktoren selbst wiederum Bmp-abhängig sein. Es ist daher nicht anzunehmen, dass die Expression von *Cst* allein von *Msx1* gesteuert wird. Daneben könnte die *Cst*-Expression stromabwärts von Bmp von Faktoren reguliert werden, die wie *Cst* auch die Differenzierung von Vorläuferzellen beeinflussen. Wie schon zuvor festgestellt wurde, wird *Cst* wie die proneuralen Gene *Math1*, *Ngn1* und *Mash1* in der Maus bzw. wie *Cath1*, *cNgn1* und *Cash1* im Hühnchen in den dorsalen Vorläuferzellen dI1-dI3 des Neuralrohres exprimiert (Abb. 11). Die Expression dieser bHLH-Transkriptionsfaktoren ist ebenfalls Bmp-abhängig und darüber hinaus eine sowohl notwendige wie zum Teil auch hinreichende Bedingung für die Differenzierung und weitere Subtypspezifizierung der entsprechenden Vorläuferzellen (Chesnutt *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004, Timmer *et al.*, 2002, Wine-Lee *et al.*, 2004, Bertrand *et al.*, 2002). Es wäre demnach denkbar, dass der Einfluss der Bmp-Signaltransduktion aus der Dachplatte auf die Expression von *Cst* in den Vorläuferzellen durch diese proneuralen bHLH-Faktoren vermittelt wird und weiter, dass *Cst* vielleicht beteiligt sein könnte, die durch die proneuralen Faktoren induzierte Differenzierung zu realisieren. Die Ergebnisse der Überexpressionsstudien von *Math1* (Abb. 27), *Ngn1* (Abb. 29) und *Cash1* (Abb. 30) zeigen jedoch, dass die Expression von *Cst* durch die ektopische Expression der proneuralen bHLH-Faktoren nicht verändert wird. Damit kann auch eine Vermittlung des Bmp-Signals durch die genannten Faktoren zur Regulation der *Cst*-Expression ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass für die Expression von *Cst* in den Vorläuferpopulationen des dorsalen Neuralrohres die Bmp-vermittelte Signaltransduktion der Dachplatte sowohl notwendig als auch hinreichend ist. Es bleibt aber an dieser Stelle offen, ob die Regulation der *Cst*-Expression durch Bmps direkt erfolgt oder durch noch unbekannte Faktoren vermittelt wird. Darüber hinaus gibt deutliche Hinweise darauf, dass die *Cst*-Expression unabhängig ist von anderen bereits bekannten Bmp-Zielgenen wie *Msx1* und *Msx2* oder den proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren *Math1*, *Ngn1* und *Cash1*, was die interessante Perspektive eröffnet, dass *Cst* als eine selbständige, effektive Komponente in die Koordination der Musterbildungsprozesse involviert sein könnte.

4.3 Cst fördert neuronale Differenzierung

Die ektopische Expression des Myc-Cst-Konstruktes führt dazu, dass 48 h nach der *in ovo* Elektroporation nahezu alle Myc-Cst exprimierenden Zellen den proliferativen Zustand abgeschlossen und die durch BrdU markierbare, ventrikuläre Zone des Neuralrohres verlassen haben. Stattdessen befindet sich die Mehrheit dieser Zellen nun weiter lateral, in der Mantelzone und exprimiert überwiegend die generell für postmitotische Neuronen typischen Marker wie p27 oder NeuN (Abb. 17) und wie weitere Untersuchungen zeigen auch die charakteristischen Marker für spezifische dorsale und ventrale Inter- und Motorneuronen (Abb. 18). Dagegen ist das zur Kontrolle elektroporierte GFP auch 48 h nach der induzierten Expression zwar ebenfalls schon in einigen postmitotischen Zellen, darüber hinaus aber hauptsächlich in der ventrikulären Zone detektierbar. Wie bereits mehrfach in verschiedenen Studien gezeigt wurde (Briscoe *et al.*, 2000, Götz, 2006, Lieven, 2004), hat die Expression von GFP keinen Einfluss auf die Musterbildung des Neuralrohres. Zellen, die ektopisch GFP exprimieren, fahren unbeeinträchtigt mit ihrem endogenen Proliferations- bzw. Differenzierungsprogramm fort und repräsentieren damit die durchschnittliche Verteilung der Zellen nach der Elektroporation. Einige der GFP⁺-Zellen beginnen innerhalb des betrachteten Zeitfensters von 48 h ganz regulär mit der Differenzierung, wandern von der ventrikulären Zone in die Mantelzone aus und können hier schließlich als postmitotische Neuronen identifiziert werden. Andere hingegen setzen ebenso konform mit den Mechanismen der Musterbildung kontinuierlich den Zellzyklus fort und verweilen dementsprechend in der ventrikulären Zone. Dies zeigt, dass nicht endogen festgelegt ist, ob proliferierende Zellen in der VZ zwangsläufig innerhalb von zwei Tagen den Zellzyklus verlassen, differenzieren und in die Mantelzone wandern müssen. Der Effekt, dass die Myc-Cst exprimierenden Zellen 48 h nach der Elektroporation entgegen dieser Feststellung dennoch die Proliferation beenden, differenzieren und mit der Migration in die Mantelzone beginnen, ist demnach auf den Einfluss von Cst zurückzuführen.

Diese differenzierungswirksame Eigenschaft legt nahe, dass mit Cst ein weiterer Kandidat identifiziert wurde, der in die Bmp-koordinierten Musterbildungsprozesse im Neuralrohr involviert ist.

4.3.1 Charakterisierung der durch Cst unterstützten neuronalen Differenzierung

Um genauer zu charakterisieren, welcher Mechanismus der differenzierungsfördernden Wirkung von Cst zugrunde liegt und um Cst genauer in die Hierarchie der Musterbildungsprozesse einordnen zu können, wurde der Einfluss der ektopischen Expression von Myc-Cst auf die Expression unterschiedlicher Schlüsselfaktoren der Differenzierung und Proliferation untersucht. Die Expression von *Cst* in den dorsalen Vorläuferzellen unterliegt zwar wie die der bHLH-Transkriptionsfaktoren *Math1*, *Ngn1* oder *Cash1* der Bmp-vermittelten Signaltransduktion der Dachplatte, wird aber nicht weiter durch diese proneuralen Faktoren beeinflusst. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die ektopische Expression von Myc-Cst Differenzierung begünstigt, könnte sein, dass Cst seinerseits die Expression der proneuralen Faktoren lenkt. Dies wäre zum einen indirekt, durch die Inhibierung von *Hes5* möglich, das seinerseits nicht nur die Expression der proneuralen Faktoren inhibiert sondern mit diesen auch die Bildung eines Repressorkomplexes initiiert, der auch die Expression ihrer Zielgene verhindert (Chen *et al.*, 1997, Davis *et al.*, 2001, Alifragis *et al.*, 1997, Sasai *et al.*, 1992). Zum anderen könnte Cst auch direkt die Expression der proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Die *in ovo* Elektroporation von Myc-Cst führt nach 24 h allerdings nicht zu einer Veränderung des Expressionsmusters von *Hes5*, *Ngn1* oder *Cash1* (Abb. 20) wodurch gezeigt wird, dass diese Vermutung nicht zutrifft. Unterstützt wird dagegen die Annahme, dass der Differenzierungseffekt von Cst nicht durch die Regulation der proneuralen Gene hervorgerufen wird auch dadurch, dass 48 h nach der ektopischen Expression von Myc-Cst keine Abweichung im Expressionsmuster interneuronentypischer Marker (Abb. 18) beobachtet werden kann. Da die bHLH-Faktoren in den dorsalen Vorläuferzellen nicht nur eine differenzierende Funktion erfüllen, sondern zudem noch die Subtypspezifizierung der entstehenden Neuronen lenken, hätte ein solcher Einfluss von Cst auch auf dieser Ebene Wirkung zeigen müssen. Auch wenn Cst nicht in die Genregulation der proneuralen Faktoren eingreift, wäre es daneben dennoch möglich, dass der von Cst ausgelöste Mechanismus zur Differenzierung in Anlehnung an die bHLH-Transkriptionsfaktoren auf ähnlichen Prinzipien aufbaut oder sich der gleichen Komponenten bedient. Nachdem jedoch durch die ektopische Expression von Myc-Cst die Expression von *NeuroM* und *Delta1*, die durch bHLH-Faktoren induziert werden, unverändert bleibt, erscheint auch dieser Fall kaum wahrscheinlich. Andererseits mehren sich dadurch aber wiederum die Anhaltspunkte für die Theorie, nach der Cst unabhängig von proneuralen Genen an der Kontrolle der Neurogenese beteiligt ist. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse weiterer Überexpressionsanalysen bestärkt. Danach basiert das differen-

zierungsfördernde Potential von Cst im Gegensatz zu Ngn1 nachweislich nicht auf der Inhibierung von Sox2 (Abb. 21), das normalerweise den proliferativen Zustand von Vorläuferzellen stabilisiert und neuronale Differenzierung unterdrückt (Bylund *et al.*, 2003, Graham *et al.*, 2003). Die diesbezüglich in dieser Arbeit durchgeführte Studie bestätigt, dass 20 h nach ekto-
pischer Expression durch Ngn1 bereits in nahezu der Hälfte der ausgewerteten Zellen Sox2 reprimiert wurde und Cst keinen relevanten Einfluss auf die Expression von Sox2 ausübt. Ebenso wenig ist der Einfluss von Cst auf die Expression von p27 mit dem der proneuralen Faktoren vergleichbar. p27 fungiert als ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK) und fördert als solcher, dass der Zellzyklus proliferierender Zellen abgeschlossen wird und im Anschluss daran die neuronale Differenzierung beginnen kann (Farah *et al.*, 2000, Polyak *et al.*, 1994, Helms *et al.*, 1998). Wie die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Überexpressionsstudie mit Math1- und Ngn1-GFP zeigt, ist ein durch diese proneuralen Faktoren hervorgerufener Effekt, dass die Expression von p27 induziert wird (Farah *et al.*, 2000, Bertrand *et al.*, 2002). Bereits 24 h nach der *in ovo* Elektroporation kann p27 zusätzlich in einer Vielzahl der ekto-
pisch Math1- oder Ngn1-GFP exprimierenden Zellen auch außerhalb seiner endogenen Expressionsdomäne, z.B. im dorsalen Bereich des Neuralrohres und nahe des Lumens detektiert werden. Dagegen wird zu diesem Zeitpunkt noch keine ekto-
pische Aktivierung der p27-Expression durch Myc-Cst beobachtet. Dem widerspricht auch nicht, dass die Mehrheit der Myc-Cst exprimierenden Zellen 48 h nach der *in ovo* Elektroporation dennoch p27⁺ sind, denn auch in dieser Phase wird keine Veränderung des Expressionsmusters von p27 offensichtlich. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass das endogene Programm der Zellen zur Expression von p27 nicht durch die ekto-
pische Expression von Myc-Cst beeinflusst wird und weiter charakteristisch bleibt für postmitotische neuroepitheliale Zellen und differenzierende Neuronen, während Cst demnach durch einen parallel verlaufenden Mechanismus, unabhängig von den proneuralen bHLH-Faktoren oder p27 die Differenzierung von Zellen herbeiführt. In diesem Zusammenhang wäre es auch denkbar, dass Cst alternativ zu p27 in das intrazelluläre Zellzyklusgeschehen eingreift, denn nicht nur die Inhibierung der CDKs durch p27 führt zum Abbruch des Zellzyklus, sondern auch der Verlust der entsprechenden Cycline wie CyclinB3, D1 oder D2 (Minshull *et al.*, 1989, Fantl *et al.*, 1999, Fantle *et al.*, 1995, Hu *et al.*, 2001). Der inhibierende Einfluss der bereits erwähnten Msx-Faktoren auf die Differenzierung basiert u.a. auch darauf, dass diese die Expression der zyklusrelevanten *Cycline* positiv regulieren und so den proliferativen Status der Zellen stabilisieren (Hu *et al.*, 2001). Es ist nicht anzunehmen, dass Cst die Expression von *Msx1* oder *Msx2* inhibiert, da auch nach der ekto-
pischen Aktivierung der Bmp-Signalkaskade durch die *in ovo* Elektropora-

tion des (ka)BmpR1b (Abb. 33) die Expressionsdomänen aller drei Gene expandieren und weiterhin überlappen. Cst hätte aber als ein potentieller Gegenspieler die Aktivität der Msx-Faktoren kompensieren und durch eine Inhibierung der *Cycline* den Differenzierungsprozess vorantreiben können. Jedoch bleiben die Expressionsmuster von *CyclinB3*, D1 und D2 (Abb. 20 und Daten nicht gezeigt) 24 h nach der Überexpression von Myc-Cst unverändert. Damit gibt es keinen bestätigenden Hinweis dafür, dass Cst an dieser Stelle in das Zellzyklusprogramm eingreifen könnte. Daneben hätte aber noch eine andere Möglichkeit bestanden, dass Cst auf dem Wege der Genregulation Einfluss nimmt auf den Ablauf von Zellzyklus und Differenzierung neuronaler Zellen. Der HLH-Faktor Id2 gilt neben den Mitgliedern der Hes-Familie als ein weiterer effektiver Inhibitor der Differenzierung und ist damit ein potentieller Kandidat auf dessen Expression Cst Einfluss nehmen könnte, um die Differenzierung von Vorläuferzellen zu fördern. Id2 bildet mit proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren Heterodimere, die nicht an DNA binden können, kompetiert mit den proneuralen bHLH-Proteinen um essentielle Kofaktoren und fördert die Fortsetzung der Proliferation zudem noch durch die Inhibierung von Rb-Proteinen (Martinsen *et al.*, 1998, Jen *et al.*, 1997, Norton, 2000). Da Id2 anders als Hes5 nur direkt mit den bHLH-Proteinen interagiert und keinen genregulatorischen Einfluss auf diese ausübt, wäre in Übereinstimmung mit den bisherigen Beobachtungen, die Genexpression der proneuralen Faktoren nicht betroffen, wenn die Überexpression von Myc-Cst zur einer Reprimierung der Expression von *Id2* führen würde. Andererseits würde mit einem Verlust der *Id2*-Expression auch die Konkurrenz um die Kofaktoren proneuraler Aktivität entfallen und dementsprechend die Expression genetisch stromabwärts gelegener Gene wie z.B. *NeuroM* zunehmen. Wie jedoch die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen auf Schnittpräparaten zeigen, kann 24 h nach der *in ovo* Elektroporation von Myc-Cst weder eine Veränderung der Expression von *NeuroM* noch der von *Id2* festgestellt werden. Die Vermutung, dass Cst durch einen genregulatorischen Einfluss auf *Id2* neuronale Differenzierung unterstützt, wird damit nicht bestätigt und *Id2* kann als ein direktes Zielgen der Cst-Aktivität ausgeschlossen werden.

Insgesamt liefern die Untersuchungen zum Einfluss der ektopischen Expression von Myc-Cst auf die Expression verschiedener Schlüsselfaktoren der Differenzierung und Proliferation vermehrt Hinweise darauf, dass Cst nicht in das bekannte Netzwerk proneuraler Genaktivität eingreift, sondern einen differenzierungsfördernden Einfluss durch einen unabhängigen, alternativen, jedoch bisher nicht näher bestimmten Mechanismus ausübt.

4.3.2 Cst schränkt die Wirkung von Inhibitoren neuronaler Differenzierung ein

Der HLH-Faktor Hes5 ist neben der Wechselbeziehung zwischen Notch und Delta1 eine Basiskomponente durch die der Mechanismus der lateralen Inhibition aufrechterhalten wird, um im Neuralrohr die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung zu bewahren (Henrique et al., 1995, Ma et al., 1996). Selbst in Folge der induzierten Notch-Signalkaskade aktiviert, inhibiert Hes5 zum einen die Expression der proneuralen Gene und zum anderen durch die Initiierung eines Repressorkomplexes, auch die Expression der Zielgene proneuraler bHLH-Faktoren (Chen et al., 1997, Davis et al., 2001, Alifragis et al., 1997, Sasai et al., 1992). Mit diesen Eigenschaften wirkt Hes5 im Neuralrohr als ein potenter Inhibitor neuronaler Differenzierung während der Neurogenese. Entsprechend ist 48 h nach der ektopischen Expression von Hes5-GFP durch *in ovo* Elektroporation nur in einem geringen Anteil ($5,2\% \pm 1,5$) der Hes5-GFP-exprimierenden Zellen p27 ($\text{GFP}^+/\text{p27}^+$) als Marker für differenzierende Neuronen nachweisbar. Der Anteil Hes-GFP-exprimierender, differenzierender Neuronen beträgt dagegen jedoch über ein Drittel ($36,8\% \pm 4,5$) 48 h nach der *in ovo* Koelektroporation von Hes5-GFP und Myc-Cst ($\text{GFP}^+/\text{Myc}^+/\text{p27}^+$). Demnach erhöht der Einfluss von Myc-Cst unter diesen experimentellen Bedingungen die Wahrscheinlichkeit, dass neuronale Vorläuferzellen trotz der Reprimierung proneuraler Genaktivität differenzieren. Andererseits scheint aber auch die Fähigkeit von Cst, neuronale Differenzierung zu fördern sichtlich eingeschränkt zu sein, wenn zwei Drittel der betroffenen Zellen nicht den Status differenzierter Neuronen erreichen ($\text{GFP}^+/\text{Myc}^+/\text{p27}^-$). Das Ergebnis der Koelektroporation von Hes5-GFP und Myc-Cst könnte also so gedeutet werden, dass die Inhibierung proneuraler Genexpression die Fähigkeit von Cst schmälert, neuronale Differenzierung zu unterstützen. In Kombination mit den bereits gesammelten Hinweisen (4.3.1), ließe sich dieses Phänomen theoretisch so erklären, dass Cst zwar parallel zu proneuralen und anderen Faktoren grundsätzlich die neuronale Differenzierung fördert, für deren vollständige Realisierung aber eine Mindestaktivität proneuraler Gene Voraussetzung bleibt. Demnach könnte es in diesem experimentellen Ansatz so sein, dass der durch Cst gelieferte, separate Impuls zur Differenzierung in jenen Zellen als Grundlage dient und zur neuronalen Differenzierung führt, in denen eventuell eine Restaktivität proneuraler Gene oder anderer Faktoren erhalten geblieben ist, die alleine aber keinen messbaren Einfluss mehr auf das Differenzierungsverhalten von Vorläuferzellen hätte bewirken können. Da im Rahmen dieser Koelektroporationsexperimente die Kompetenz von Hes5 als Inhibitor der Differenzierung allein anhand der p27-Expression gemessen wurde, können über eine mögliche absolute Restaktivität proneuraler Gene allerdings keine konkreten Angaben gemacht werden. Jedoch liefert das Ergebnis der Einzelektroporation von Hes5-GFP einen

Hinweis darauf, dass trotz der Inhibierung durch Hes5 durchaus in einem Teil der Zellen proneurale Genaktivität erhalten geblieben sein könnte, da in einigen Hes-GFP-exprimierenden Zellen auch der Differenzierungsmarker p27 detektiert werden kann. In diesen wäre das Maß proneuraler Funktionalität sogar alleine noch ausreichend gewesen, Differenzierung zu bewirken und es ist denkbar, dass insgesamt der Anteil an Zellen größer ist, in denen die Inhibierung durch Hes5 nicht absolut ist, die verbleibende proneurale Genaktivität aber nicht mehr genügt, Differenzierung zu induzieren. In diesem Zusammenhang sollte daneben allerdings auch nicht unberücksichtigt bleiben, dass nach der Elektroporation praktischerweise nur die Expression von GFP detektiert und nicht zusätzlich verifiziert wird, ob und in welcher Menge Hes5 ebenfalls exprimiert wird. Es besteht also theoretisch die Möglichkeit, dass gerade in den GFP⁺/p27⁺-Zellen die Hes5-Expression nicht fehlerfrei verlaufen ist und der inhibierende Effekt deswegen nicht eintritt. Minimiert wird diese Fehlerquelle jedoch schon durch die Wahl des Expressionsvektors (pCAGGS, Abb. 16), der die Translation zweier Proteine von nur einer mRNA erlaubt. Da die für GFP kodierende Sequenz auf der mRNA *downstream* des für Hes5 kodierenden Bereiches angeordnet ist, wird sichergestellt, dass die Expression von GFP nur dann eintritt, wenn wenigstens die Transkription beider Gene korrekt erfolgt ist. Auch wenn dennoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, dass in den GFP⁺/p27⁺-Zellen Hes5 möglicherweise in geringeren Mengen exprimiert wurde, widerspräche das allerdings trotzdem nicht der Annahme, dass der Einfluss von Myc-Cst die Wahrscheinlichkeit zur Differenzierung steigert und die proneurale Genaktivität darüber hinaus eine notwendige Komponente bliebe. Dagegen ist der alternative Erklärungsansatz, dass sich die ektopisch exprimierten Faktoren Hes5 und Myc-Cst funktionell, z.B. durch eine direkte physikalische Interaktion auf Proteinebene wechselseitig inhibieren, nach den Ergebnissen bisheriger Experimente weitestgehend unwahrscheinlich. In diesem Fall hätte nämlich die alleinige Überexpression von Myc-Cst auch nach 24 h schon zu einer relevanten Inhibierung des endogenen Hes5 und folglich zu einer erhöhten Genexpression proneuraler Faktoren führen sollen. Ein Einfluss von Cst auf die Expression von Hes5 und proneuraler Gene konnte aber bereits ausgeschlossen werden (Abb. 20, 4.3.1).

Ähnliches gilt auch für die Interpretation der Ergebnisse der Überexpressionsstudien mit Myc-Cst und einem weiteren Inhibitor der Differenzierung, Id2, dessen inhibitorische Wirkung ebenfalls durch den Einfluss von Myc-Cst herabgesetzt wird. Als HLH-Protein der Id-Familie bildet auch Id2 mit den bHLH-Faktoren Heterodimere, die nicht an DNA binden und inhibiert zum einen dadurch und zum anderen durch die Konkurrenz um essentielle Kofaktoren der proneuralen Proteine die Expression der entsprechenden differenzierungsrelevanten

Zielgene (Martinsen *et al.*, 1998, Jen *et al.*, 1997, Norton, 2000). Gegen die Annahme, dass Id2 seinerseits auf Proteinebene, vielleicht durch eine physikalische Interaktion mit Myc-Cst inhibiert wird, spricht wiederum, dass auch ein Einfluss von Cst auf die Expression eben diese Zielgene proneuraler Faktoren ausgeschlossen werden konnte (Abb. 20, 4.3.1). Trotzdem resultiert die Koelektroporation von Myc-Cst und Id2-GFP darin, dass unter diesen experimentellen Bedingungen drei Viertel der Zellen ($74,5\% \pm 3,7$) die beide Faktoren ektoptisch exprimieren, durch die Expression von p27 als differenzierende Neuronen eingeordnet werden können ($\text{GFP}^+/\text{Myc}^+/\text{p27}^+$). Im Gegensatz dazu ist der Anteil der $\text{GFP}^+/\text{p27}^+$ -Zellen entsprechend der inhibitorischen Kompetenz der Id-Faktoren nach der Einzelelektroporation von Id2-GFP nur gering ($13,8\% \pm 3,3$). Durch den Einfluss von Myc-Cst wird also wiederum die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Zellen trotz der induzierten Blockade differenzieren, doch anders als in der Überexpressionsstudie mit Hes5 wird die Inhibierung der Differenzierung durch Id2 in der Gegenwart von Myc-Cst nun von der Mehrheit der Zellen überwunden. Im Unterschied zu Hes5 schränkt Id2 nicht nur die Funktion proneuraler bHLH-Proteine ein, sondern stabilisiert zusätzlich auch die Progression des Zellzyklus indem es Faktoren der Rb-Gruppe inhibiert und damit die Aktivierung von Zellzyklus-Genen ermöglicht und fördert (Iavarone, *et al.*, 1994). Im Vergleich mit Hes5 könnte das Ergebnis der Koelektroporationsexperimente von Myc-Cst und Id2-GFP demnach ein Hinweis darauf sein, dass Cst ebenfalls in den Zellzyklus eingreift. Es wäre denkbar, dass die sichtliche Effizienz mit der die, durch Id2 induzierte Inhibierung der Differenzierung unter dem Einfluss von Myc-Cst aufgehoben wird, darauf beruht, dass Cst den positiven Effekt von Id2 auf den Zellzyklus entweder kompensiert oder seinerseits, vielleicht über einen dominierenden, alternativen Mechanismus den Austritt aus dem Zellzyklus fördert. Trifft diese Annahme zu, sollte das unter diesen experimentellen Bedingungen erreichte hohe Ausmaß der durch Cst induzierten Differenzierung, allerdings nur dann erreicht werden, wenn die inhibitorische Kompetenz von Id2 mehr der Unterstützung des Zellzyklus entspringen würde denn der Inhibierung proneuraler Faktoren. Tatsächlich hat die Überexpression von Id2 im Neuralrohr anders als Hes5 einen schwächeren Einfluss auf die Expression von *Delta1* (Debreuil *et al.*, 2002), wodurch nahe gelegt wird, dass die durch Id2 vermittelte Inhibierung neuronaler Differenzierung vornehmlich auf der Förderung des Zellzyklus beruht. In der Komplexierung der proneuralen Proteine und der Kompetition um deren essentielle Kofaktoren durch Id2 könnte dagegen die Ursache dafür zu suchen sein, dass Cst die induzierte Blockade neuronaler Differenzierung unter diesen experimentellen Bedingungen nicht grundsätzlich in allen Zellen aufheben kann, die sowohl Id2-GFP als auch Myc-Cst exprimieren. Dafür, dass Id2 in diesem Aspekt der Inhibition wieder-

um über Cst dominiert, spricht auch das Ergebnis der Myc-Cst /Hes5-GFP-Koelektroporation, dass die proneurale Genaktivität einen limitierenden Parameter für die Kapazität von Cst, neuronale Differenzierung zu fördern, darstellen könnte.

Zusammengefasst geben die Ergebnisse der Elektroporationsexperimente mit Myc-Cst, Hes5-GFP und Id2-GFP erste Hinweise auf den Mechanismus, der durch Cst vermittelten Förderung neuronaler Differenzierung. Demnach ist es möglich, dass Cst mit dem Zellzyklusprogramm proliferierender Zellen interferiert und dabei entweder eine Arretierung des Zellzyklus oder den Austritt aus dem Zellzyklus bewirkt. Da die Blockierung der Zellteilung allein allerdings nicht ausreichend ist, die vollständige Differenzierung sich teilender Vorläuferzellen zu fertigen Neuronen zu veranlassen (Hardcastle *et al.*, 2000), ist es wahrscheinlich, dass die Funktion von Cst nicht nur auf diesen Aspekt des Zellzyklus begrenzt ist. Eventuell vermittelt Cst den Austritt aus dem Zellzyklus als Voraussetzung dafür, dass Vorläuferzellen anschließend mit der Migration beginnen, differenzieren und damit einhergehend typische neuronale Marker exprimieren und greift so nicht nur in den Zellzyklus ein, sondern unterstützt darüber hinaus den Übergang zur Differenzierung. Allerdings scheint Cst allein aber nicht alle notwendigen Aspekte für die Differenzierung zu erfüllen und es bedarf dazu der Beteiligung zumindest der proneuralen Faktoren, so dass Cst eine Förderung der Differenzierung initiiert ohne mit bereits bekannter proneuraler Genaktivität zu interferieren.

Nebenbei fällt im Rahmen der Koelektroporationsexperimente mit Myc-Cst und den Inhibitoren der Differenzierung eine relativ große Anzahl GFP⁺-Zellen auf, in denen überraschend keine zusätzliche Expression von Myc-Cst nachgewiesen werden kann, wie nach der gleichzeitigen Elektroporation beider Expressionsplasmide zu erwarten gewesen wäre. Dieses Phänomen ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf eine unterschiedliche Akzeptanz der Zellen gegenüber den verschiedenen (Basis-) Expressionsplasmiden pCS2+ bzw. pCAGGS zurückzuführen, da die Kombination dieser beiden Vektoren in anderen Koelektroporationsexperimenten nicht zur ungleichen Verteilung der Expressionsprodukte führte (Abb. 28F, Abb. 30G). Der nach der Koelektroporation von Myc-Cst und Hes5-GFP oder Id2-GFP beobachtete Effekt der unterschiedlichen Verteilung ließe sich daher eher mit dem gegensätzlichen Einfluss der exprimierten Faktoren auf das Differenzierungs- und Proliferationsverhalten der transfizierten Zellen begründen. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer größeren Anzahl ausschließlich GFP exprimierender Zellen könnte sein, dass diese aus einer zunächst kleinen Gruppe von Zellen hervorgehen, die bei der Elektroporation nur Hes5- bzw. Id2-GFP-Expressionsplasmide aufgenommen haben. Diese Zellen könnten sich bis zur Isolierung der

Embryonen fortlaufend teilen und dabei die aufgenommenen Vektoren unter den Tochterzellen aufteilen, während Myc-Cst exprimierende Zellen auch in Gegenwart von Hes5 oder Id2 den Zellzyklus abschließen. Für diese Annahme spricht auch, dass sich fast alle der ausschließlich (Myc⁻/)GFP⁺ Zellen in der Region der ventrikulären Zone befinden, wohingegen die meisten Myc⁺/GFP⁺-Zellen entlang der gesamten dorso-ventrale Achse des Neuralrohres, entweder als differenzierte Neuronen in der Mantelzone oder in einem Bereich eng benachbart dazu detektierbar sind.

4.3.3 Die zentrale Zinkfinger-Domäne des Cst-Proteins fördert neuronale Differenzierung

Um nähere Hinweise darauf zu sammeln, ob der, durch die Überexpression von Myc-Cst hervorgerufene, differenzierungsfördernde Effekt vielleicht durch eine Aktivierung oder die Inhibierung von Genen hervorgerufen wird, wurden weitere *in ovo* Elektroporationsexperimente mit den Fusionskonstrukten Myc-Cst_{M1-4}-E1A und Myc-Cst_{M1-4}-EngR durchgeführt. Die zugrunde liegende experimentelle Strategie war, die DNA-bindende Domäne von Cst mit einer bekannten Transkriptionsregulierenden Einheit zu verbinden, und so ein Fusionsprotein zu erhalten, das überexprimiert den gleichen Effekt hervorruft wie das vollständige Cst-Protein. Dazu wurde die Sequenz der zentralen vier Cst-Motive mit der Sequenz für die Transkription aktivierende Domäne E1A des Adenovirus bzw. der inhibitorischen Domäne EngR des Engrailed-Proteins aus *D. melanogaster* kombiniert. Die Cst-Motive 1-4 bilden die zentrale Zinkfinger-Domäne des Cst-Proteins und können an DNA binden (3.4.2, Abb. 24). Die anderen beiden Domänen wurden bereits zuvor als Transkriptions-Aktivator bzw. -Repressor eingesetzt (Marine *et al.*, 1997, Badiani *et al.*, 1994, Conlon *et al.*, 1996, Bylund *et al.*, 2003). In diesen Arbeiten konnte zum einen gezeigt werden, dass wenn das Fusionsprotein die funktionell gleiche regulatorische Domäne erhält wie das wildtypische Protein, Überexpressionstudien mit beiden Proteinen zu gleichen Ergebnissen führen. Enthält das Fusionsprotein stattdessen aber die transkriptionsregulatorische Domäne, die bezüglich ihrer Funktion nicht der wildtypischen entspricht, werden unter gleichen Versuchsbedingungen unterschiedliche Ergebnisse erzielt oder sogar entgegengesetzte Effekte hervorgerufen. Die Verwendung eines solchen letztgenannten, auch als dominant-negativ bezeichneten Konstruktes ist oftmals sehr aufschlussreich, da damit auch prinzipiell ein Genverlust-Zustand *in vivo* simuliert werden kann. Interessant an den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente ist, dass sowohl durch die Überexpression des Aktivator-, Myc-Cst_{M1-4}-E1A, als

auch durch die des Repressor-Fusionsproteins Myc-Cst_{M1-4}-EngR, der gleiche fördernde Effekt auf die neuronale Differenzierung von Vorläuferzellen erzielt wird wie durch die Überexpression der Vollängenversion des Cst-Proteins. Allein aus dieser Beobachtung gefolgert, sollte Cst als Zinkfinger-Transkriptionsfaktor in Vertebraten wie auch Castor in *Drosophila* sowohl als Aktivator als auch als Repressor die Genexpression mehrerer verschiedener Zielgene regulieren (Kambadur *et al.*, 1998), ohne das an dieser Stelle ersichtlich würde, ob endogen eine der beiden Funktionen dominiert. Im Weiteren müssten die Zielgene dann allerdings ihrerseits an unterschiedlichen Stellen Teil der Proliferations- und Differenzierungsmaschinerie sein, wenn, wie mit Myc-Cst_{M1-4}-E1A und Myc-Cst_{M1-4}-EngR gezeigt, sowohl die alleinige ektopische Aktivierung des oder der einen Zielgene(s) als auch die Inhibition des(r) anderen zum selben differenzierungsfördernden Resultat führen kann. Alternativ zu diesem Erklärungsansatz ist die Annahme, dass die jeweiligen Fusionsproteine weder einen funktionellen Transkriptionsaktivator noch -Inhibitor darstellen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Kombination der Sequenzen unerwartet die Sekundär- oder die Tertiärstruktur des Gesamtproteins negativ beeinflusst, so dass funktionelle Domänen vielleicht nicht ausgebildet werden können oder sterisch inhibiert werden. Allerdings wurden dieselben Basisvektoren mit den E1A- und EngR-Anteilen bereits erfolgreich in Kombination mit DNA-bindenden Zinkfinger-Domänen eingesetzt (Marine *et al.*, 1997). Dennoch müsste auch in diesem Fall generell wenigstens ein funktioneller Bereich der Fusionsproteine erhalten geblieben sein, denn der für Cst typische Effekt auf das Differenzierungsverhalten der Zellen ist ja durchaus weiterhin zu beobachten. Zum anderen ist es aber ebenso möglich, dass die zusätzlich Transkriptionsregulierenden Domänen der Fusionsproteine nicht beeinträchtigt aber alle für den differenzierungsfördernden Effekt verantwortlichen Komponenten bereits in der Domäne der Cst-Motive vereinigt sind. Übereinstimmend mit dieser Vermutung konnte gezeigt werden, dass unter den experimentellen Bedingungen die Überexpression der isolierten, zentralen Zinkfinger-Domäne des Cst-Proteins (Myc-Cst_{M1-4}) tatsächlich alleine schon ausreichend ist, den Differenzierungseffekt auszulösen. Demnach ist es nicht erheblich, ob die zentrale Zinkfinger-Domäne des Cst-Proteins überhaupt von einer weiteren potentiell funktionellen Domäne begleitet wird, da dadurch keine maßgeblichen Veränderungen für die Funktionsweise des gesamten Fusionsproteins erzielt wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich in dieser Hinsicht das Maus Cst-Protein von Castor in *Drosophila* unterscheidet, das während der temporalen Regulation der Neurogenese sowohl als Repressor als auch als Aktivator fungiert. Im Weiteren wirft dieser Befund andererseits die Frage auf, auf welche Weise die zentrale Zinkfinger-Domäne von Cst den maßgeblichen Effekt auf die Differenzierung hervorruft. Wie durch die

Gelretardationsstudie in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, sind die vier Cst-Motive der zentralen Zinkfinger-Domäne kompetent, sequenzspezifisch DNA zu binden. Es könnte nun zum einen so sein, dass der beobachtete Effekt der Cst-Motive auf die Differenzierung ausschließlich auf der Fähigkeit zur DNA-Bindung beruht, ohne dass die Zinkfinger-Domäne noch andere funktionelle Komponenten beinhaltet oder mit weiteren Faktoren in Kontakt tritt. So wäre es denkbar, dass durch die Anheftung der Cst-Motive an bestimmte DNA-Sequenzen Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren blockiert werden, deren Ziel entweder die Förderung der Proliferation oder die Inhibierung der Differenzierung ist. Damit würde Cst grundsätzlich die Funktion eines Inhibitors zukommen. Zum anderen wäre es aber auch möglich, dass die zentrale Zinkfinger-Domäne anstelle der DNA-Bindung mit anderen Faktoren in Wechselwirkung tritt und Cst dadurch in erster Linie alleine vielleicht weder als Transkriptionsaktivator noch als -Repressor fungiert. Tatsächlich ist es nicht ungewöhnlich, dass den DNA-bindenden Domänen von Transkriptionsfaktoren noch weitere regulatorische Funktionen zugeordnet werden können (Liu *et al.*, 1994). Auch wenn den C₂H₂-Motiven von Zinkfinger-Proteinen vornehmlich die Rolle zugeschrieben wird, mit einer spezifischen Affinität DNA-Segmente zu binden, können einige darüber hinaus auch mit RNA (Hall, 2005, Brown, 2005) oder Proteinen in Wechselwirkung treten (Iuchi, 2001, Gamsjäger *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass durch die C₂H₂-Motive sowohl eine Interaktion mit einzel- (Bardeesy *et al.*, 1998, Caricasole *et al.*, 1996) als auch doppelsträngiger RNA (Finerty *et al.*, 1997, Finerty *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 1999) und sogar mit RNA-DNA-Heteroduplexen (Shi *et al.*, 1995, Finerty *et al.*, 1997) erzielt werden kann, auch wenn im letzteren Fall die akute biologische Relevanz nicht geläufig ist. Ebenso bekannt ist, dass von mehreren aufeinander folgenden C₂H₂-Zinkfingern eines Proteins nicht zwingend alle funktionell konform sein müssen. Es ist durchaus möglich, dass nur ein Teil der zu einer Domäne gehörenden Zinkfinger sequenzspezifisch Nukleinsäuren bindet während entfernt liegende oder sogar C₂H₂-Motive derselben Domäne parallel dazu mit Proteinen in Wechselwirkung treten und notwendig sein können, um Homo- oder auch Heterodimere zu bilden (Iuchi, 2001, Morgan *et al.*, 1997, Tsai *et al.*, 1998, Sun *et al.*, 1996). Es ist daher denkbar, dass auch den hier untersuchten Cst-Motive neben der schon nachgewiesenen Fähigkeit der DNA-Bindung noch die Funktion zu eigen sein könnte, mit weiteren endogenen Proteinen in Kontakt zu treten und so zu interagieren, dass daraus der beobachtete Effekt auf die Differenzierung resultiert.

4.4 Cst nimmt alleine keinen Einfluss auf die Subtypspezifizierung

Die Ergebnisse der Einzelektroporationsexperimente mit Myc-Cst zeigen, dass durch die ektopische Expression von Myc-Cst zum einen frühzeitig die Differenzierung neuronaler Zellen gefördert wird (Abb. 17) und zum anderen, dass alle betroffenen Zellen zum jeweiligen, ihrer Position auf der dorso-ventralen Achse entsprechenden neuronalen Subtypus gehören (Abb. 18). Genauso ist das ektopisch exprimierte Konstrukt auch in allen untersuchten dorsalen und ventralen Interneuronen- und der Motorneuronenpopulation zusammen mit den charakteristischen Markern detektierbar (1.3.1.1, 1.3.1.2) und es gibt somit keinen Hinweis darauf, dass unter diesen experimentellen Bedingungen die Spezifizierung eines oder mehrerer der betrachteten neuronalen Subtypen inhibiert wird. Daraus kann abgeleitet werden, dass auch die endogene Cst-Expression alleine weder in den dorsalen Vorläuferpopulationen noch in den jüngst gebildeten Neuronen im medialen und ventralen Bereich des Neuralrohres die Subtypspezifizierung verantwortet. Unabhängig davon kann Cst aber bei der Überexpression seine differenzierungsfördernde Wirkung entlang der gesamten dorso-ventralen Achse des Neuralrohres entfalten und veranlasst gleichsam, ohne regionale Unterscheidung die Mehrheit der Zellen dazu, aus dem Zellzyklus auszutreten und in die Mantelzone zu wandern.

4.5 Cst kooperiert spezifisch mit Math1 bei der Bildung von dI1-Interneuronen

Die proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren Math1, Ngn1/2 und Mash1 bzw. Cath1, cNgn1/2 und Cash1 werden während der Neurogenese jeweils in den benachbarten dorsalen Vorläuferzellpopulationen dP1, dP2 und dP3 im Neuralrohr von Mäuse-, bzw. Hühnerembryonen exprimiert und sind sowohl hinreichend als auch notwendig für die Spezifizierung verschiedener Typen dorsaler Interneuronen (Nakada *et al.*, 2004, Gowan *et al.*, 2001, Birmingham *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 1998, Helms *et al.*, 1998, Akazawa *et al.*, 1995, Ma *et al.*, 1996, Perez *et al.*, 1999, Johnson *et al.*, 1990, Jasoni *et al.*, 1994, Lo *et al.*, 1991, Ma *et al.*, 1997). Entsprechend können durch die ektopische Expression dieser proneuralen Faktoren Vorläuferzellen außerhalb der endogenen Expressionsdomänen darauf programmiert werden, Interneuronen des charakteristischen Subtyps zu generieren. Verschiedene Studien zeigen jedoch, dass das subtypspezifizierende Potential der bHLH-Faktoren darüber hinaus dennoch diversen Einschränkungen unterworfen ist und legen deswegen die Beteiligung noch zu identifizieren-

der Kofaktoren nahe (Bermingham *et al.*, 2001, Gowan *et al.*, 2001, Helms *et al.*, 2005, Kriks *et al.*, 2005, Müller *et al.*, 2005, Nakada *et al.*, 2004). Da *Cst* evolutionär konserviert ebenfalls in den Vorläuferpopulationen dP1-dP3 exprimiert wird, war es von Interesse zu untersuchen, ob es sich hierbei um einen der gesuchten potentiellen Kofaktoren der bHLH-Transkriptionsfaktoren handeln könnte. Tatsächlich geben die Ergebnisse der Einzel- und Koelektroporationsstudien mit Myc-*Cst* und Expressionsplasmiden der proneuralen Faktoren *Math1*, *Ngn1* und *Cash1* deutliche Hinweise auf eine spezifische Kooperation von *Cst* und *Math1* und lassen auf eine Beteiligung von *Cst* als Kofaktor an der Subtypspezifizierung von dI1-Interneuronen schließen. Zunächst konnte im Rahmen dieser Arbeit in Analogie zu anderen Studien (Gowan *et al.*, 2001, Nakada *et al.*, 2004) verifiziert werden, dass nach der *in ovo* Elektroporation des proneuralen Faktors *Math1* ausschließlich im dorsalen Bereich des Neuralrohres vermehrt Interneuronen des Typs dI1 gebildet werden, obwohl entlang der dorso-ventralen Achse zahlreiche Zellen nachweislich ebenfalls ektopisch *Math1* exprimieren. Durch die Koelektroporation von Myc-*Cst* und *Math1* wird erreicht, dass diese Beschränkung der subtypspezifizierenden Wirkung von *Math1* auf den dorsalen Anteil des Neuralrohres aufgehoben wird. Die gemeinsame Überexpression der beiden Faktoren resultiert darin, dass über die gesamte Ausdehnung der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres mit Ausnahme der Dach- und Bodenplattenregion die Bildung weiterer dI1-Interneuronen induziert wird, wobei der Nachweis des spezifischen Interneuronentyps über die charakteristische Expression des Markers *Lh2b* erfolgt (Abb. 27). Eine Quantifizierung der dI1-Interneuronen belegt, dass die alleinige Überexpression von *Math1* zu einer Verdreifachung (diese Arbeit, Nakada *et al.*, 2004), die Koelektroporation von Myc-*Cst* und *Math1* aber zu einer Versechsfachung dieses spezifischen Interneuronentyps führt (Abb. 27). Basierend darauf, dass sich gleichfalls die endogenen Expressionsdomänen von *Cst* und *Math1* im dorsalen Neuralrohr überschneiden, kann aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass *Cst* nicht nur unter experimentellen Bedingungen, sondern auch im üblichen Rahmen der Neurogenese mit *Math1* kooperiert und dadurch an der Generierung von dI1-Interneuronen beteiligt ist. Darüber hinaus unterstreichen die Resultate weiterer Koelektroporationsstudien von Myc-*Cst* mit den proneuralen Faktoren *Ngn1* und *Cash1* den exklusiven Charakter des Zusammenwirkens von *Cst* und *Math1*. Im Vergleich zu den Einzelektroporationen von *Ngn1*-GFP bzw. *Cash1*-GFP kann nach der gleichzeitigen Überexpression mit Myc-*Cst* hierbei keine signifikante Veränderung der Anzahl oder der Verteilung der zusätzlich gebildeten dI2- (Abb. 28) bzw. dI3-Interneuronen (Abb. 30) festgestellt werden. Dies zeigt, dass im Gegensatz zu *Math1* die bHLH-Transkriptionsfaktoren *Ngn1* und *Cash1* unter diesen experimentellen Bedingungen in der Entfal-

tung ihres subtypspezifizierenden Potentials von Myc-Cst weder messbar unterstützt noch inhibiert werden. Damit wird die Annahme untermauert, dass Cst im dorsalen Neuralrohr spezifisch mit Math1 kooperiert und nicht grundsätzlich mit den proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren, deren Expressionsdomänen mit der von Cst überlappen, die Bildung der jeweiligen Interneuronen beeinflusst. Da nach den Koelektroporationsexperimenten mit Ngn1- und Cash-GFP auch die dI1-Populationen zudem keine sichtbare Veränderung aufweisen, kann im Weiteren ebenso ausgeschlossen werden, dass die gemeinsame Überexpression von Myc-Cst zusammen mit einem proneuralen bHLH-Faktor generell zu einer Vermehrung von dI1-Interneuronen führt. Cst kann somit einer wachsenden Liste von Faktoren hinzugefügt werden, die spezifisch mit proneuralen Faktoren bei der Generierung charakteristischer Typen dorsaler Interneuronen interagieren (Kriks *et al.*, 2004, Müller *et al.*, 2005). In dem Punkt, dass die ektopische Expression von Ngn1 bzw Cash1 keine Auswirkung auf die Population der dI1-Interneuronen hat, weichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit indes etwas von denen anderer Studien ab (Gowan *et al.*, 2001, Nakada *et al.*, 2004). Da sich die proneuralen bHLH-Faktoren während der Entwicklung des Neuralrohres wechselseitig in ihrer Expression reprimieren, sollte z.B. die Überexpression von Ngn1 zu einer Inhibierung des endogen exprimierten *Cath1* und folglich zu einer Dezimierung der dI1-Population führen (Gowan *et al.*, 2001, Nakada *et al.*, 2004). Dass dieser Effekt hier nicht beobachtet wird, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit daran, dass die dorsalsten Bereiche des Neuralrohres nicht ausreichend durch die Elektroporation erfasst werden konnten und die Domäne der *Cath1*-exprimierenden dP1-Vorläuferzellen daher nicht unter den reprimierenden Einfluss des ektopisch exprimierten proneuralen Faktors gelangt ist. Anhand von Abb. 29 und Abb. 30 wird entsprechend ersichtlich, dass die, durch GFP gekennzeichnete Expression von Ngn1 bzw. Cash1 tatsächlich kaum an die Region im dorsalen Neuralrohr heranreicht, die für die Bildung von dI1-Interneuronen relevant ist.

Nachdem die Ergebnisse der Überexpressionstudien mit proneuralen bHLH-Faktoren gezeigt haben, dass Cst im Neuralrohr spezifisch zusammen mit Math1 Einfluss auf die Generierung von dI1-Interneuronen nimmt, ist es im Weiteren von Interesse, genauer sowohl die Art als auch die molekulare Basis des Zusammenwirkens von Cst und Math1 zu betrachten. Da Math1 als alleiniger Akteur im Vergleich zu anderen proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktoren eine geringere Kapazität hat, Neurogenese zu induzieren (Quan *et al.*, 2004, Nakada *et al.*, 2004, Gowan *et al.*, 2001), könnten Cst und Math1 insofern kooperieren, als dass Cst die Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen im dorsalen Neuralrohr verstärkt und Math1 darauf basierend die Subtypspezifizierung der Zellen initiiert. Die *Math1*-Expressionsdomäne

unterliegt zudem unmittelbar dem Einflussbereich der Dachplatte (Lee *et al.*, 1998), die als ein übergeordnetes Signalzentrum das komplexe Wechselspiel von Proliferation und Differenzierung bestimmt (Müller *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2000, Chizhikov *et al.*, 2005). Durch deren Signaltransduktion wird nicht nur die Expression der proneuralen Faktoren in den Vorläuferzellen induziert, sondern auch diejenige der Faktoren wie Wnt, Msx oder Zic, die der Aktivität der proneuralen Faktoren entgegenwirken und auf verschiedenen Wegen den proliferativen Status von Vorläuferzellen stabilisieren oder Differenzierung inhibieren (Chesnutt *et al.*, 2004, Liem *et al.*, 1995, Furuta *et al.*, 1997, Timmer *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004, Ebert *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang könnte es für das Zusammenspiel von Cst und Math1 von Bedeutung sein, dass Cst, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, durch einen von den proneuralen Faktoren unabhängigen Mechanismus und damit parallel zu Math1 bewirkt, dass Vorläuferzellen die Proliferation abschließen, differenzieren und in die Mantelzone migrieren. Andererseits deuten manche Befunde darauf hin, dass Math1 für die Determinierung des Zellschicksals der dII-Interneuronen Kofaktoren benötigt (Gowan *et al.*, 2001, Nakada *et al.*, 2004). So führt die Überexpression von Math1 im Neuralrohr zwar nur im dorsalen Bereich dazu, dass zusätzliche Vorläuferzellen darauf programmiert werden, Interneuronen des dII Subtyps zu generieren, wie aber in dieser und anderen Arbeiten (Nakada *et al.*, 2004) gezeigt werden konnte, gilt diese regionale Beschränkung der Math1 Aktivität nur für die Subtypspezifizierung und nicht für den Einfluss auf die Differenzierung. Entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohres verursacht die ektopische Expression von Math1 nachweislich durchweg, dass Vorläuferzellen vorzeitig mit der Differenzierung zu Neuronen beginnen und dementsprechend für differenzierte Neuronen charakteristische Marker wie p27 (Abb. 19) oder Tuj1 (Nakada *et al.*, 2004) exprimieren. Offenbar erfüllt Cst in diesem Punkt die Kriterien eines Kofaktors, da die gleichzeitige Überexpression von Cst und Math1 in Vorläuferzellen zur Differenzierung und vollständigen Subtypspezifizierung zu dII-Interneuronen im gesamten Neuralrohr führt. Nach der Einzelektroporation von Math1 werden im dorsalen Neuralrohr aber auch noch in einem Bereich dII-Interneuronen generiert, wo Cst endogen nicht in Vorläuferzellen exprimiert wird und somit vermutlich nicht optimal als Kofaktor zur Verfügung steht. In dem betreffenden Abschnitt des dorsalen Neuralrohres wird Cst zwar in jüngst gebildeten Neuronen exprimiert, hat unter den experimentellen Bedingungen aber nur mit geringer Wahrscheinlichkeit Anteil an der Subtypspezifizierung der ektopischen dII-Interneuronen, da die vergleichbare endogene Expression von Cst in Neuronen der ventralen Neuralrohrhälfte bei der Einzelektroporation von Math1 dazu nachweislich nicht ausreicht. Die zeitlich eng korrelierte Expression der beteiligten Faktoren in Vorläuferzellen ist wahr-

scheinlich ein kritischer Aspekt und es bleibt vorerst noch offen, ob Math1 alternativ zu Cst noch andere Kofaktoren für die Generierung von dI1-Interneuronen rekrutiert. Untersuchungen zur molekularen Wirkungsweise von Math1 und anderen proneuralen Faktoren legen im Weiteren eine ausgesuchte Protein-Protein Interaktion als Voraussetzung dafür, neuronale Differenzierung und Zelltypspezifizierung anzutreiben, nahe (Nakada *et al.*, 2004). Wie bereits beschrieben (4.3.3) ist eine derartige Interaktion für Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren durchaus möglich und in Bezug auf Cst als potentiellen Kofaktor von Math1 belegen die Ergebnisse von Protein-Ko-Präzipitationsexperimenten, dass Cst und Math1 auf Proteinebene *in vitro* physikalisch miteinander interagieren können (Lieven, 2004), wodurch wiederum die Annahme der spezifischen Kooperation von Cst und Math1 unterstützt wird. Daneben ist in diesem Zusammenhang noch erwähnenswert, dass im Rahmen dieser Protein-Interaktionsstudien gezeigt werden konnte, dass Cst unter experimentellen Bedingungen auch mit den bHLH-Faktoren Ngn1 und Cash1 in Wechselwirkung treten kann (Lieven, 2004). Da sich die endogene Expressionsdomänen von Cst in den Vorläuferzellen des dorsalen Neuralrohres nicht nur mit der von Math1, sondern auch mit der von Ngn1 und zum Teil mit der von Cash1 überschneidet, ist dies ein interessanter Hinweis auf die Möglichkeit, dass Cst im Verlauf der Neurogenese eventuell auch mit diesen bHLH-Faktoren interagieren könnte. Allerdings gibt es nach den Ergebnissen der bisherigen Koelektroporationsexperimente mit Myc-Cst und den proneuralen bHLH-Faktoren außer für Math1 keine Anhaltspunkte für eine Interaktion mit Cst bei der Subtypspezifizierung. Um den Hinweisen auf eine weitere Kooperation von Cst mit anderen Faktoren dennoch nachzugehen, könnte zum einen angestrebt werden auf zellulärem Niveau Protein-Interaktionen zu untersuchen. Die Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) erlaubt z.B. den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Homo- und Heterodimerisierungen im Inneren von Zellen (Piston *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2006). Die Strategie dieser Methode beruht darauf, dass zunächst ein „Donor“-Fluoreszenzfarbstoff angeregt wird und die daraufhin von diesem abgegebene Energie auf einen, in enger Nachbarschaft befindlichen „Akzeptor“-Fluoreszenzfarbstoff übertragen werden kann und dadurch wiederum zu dessen Anregung führt (Kenworthy, 2001, Clegg, 1995). Die beiden Farbstoffe müssen dabei so gewählt werden, dass nicht beide durch Licht der gleichen Wellenlänge angeregt werden und dass sich das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überschneidet. Da auch bereits bekannte Proteine wie das Grün (GFP)-, Gelb (YFP)- oder Zyan (CFP)-fluoreszierende Protein diese Kriterien erfüllen (Wang *et al.*, 2006), wäre es für die Untersuchung von Cst und potentiellen Interaktionspartnern möglich, entsprechende Fusionsproteine mit fluoreszierendem Anteil zu generieren und

gemeinsam *in vivo* zu exprimieren. Die Effizienz der Energieübertragung ist strikt von der Entfernung der beiden Farbstoffe zueinander abhängig und folglich umso stärker je näher Donor- und Akzeptor-Anteil der Fusionsproteine beieinander liegen, was unter experimentellen Bedingungen *in vivo* und je nach Farbstoffkombination einen Abstand von nur wenigen Nanometern bedeutet (Xia *et al.*, 2001). Die FRET-Methode ist demnach ausreichend sensitiv, um innerhalb eines zellulären Kontextes eine physikalische Interaktion von Proteinen aufzuzeigen (Wang *et al.*, 2006, Clegg, 1995, Sekar *et al.*, 2003). Eine Einschränkung dieser experimentellen Strategie könnte allerdings sein, dass die zu untersuchenden Proteine ektopisch oder in nicht physiologischen Mengen exprimiert werden und daraus unspezifische Bindungen resultieren können, die nicht ohne Vorbehalte auf die wildtypische Situation übertragbar sind. Alternativ können weitere Elektroporationsexperimente in Betracht gezogen werden, die auf dem Genverlust-Prinzip beruhen. Neben dem, in dieser Arbeit verfolgten Ansatz, ein dominant-negatives Expressionskonstrukt von *Cst* zu entwickeln (3.4.3), könnten zukünftige Untersuchungen auf der experimentellen Strategie der RNA-Interferenz (RNAi) basieren. Mit dieser Methode wird eine temporäre, kritische Verringerung der Aktivität eines bestimmten Zielgens (*knockdown*) angestrebt. Dabei werden durch das Einbringen von sequenzspezifischen si (*short interference*) RNA-Molekülen zelleigene Mechanismen in Gang gesetzt, die zur Inaktivierung bzw. zum Abbau der endogenen Zielgen-RNA führen und letztendlich die Translation der gewünschten RNA reprimieren (Yu *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2002). Zwar wurde ein solcher experimenteller Ansatz in Zusammenarbeit mit Dr. T. Theil bereits für die Inaktivierung von *Cst* im Neuralrohr von Hühnerembryonen getestet, jedoch ließ sich eine relevante und messbare Inhibierung der *Cst*-Genaktivität dadurch noch nicht erzielen. Die mit der Weiterentwicklung und zunehmenden Etablierung dieser Methode einhergehenden, neueren Erkenntnissen über geeignete Sequenzen, könnten aber in zukünftigen Experimenten genutzt werden, viel versprechende Verbesserungen zu erreichen (Bai *et al.*, 2007, Mishra *et al.*, 2008). Darüber hinaus wäre für die weitere Analyse der Funktion von *Cst* während der Neurogenese von Vertebraten die Generierung und natürlich die anschließende Charakterisierung einer *Cst* Knock-out Mutante der Maus eine hilfreiche Ergänzung zu den bereits vorgestellten Überexpressionsstudien im Huhn. Die Erforschung der phänotypischen und molekularen Veränderungen einer Knock-out Mutante gestattet Rückschlüsse auf die Funktion von *Cst* und erlaubt es, Zielgene von *Cst* zu identifizieren oder Aufschluss darüber zu geben, ob die Kooperation von *Cst* und *Math1* zu einer gemeinsamen Regulation von Genen, wie z.B. *Mbh1* (Saba *et al.*, 2005, Saba *et al.*, 2003) führt.

4.5.1 *Cst* als Teil des Netzwerkes zwischen Proliferation, Differenzierung und Subtypspezifizierung im dorsalen Neuralrohr

Während der Neurogenese steuert die Dachplatte als ein übergeordnetes Signalzentrum des Neuralrohres über verschiedene Signaltransduktionswege und mehrere Faktoren die Proliferation von Vorläuferzellen, deren Differenzierung zu Neuronen und die weitere Spezifizierung dieser zu definierten neuronalen Subtypen. Die präzise und zeitlich genaue Koordination dieser Vorgänge ist unerlässlich, damit eine bestimmte Menge unterschiedlicher Neuronen in genauer Anzahl zur rechten Zeit und an definierter Position als Basis eines leistungsfähigen adulten Zentralnervensystems entsteht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch die Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Cst* im dorsalen Neuralrohr zu diesem Zweck von der Dachplatte reguliert wird. Durch Überexpressionsstudien wurde zum einen herausgefunden, dass *Cst* die neuronale Differenzierung fördert und bewirkt, dass Vorläuferzellen innerhalb eines bestimmten Zeitrahmens die Proliferation beenden, zu Neuronen differenzieren, mit der Migration in die Mantelzone beginnen und hier ihre positionsabhängigen, charakteristischen Eigenschaften entfalten. Zum anderen wurde entdeckt, dass *Cst* auch an der Determinierung eines neuronalen Subtyps im dorsalen Neuralrohr beteiligt ist und spezifisch mit dem proneuralen bHLH-Faktor *Math1* bei der Generierung von dI1-Interneuronen kooperiert. Zusammengenommen ist mit *Cst* ein weitere Faktor identifiziert worden, dem eine Beteiligung im komplexen Netzwerk der Musterbildung zugeordnet werden kann. Als ein von der Dachplatte gesteuerter Effektor erhält *Cst* die kritische Balance zwischen Proliferation und Differenzierung und verknüpft diese Mechanismen mit Programmen der Subtypspezifizierung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das leistungsfähige Zentralnervensystem eines adulten Organismus ist das Ergebnis präzise koordinierter Prozesse, die gewährleisten, dass im Verlauf der Neurogenese zeitgerecht eine Vielzahl unterschiedlicher Neuronen in genauer Anzahl und an definierter Position entstehen. Es ist ein Ziel der Entwicklungsbiologie, die molekularen Mechanismen der Musterbildung aufzuklären und zu erfassen, welche Faktoren daran beteiligt sind. Während der dorso-ventralen Musterbildung im Neuralrohr von Vertebraten steuert die Dachplatte als ein übergeordnetes Signalzentrum über mehrere Signaltransduktionswege die Expression verschiedener Faktoren, die das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Vorläuferzellen regulieren und die Spezifizierung von Neuronen zu bestimmten neuronalen Subtypen beeinflussen. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Cst* wird evolutionär konserviert während der Neurogenese im Neuralrohr von Mäuse- und Hühnerembryonen in Zellen der dorsalen Vorläuferpopulationen dP1-dP3 sowie im lateralen und ventralen Bereich des Neuralrohres in jüngst gebildeten Neuronen exprimiert. Die Analyse von Verlustmutanten der Maus in Kombination mit Überexpressionsstudien in Hühnerembryonen hat ergeben, dass die Expression von *Cst* im dorsalen Neuralrohr durch die Bmp-vermittelte Signaltransduktion der Dachplatte gesteuert wird. Experimente zur Untersuchung der Funktion von *Cst* haben gezeigt, dass die ektopische Expression von *Cst* im Neuralrohr dazu führt, dass neuronale Vorläuferzellen frühzeitig die Proliferation abschließen, mit der Differenzierung beginnen und von der ventrikulären in die Mantelzone migrieren. Die Ergebnisse dieser Studien weisen darauf hin, dass der von *Cst* ausgelöste, differenzierungsfördernde Mechanismus nicht in das bekannte Netzwerk proneuraler Genaktivität eingreift, sondern legen nahe, dass *Cst* parallel dazu den Austritt der Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus vermittelt und Differenzierung initiiert. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass *Cst* als Kofaktor auch an der Determinierung eines neuronalen Subtyps beteiligt ist und spezifisch mit dem proneuralen bHLH-Faktor *Math1* bei der Bildung von dI1-Interneuronen kooperiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen, den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Cst* in das komplexe Netzwerk der Musterbildung im Neuralrohr einzuordnen. *Cst* stellt einen von der Dachplatte gesteuerten Mediator dar, durch dessen Eigenschaften das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung in Vorläuferzellen beeinflusst und darüber hinaus spezifisch mit Programmen zur Determination neuronaler Subtypen kombiniert wird.

6 SUMMARY

The efficient central nervous system of an adult organism is the result of precisely coordinated processes, which ensure that during neurogenesis a wide range of different neurons develop in proper numbers at the appropriate time and location. It is an intention of developmental biology research to elucidate the molecular mechanisms of pattern formation and to ascertain which factors are involved in these processes. During dorsal-ventral patterning in the vertebrate neural tube the roof plate controls as a main signalling centre several signal transduction pathways and regulates the expression of different factors. These factors direct proliferation and differentiation processes in progenitor cells and contribute to the specification of neurons to distinct neuronal subtypes. The zinc finger transcription factor *Cst* is expressed evolutionary conserved during vertebrate neurogenesis in murine and chicken embryos. Within the developing neural tube *Cst* is expressed in cells of the dorsal progenitor populations dP1-dP3 as well as in newly generated neurons in lateral and ventral domains of the neural tube. The analysis of mouse knockout mutants in combination with overexpression studies in chicken embryos have shown that *Cst* expression in the dorsal neural tube is regulated by Bmp signalling from the roof plate. Experiments to examine the function of *Cst* demonstrate that after the ectopic expression of *Cst* in the neural tube neuronal progenitor cells stop proliferation prematurely, start to differentiate and migrate out of the ventricular into the mantle zone. The results of further studies indicate that *Cst* promotes neuronal differentiation independently of proneural gene function. Instead of interfering with the known network of proneural activity *Cst* mediates in parallel that progenitor cells withdraw from the cell cycle and initiate differentiation. In addition this work reveals that *Cst* is also involved in the determination of a neuronal subtype as a co-factor and specifically cooperates together with the proneural bHLH factor *Math1* in the generation of dI1 interneurons. Together these data allow to integrate *Cst* into the complex network of pattern formation in the neural tube. *Cst* is a mediator controlled by the roof plate that affect the balance between proliferation and differentiation and further combine these processes specifically with programs for neuronal subtype determination.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

α	anti, <i>alpha</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammonium-Peroxidisulfat
AS	Aminosäure
bHLH	basische(r) Helix-Loop-Helix
Bmp	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BmpR	<i>Bone morphogenetic protein receptor</i>
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C ₂ -H ₂	Cystidin, Cystidin-Histidin, Histidin
ca.	<i>circa</i>
Cath	<i>Chicken athonal homologue</i>
Cash	<i>Chicken achaete-scute homologue</i>
cCst	<i>Chicken Cst</i>
CdK	<i>Cycline dependend kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFP	Zyan fluoreszierendes Protein
Chx	Chox
Ci	Cubitus interruptus
CIP	CdK-inhibierendes Protein, alkalische Phosphatase
cNgn	<i>Chicken Neurogenin</i>
Cys	Cystidin
<i>D. melanogaster.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt

dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
E	Tag der Embryonalentwicklung
Σ	Summe
<i>E. coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
En	Engrailed
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
Evx	<i>Evenskipped homologue</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>F. lateralis</i>	<i>Funiculus lateralis</i>
<i>F. posterior</i>	<i>Funiculus posterior</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
Gdf	<i>Growth differentiation factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HD	Homeodomäne
HH	Hamburger Hamilton
His	Histidin
HLH	Helix-Loop-Helix
HMG	<i>High mobility group</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
Isl1/2	Islet1/2
ka	konstitutiv aktiv
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth

m	Meter
M	Molar, mitotische Teilung
Math	<i>Mouse atonal homologue</i>
Mash	<i>Mouse achaete-scute homologue</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MN	Motorneuronen
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MZ	Mantelzone
N	normal
nE	nach Elektroporation
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
poly(A) ⁺	polyadenyliert
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	<i>Ribonukleinacid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
s	Sekunde
S	Synthesephase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
s.o.	siehe oben
SSC	<i>standard saline citrate</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA

TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UV	Ultraviolettlicht
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
VZ	ventrikuläre Zone
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Sequenzen

7.2.1 Csf I-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz

```

1  ggggagcgaaaaatccgggatccggcaacttcgggtcgcgcatgcgcgcccggcggtcc
61  atcccaaacacacacacatttttccccggacttgaaagtcacccaaagccgcccgaag
121 gcaggcacacagaccttgctgacggaaggcagacctctccatctcacctgcctccaac
181 tgcttgactaccactcctccttctccggggaccctgcagctccccgggtggtgcat
241 tggaatggacttcggaccttgactctgggatgcaaaggatgaagtgacccccacccc
301 aactgtgtttgaggaatctctaggacccc*tgagagtttgggaccaaggagcggagaatg 360
                                     *      M

361 gat ctt gga aca gct gaa agc acc cgg tgc acc gac cca cct gca ggc aag cct cca atg
   D  L  G  T  A  E  S  T  R  C  T  D  P  P  A  G  K  P  P  M

421 gca gcc aag cgc aaa ggc ggc ctg aag ctc aac gcc atc tgt gcc aag ctc agc cga cag
   A  A  K  R  K  G  G  L  K  L  N  A  I  C  A  K  L  S  R  Q

481 gtg gtc gtg gag aag gga gca gag gcc ggc tcc caa gcc gaa ggt agc cca cta cat ccc
   V  V  V  E  K  G  A  E  A  G  S  Q  A  E  G  S  P  L  H  P

541 cgg gac aaa gag cgc agt ggc cct gag tct ggg gtg agc cgg gct ccc cga agt gaa gaa
   R  D  K  E  R  S  G  P  E  S  G  V  S  R  A  P  R  S  E  E

601 gac aag agg cgg gca gtg atc gag aaa tgg gtc aat gga gag tac tgt gag gat ccc gca
   D  K  R  R  A  V  I  E  K  W  V  N  G  E  Y  C  E  D  P  A

661 ccc acc cca gtg ttg ggg cgt att gcc cgt gat cag gag ctg ccc cca gag ggt gtc tac
   P  T  P  V  L  G  R  I  A  R  D  Q  E  L  P  P  E  G  V  Y

721 atg gtc cag cca cag ggc tgc agt gac gaa gaa gac cat gca gaa gag ccc tca aaa gat
   M  V  Q  P  Q  G  C  S  D  E  E  D  H  A  E  E  P  S  K  D

781 aac agt gtc ctg gag gag aag gag tca gat ggt acg gct tct aaa gat gac agc ggc ccc
   N  S  V  L  E  E  K  E  S  D  G  T  A  S  K  D  D  S  G  P

841 agc acc agg cag gct tca gga gaa acc tcc tct ctg agg gac tac gct gct tcc acc atg
   S  T  R  Q  A  S  G  E  T  S  S  L  R  D  Y  A  A  S  T  M

901 acc gag ttc ctt ggc atg ttt ggc tac gat gac cag aac acc agg gat gag ctg gcc aag
   T  E  F  L  G  M  F  G  Y  D  D  Q  N  T  R  D  E  L  A  K

961 aag atc agc ttt gag aag cgg cat gca ggc tcc acc ccc gag gtg gct gcc tct tcc atg
   K  I  S  F  E  K  P  H  A  G  S  T  P  E  V  A  A  S  S  M

1021 ttg ccc tcc tct gag gat acc ctc agc aag cgg gcg cgc ttc tcc aaa tac gag gaa tac
   L  P  S  S  E  D  T  L  S  K  R  A  R  F  S  K  Y  E  E  Y

1081 atc cgt aag ctc aag gcc ggc gag caa ctt ccc tgg cca gcc cac ggg agc aaa gcc gag
   I  R  K  L  K  A  G  E  Q  L  P  W  P  A  H  G  S  K  A  E

1141 gac cgg gca ggc aag gag gtg gtg ggt ccc tta ccc agc cta cgg ctg ccc agc aac acg
   D  R  A  G  K  E  V  V  G  P  L  P  S  L  R  L  P  S  N  T

1201 gcc cac ctg gaa acc aag gcc acc atc ctg cca ctg cca tca cac agc agt gtc cag atg
   A  H  L  E  T  K  A  T  I  L  P  L  P  S  H  S  S  V  Q  M

1261 cag aat ctg gta gct cgt gct tcc aag tat gac ttc ttc atc cac aaa ctg aag aca ggc
   Q  N  L  V  A  R  A  S  K  Y  D  F  F  I  H  K  L  K  T  G

1321 gag aac ctg agg ccc cag aat gga agc act tac aag aag cca tcc aag tat gac ctg gag
   E  N  L  R  P  Q  N  G  S  T  Y  K  K  P  S  K  Y  D  L  E

1381 aat gtc aag tac ttg cac ctc ttc aaa ccc ggg gaa ggc agc cct gac atg ggc ggg gcc
   N  V  K  Y  L  H  L  F  K  P  G  E  G  S  P  D  M  G  G  A

1441 atc gcc ttc aag aca ggc aag gtg ggg cgc ccc tct aag tac gac gtt cgg ggc atc cag
   I  A  F  K  T  G  K  V  G  R  P  S  K  Y  D  V  R  G  I  Q

1501 aag cca ggc cct acc aag att ccg ccc gcc ccc agc ctg gtt cct aca ccc ctc acc aat
   K  P  G  P  T  K  I  P  P  A  P  S  L  V  P  T  P  L  T  N

```

1561 gtg ccc agt gct ccc agc acc ccc gga cca gga ccg gag cca cct gcc tcc ctg tcc ttc
 V P S A P S T P G P G P E P P A S L S F
 1621 aac act ccc gag tac ctg aag tca acc ttt tcc aaa aca gac tcc atc acc aca gga act
 N T P E Y L K S T F S K T D S I T T G T
 1681 gtc tcc act gtc aag aac gga ttg ccc aca gat aaa cca gct gtc acc gaa gat gta aac
 V S T V K N G L P T D K P A V T E D V N
 1741 att tac cag aaa tat att gcc agg ttc tca gga agt cag cac tgc ggt cac atc cac tgc
 I Y Q K Y I A R F S G S Q H C G H I H C
 1801 gcc tac cag tac cgt gag cac tat cac tgc ctg gac ccg gag tgc aac tac cag cgg ttc
 A Y Q Y R E H Y H C L D P E C N Y Q R F
 1861 aca agc aag cag gat gtg atc cga cat tac aac atg cac aag aag cgc gac aac tcc ctg
 T S K Q D V I R H Y N M H K K R D N S L
 1921 cag cac ggc ttc atg cgc ttc agc ccg ctg gac gac tgc agt gtc tac tac cac ggc tgc
 Q H G F M R F S P L D D C S V Y Y H G C
 1981 cac ctc aat ggg aag agc acc cac tac cac tgc atg cag gtg gga tgt aac aag gta tac
 H L N G K S T H Y H C M Q V G C N K V Y
 2041 aca agt aca tcg gat gtg atg act cac gag aac ttc cac aag aag aac acc cag ctc atc
 T S T S D V M T H E N F H K K N T Q L I
 2101 aac gat ggc ttc cag cgc ttc cga gcc acg gag gac tgc ggc aca gct gac tgt cag ttc
 N D G F Q R F R A T E D C G T A D C Q F
 2161 tat gga cag aag acc aca cac ttc cac tgc agg cgc cct ggc tgc aca ttc acc ttc aag
 Y G Q K T T H F H C R R P G C T F T F K
 2221 aac aag tgt gac atc gag aag cac aag agc tac cac atc aag gat gat gcc tac gcc aag
 N K C D I E K H K S Y H I K D D A Y A K
 2281 gac ggc ttc aag aag ttc tac aag tac gag gag tgc aaa tac gag ggc tgc atg tac agc
 D G F K K F Y K Y E E C K Y E G C M Y S
 2341 aag gcc acc aac cat ttc cac tgc atc cgc gcc ggc tgc ggc ttc acc ttc acc tcc acc
 K A T N H F H C I R A G C G F T F T S T
 2401 agc cag atg acc tca cac aag cgc aag cac gag cgg cgg cac atc cgg tcc tcg ggg gcc
 S Q M T S H K R K H E R R H I R S S G A
 2461 ctg ggg ctg ccg gcc tcc ctg ctg ggc gcc aag gac acg gag cac gag gaa tcc agc aac
 L G L P A S L L G A K D T H E E S S N
 2521 gat gac ctc gtg gac ttc tct gcc ctg agc agc aag aac tcc agc ctg agc gcc tcc ccc
 D D L V D F S A L S S K N S S L S A S P
 2581 acc agc cag caa tcg tcc gca tcc ctg gcc gct gcg gct gcc gcc acc act gct gag gcc
 T S Q Q S S A S L A A A A A A T T A E A
 2641 atc ccc agt gcc acc aag cct ccc aat agc aag atg gca ggc ctg ctg ccc cag ggc ctg
 I P S A T K P P N S K M A G L L P Q G L
 2701 tct ggt tcc atc ccc tta gca ctg gcc ctc tct aac tca ggc ctg ccc acc acc aca ccc
 S G S I P L A L A L S N S G L P T T T P
 2761 tat ttc oct ctg ctt cct aac cgt ggg agc gcc tca ttg cct gta gga tct cca ggg ctc
 Y F P L L P N R G S A S L P V G S P G L
 2821 ctg ggc tcc atg tcc tct ggg gcc aca acc tca gca acc cct gac atg ccg gct ctg atg
 L G S M S S G A T T S A T P D M P A L M
 2881 gct tcc aga gct gga gac tcg gcc ccc acg gct tcc acc tct ctc tcg gtg ccc cct gcc
 A S R A G D S A P T A S T S L S V P P A
 2941 tcc atc att gag aga atc tct gca agc aaa ggc ctc atc tca ccc atg atg gct aga ctg
 S I I E R I S A S K G L I S P M M A R L
 3001 gct gcg gcc gcc ctc aag ccc tct gcc acc ttt gac cca gga agt ggg cag cag ccc acc
 A A A A L K P S A T F D P G S G Q Q P T
 3061 ccc acc aag ttc ccc cag gcc cag gtg aag cag gag cct gac agt gct ggc acc cca ggt
 P T K F P Q A Q V K Q E P D S A G T P G
 3121 ccc cac gag gcc tcc caa gac cgc agt cta gac ctg acc gtg aag gat ccc agt aat gaa
 P H E A S Q D R S L D L T V K D P S N E
 3181 tca aat ggc cac gca gtc tcg gca aat tca tct ctt tta tcc tcg ctt atg aat aag atg
 S N G H A V S A N S S L L S S L M N K M

```

3241 tct cag ggc aac ccc agc ctc gaa agc ttt ctg aac atc aag aca gaa gcg gag ggg agc
      S  Q  G  N  P  S  L  E  S  F  L  N  I  K  T  E  A  E  G  S
3301 ccc gcc ggg gag ccc tcg cct ttc ttg ggc aag gcc gtg aag gca cta gtt caa gag aag
      P  A  G  E  P  S  P  F  L  G  K  A  V  K  A  L  V  Q  E  K
3361 ctg tca gag cct tgg aag gtg tat ctc cgc agg ttt ggt acc aag gac ttc tgt gat gcc
      L  S  E  P  W  K  V  Y  L  R  R  F  G  T  K  D  F  C  D  A
3421 cag tgt gac ttc ctc cac aag gcg cat ttc cat tgt gtg gtg gag gag tgc ggt gcg ctt
      Q  C  D  F  L  H  K  A  H  F  H  C  V  V  E  E  C  G  A  L
3481 ttc agc acc ttg gac gga gcc atc aaa cat gca aac ttc cac ttc cgg aca gag gga gga
      F  S  T  L  D  G  A  I  K  H  A  N  F  H  F  R  T  E  G  G
3541 aca gca aaa gga acc cca gag gct tcc ttc ccg acc tct gct gct gag acc aaa cct ccc
      T  A  K  G  T  P  E  A  S  F  P  T  S  A  A  E  T  K  P  P
3601 ttg gca ccc tcg tcc ctg cca gca cct cct ggc acc atg gtc gct gga tct tct ctg gag
      L  A  P  S  S  L  P  A  P  P  G  T  M  V  A  G  S  S  L  E
3661 ggg cct gct ccc agc ccg gtc tct gtg ccc tcc acc ccc acc ctg ctc gcc tgg aag cag
      G  P  A  P  S  P  V  S  V  P  S  T  P  T  L  L  A  W  K  Q
3721 ctg gct tcc acc ata ccc cag atg cct cag att ccc tcc tca gtg cct cac ctg ccc acc
      L  A  S  T  I  P  Q  M  P  Q  I  P  S  S  V  P  H  L  P  T
3781 tcg ccc ctg gcg acg acg tct cta gag agc gcc aag cct cag gtc aaa ccc ggg ttc ctc
      S  P  L  A  T  T  S  L  E  S  A  K  P  Q  V  K  P  G  F  L
3841 cag ttc cag gac aag tga gtc cct cca tga gcc gcc acc tgt ccc tgt gtc ttg gga gtg
      Q  F  Q  D  K  *
3901 ggtatggccagggcagcaaggaggccctgctcctcgcctcgcagagttacactggctgcc
3961 ctcagcctctgggacttagttttccaactgtatgcttgtaccgagcagccagtaagtggg
4021 gggatgagggcgcaagcgaccttatcccagtgatctgttgggatcctcaaggactggc
4081 tgggtgagctaggtatgggggtccctcaggaaacttctctggctcctacaaaaggctgtg
4141 ttcccttggggccaccttgctggccagctctgtggtgcatacccaggctgagtgcaatagg
4201 acagggaggcatggatgggagcagggccttaggccctcaaggtccacaccgtgggtcaag
4261 ggtggaaggaaccttctcacttaatgggtgggtgcttcttgccggcgagaacggtgacttt
4321 gtatcataaagtgtgtggcttctctgttctcaataaaaagtaataaattggattattta 4378.

```

In der aufgeführten *Cst* I-Sequenz ist das Start-Kodon an Position 358 der cDNA grün unterlegt, das Stopp-Kodon an Position 3856 rot. Die zentrale Domäne der *Cst*-Motive 1-4 von Position 1783 bis 2502 ist entsprechend der Einzelmotive alternierend mit hell- und dunkelgrau unterlegt und die charakteristischen C₂H₂-C₂H₂-Bereiche noch einmal gesondert durch gelb hervorgehoben. Der Bereich des fünften *Cst*-Motivs von Position 3424 bis 3534 ist in gleicher Weise gekennzeichnet und enthält abweichend von den anderen Motiven nur eine CH₂-C₂H₂-Domäne. In der von le Viseur verwendeten Sequenz führt ein Basenaustausch an der mit rot unterlegten Position 491 zu einem Abbruch der Translation wodurch das translationsrelevante Start-Kodon an Position 898, in der Sequenz mit grün markiert, vermutet wurde. Im Vergleich ist die in dieser Arbeit verwendete *Cst* I-Sequenz damit um den türkis unterlegten Bereich von 540 Basen erweitert und das resultierende Protein mit insgesamt 1166 Aminosäuren um 180 AS verlängert.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der grauen und weißen Substanz im Zentralnervensystem	10
Abb. 2: Schematische Darstellung der Hirnregionen	11
Abb. 3: Rückenmark im Wirbelkörper.....	13
Abb. 4: Schematische Darstellung des inneren Struktur des Rückenmarks	14
Abb. 5: Schematische Darstellung der Bildung des Neuralrohres.	15
Abb. 6: Schematische Darstellung der Hirnanlage.	16
Abb. 7: Schematische Darstellung der Bildung der ventrikulären Zone und der Mantelzone im Neuralrohr	17
Abb. 8: Schematische Darstellung der Musterbildung im Neuralrohr.	18
Abb. 9: Schematische Darstellung der Musterbildung im ventralen Neuralrohr.	20
Abb. 10: Schematische Darstellung der Musterbildung im dorsalen Neuralrohr.....	22
Abb. 11: Expression von <i>Cst</i> im Neuralrohr von Maus- und Hühnchenembryonen.....	59
Abb. 12: <i>Cst</i> I und <i>Cst</i> II stellen alternative Spliceprodukte dar.....	61
Abb. 13: RT-PCR zur Verifizierung der <i>Cst</i> I-mRNA.....	63
Abb. 14: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCS2+MT.....	64
Abb. 15: Schematische Darstellung des Myc- <i>Cst</i> -Konstruktes.....	64
Abb. 16: Schematische Darstellung des pCAGGS (IRES-GFP)-Vektors.....	66
Abb. 17: <i>Cst</i> induziert Differenzierung.....	67
Abb. 18: <i>Cst</i> hat keinen Einfluss auf die Subtypspezifizierung von Interneuronen des Rückenmarks.....	69
Abb. 19: Induktion von p27 durch <i>Math1</i> und <i>Ngn1</i> aber nicht durch <i>Cst</i>	71
Abb. 20: Molekulare Mechanismen <i>Cst</i> -induzierter neuronaler Differenzierung.....	74
Abb. 21: Einfluss von Myc- <i>Cst</i> auf die <i>Sox2</i> Expression.....	75
Abb. 22: Das Fusionsprotein GST- <i>Cst</i> _{M1-4}	79
Abb. 23: Schematische Darstellung der Myc- <i>Cst</i> _{M1-4} , Myc- <i>Cst</i> _{M1-4} -E1A- und Myc- <i>Cst</i> _{M1-4} -EngR-Konstrukte... ..	81
Abb. 24: Expression von Myc- <i>Cst</i> _{M1-4} , -E1A und -EngR in differenzierten Neuronen.....	82
Abb. 25: Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und <i>Hes5</i> -GFP.....	83
Abb. 26: Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und <i>Id2</i> -GFP.....	85
Abb. 27: Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und <i>Math1</i>	88
Abb. 28: Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und <i>Ngn1</i> -GFP.....	89
Abb. 29: dI1-Interneuronen nach der Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und <i>Ngn1</i> -GFP.....	90
Abb. 30: Koelektroporation von Myc- <i>Cst</i> und <i>Cash1</i> -GFP.....	92
Abb. 31: Regulation der <i>Cst</i> -Expression durch Signalmoleküle aus der Dachplatte.....	94
Abb. 32: Einfluss der Wnt-Signaltransduktion auf die Expression von <i>Cst</i>	96
Abb. 33: Einfluss der Bmp-Signaltransduktion auf die <i>Cst</i> -Expression.....	98

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide.....	39
Tabelle 2: Digoxigenin-markierte RNA-Sonden	41
Tabelle 3: Expressionsplasmide zur in ovo Elektroporation.....	50
Tabelle 4: Erstantikörper für Gefrierschnitte	54
Tabelle 5: Fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper	54
Tabelle 6: Erstantikörper für Paraffinschnitte	55
Tabelle 7: Biotinylierter Zweitantikörper	56

7.5 Literaturverzeichnis

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. und Kemler, R. (1997)

beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.

EMBO, **16**, 3797 - 3804

Akazawa, C., Ishibashi, M., Shimizu, C., Nakanishi, S. und Kageyama, R. (1995)

A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system.

The Journal of Biological Chemistry, **270**, 8730 – 8738

Alifragis, P., Poortinga, G., Parkhurst, S.M. und Delidakis, C. (1997)

A network of interacting transcriptional regulators involved in *Drosophila* neural fate specification revealed by yeast two hybrid system.

Proc Natl Acad Sci USA, **94**, 13099 - 13104

Altaba, A. (1998)

Combinatorial *Gli* gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog.

Development, **125**, 2203 – 2212

Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S. und Martí, E. (2008)

Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression.

Development, **135**, 237 - 247

Arkell, R. und Beddington, R.S. (1997)

BMP7 influences pattern and growth of the developing hindbrain of mouse embryos.

Development, **124**, 1 - 12

Aruga, J., Tohmonda, T., Homma, S. und Mikoshiba, K. (2002)

Zic1 promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal chord by inhibiting neuronal differentiation.

Developmental Biology, **244**, 329 - 341

Badiani, P., Corbella, P., Kioussis, D., Marvel, J. und Weston, K. (1994)

Dominant interfering alleles define a role for c-Myb in T-cell development.

Genes and Development, **8**, 770 - 782

Bai, G., Sheng, N., Xie, Z., Bian, W., Yokota, Y., Benezra, R., Kageyama, R., Guillemot, F. und Jing, N. (2007)

Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1.

Developmental Cell, **13**, 283 - 297

Bardeesy, N. und Pelletier, J. (19998)

Overlapping RNA and DNA binding domains of the wt1 tumor suppressor gene product.

Nucleic Acid Research, **26**, 1784 - 1792

- Bastian, H. und Gruss, P. (1990)**
A murine *even-skipped* homologue, *Evx1*, is expressed during early embryogenesis and neurogenesis in a biphasic manner.
EMBO J, **9**, 1839 – 1852
- Ben-Arie, N., McCall, A.E., Berkman, S., Eichele, G., Bellen, H.J. und Zoghbi, H.Y. (1996)**
Evolutionary conservation of sequence and expression of the bHLH protein Atonal suggests a conserved role in neurogenesis.
Human Molecular Genetics, **5**, 1207 - 1216
- Bermingham, N.A., Hassan, B.A., Wang, V.Y., Fernandez, M., Banfi, S., Bellen, H.J., Fritsch, B. und Zoghbi, H.Y. (2001)**
Proprioceptor pathway development is dependent on MATH1.
Neuron, **30**, 411 - 422
- Bertrand, N. Castro, D.S. und Guillemot, F. (2002)**
Proneural genes and the specification of neural cell types.
Nat Rev Neuroscience, **3**, 517 - 530
- Birnboim, H. C. (1983)**
A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.
Methods Enzymol., **100**, 243 - 255
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979)**
A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acid Research, **7**, 1513 - 1522
- Briscoe, J., Periani, A., Jessell, T.M. und Ericson, J. (2000)**
A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube.
Cell, **101**, 435 - 445
- Briscoe, J. und Ericson, J. (2001)**
Specification of neuronal fates in the ventral neural tube.
Current Opinion in Neurobiology, **11**, 42 - 49
- Brody, T. und Odenwald, W.T. (2000)**
Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* lineage development.
Developmental Biology, **226**, 34 - 44
- Brown, R.S. (2005)**
Zinc finger proteins: getting a grip on RNA.
Current Opinion in Structural Biology, **15**, 94 - 98
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B.G. und Muhr, J. (2003)**
Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity.
Nature Neuroscience, **6**, 1162 - 1168
- Cai, L., Morrow, E.M. und Cepko, C.L. (2000)**
Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects.
Development, **127**, 3021 - 3030

- Capdevila, J. und Johnson, R.L.** (1998)
Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning.
Developmental Biology, **197**, 205 - 217
- Capecchi, M.R.** (1998a)
Altering the genome by homologous recombination.
Science, **244**, 1288 - 1292
- Capecchi, M.R.** (1998a)
The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting.
Trends in Genetic, **5**, 70 - 76
- Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S.H., Hastie, N.D., Little, M. und Holmes, G.** (1996)
RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins.
Proc Natl Acad Sci USA, **93**, 7562 - 7566
- Cau, E., Casarosa, S und Guillemot, F.** (2002)
Mash1 and *Ngn1* control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage.
Development, **129**, 1871 - 1880
- Chan-Thomas, P.S., Thompson, R.P., Robert, B., Yacoub, M.H. und Barton, P.J.** (1993)
Expression of homeobox genes *Msx-1* (Hox-7) and *Msx-2* (Hox-8) during cardiac development in the chick.
Developmental Dynamics, **197**, 203 - 216
- Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M.W., Feder, J.N., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. und Ball, D.W.** (1997)
Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression.
Proc Natl Acad Sci USA, **94**, 5355 - 5360
- Chesnutt, C., Burrus, L.W., Brown, A. und Niswander, L.** (2004)
Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGF- β and WNT activity.
Developmental Biology, **274**, 334 - 347
- Chizhikov, V.V. und Millen, K.J.** (2005)
Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system.
Developmental Biology, **277**, 287 - 295
- Clegg, R.M.** (1995)
Fluorescence resonance energy transfer.
Current Opinion in Biotechnology, **6**, 103 - 110
- Conlon, F.L, Sedgwick, S.G., Weston, K.M. und Smith, J.C.** (1996)
Inhibition of *Xbra* transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of *Xbra* in dorsal mesoderm.
Development, **122**, 2427 - 2435
- Cui, X. und Doe, C.** (1992)
ming is expressed in neuroblast sublineages and regulates gene expression in the *Drosophila*

central nervous system.

Development, **116**, 943 - 952

Davidson, D. (1995)

The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes.

Trends in Genetic, **11**, 405 - 411

Davis, R.L. und Turner, D.L. (2001)

Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning.

Oncogene, **20**, 8342 - 8357

Dickinson, M.E., Krumlauf, R. und McMahon, A.P. (1994)

Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system.

Development, **120**, 1453 – 1471

Diez del Corral, R. und Storey, K. (2001)

Markers in vertebrate neurogenesis.

Nature Reviews Neuroscience, **2**, 835 - 839

Dodd, J., Jessell, T.M. und Placzek, M. (1998)

The when and where of floor plate induction.

Science, **282**, 1654 - 1657

Dubreuil, V., Hirsch, M.R., Jouve, C. Brunet, J.F. und Goridis, C. (2002)

The role of Phox2b in synchronizing pan-neural and type-specific aspects of neurogenesis.

Development, **129**, 5241 - 5253

Dyer, M.A. und Cepko, C.L. (2001)

p27Kip1 und p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations.

Journal of Neuroscience, **21**, 4259 – 4271

Ebert, J.P., Timmer, J.R., Nakada, Y., Helms, A.W., Preeti, B., Liu, Y., Hunsaker, L. und Johnson, J.E. (2003)

Zic1 represses Math1 expression via interactions with the *Math1* enhancer and modulation of *Math1* autoregulation.

Development, **130**, 1949 - 1959

Echelard Y, E.D., St-Jacques, B., Shen, L. Mohler, J., McMahon, J.A., und McMahon, A.P. (1993)

Sic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity

Cell, **75** (7), 1417 - 1430

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. und Jessel, T.M. (1996)

Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity

Cell, **87**, 661 - 673

Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessel, T.M. und Briscoe, J. (1997)

Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling.
Cell, **90**, 169 - 180

Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessel, T.M. und Yamada, T. (1992)
Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*.
Science, **256**, 1555 - 1560

Fantl, V., Edwards, P.A.W., Steel, J.H., Vonderhaar, B.K. und Dickson, C. (1999)
Impaired mammary gland development in *Cyl*^{-/-} mice during pregnancy and lactation is epithelial cell autonomous.
Developmental Biology, **212**, 1 - 11

Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I. und Dickson, C. (1995)
Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development.
Genes and Development, **9**, 2364 - 2372

Farah, M.H., Olson, J.M., Sucic, H.B., Hume, R., Tapscott, S.J. und Turner, D.L. (2000)
Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells.
Development, **127**, 693 - 702

Finerty, P.J. und Bass, B.L. (1997)
A *Xenopus* zinc finger protein that specifically binds dsRNA and RNA-DNA hybrids.
Journal of molecular biology, **271**, 195 - 208

Finerty, P.J. und Bass, B.L. (1999)
Subset of zinc finger motifs in dsRBP-Zfa can bind double-stranded RNA.
Biochemistry, **38**, 4001 - 4007

Furuta, Y., Piston, D.W. und Hogan, B.L. (1997)
Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulator of dorsal forebrain development.
Development, **124**, 2203 - 2212

Gamsjäger, R., Liew, C.K., Loughlin, F.E., Crossley, M. und Mackay, J.P. (2007)
Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs.
Trends in Biochemical Science, **32**, 63 - 70

Giagtzoglou, N., Alifrgis, P., Koumbanakis, K.A. und Delidakis, C. (2003)
Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes.
Development, **130**, 259 - 270

Gilbert, F.S. (Hrsg.) (2000)
Developmental Biology. Sixth Edition.
Sinauer Associates, Inc. Publishers, **42**, Sunderland, Massachusetts

Giullemot, F und Joyner, A.L. (1993)
Dynamic expression of the murine Achete-Scute homologue *Mash-1* in the developing nervous system.
Mechanisms of Development, **42**, 171 - 185

Gowan, K., Helms, A.W., Hunsaker, T.L., Collisson, T., Ebert, P.J., Odom, R. und Johnson, J.E. (2001)
Crossinhibitory activities of *Ngn1* and *Math1* allow specification of distinct dorsal

interneurons.

Neuron, **31**, 219 - 232

Götz, K. (2006)

Funktionelle Analyse der *Iroquois*-Gene während der Entwicklung des Rückenmarks: Identifizierung von *Olig2* als Zielgen.

Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gradwohl, G., Fode, C. und Guillemot, F. (1996)

Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors.

Developmental Biology, **180**, 227 - 241

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. und Pevny, L. (2003)

SOX2 functions to maintain neural progenitor identity.

Neuron, **39**, 749 - 765

Hall, T.M. (2005)

Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins.

Current Opinion in Structural Biology, **15**, 367 - 373

Hamburger, V. und Hamilton, H.L. (1951)

A series of normal stages in the development of the chick embryo.

J. Morphol., **88**, 49 - 92

Han, K und Manley, J.L. (1993)

Functional domains of the *Drosophila* engrailed protein.

EMBO J, **12**, 2723 - 2733

Hardcastle, Z. und Papalopulu, N. (2000)

Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27(XIC1) and imparting a neural fate.

Development, **127**, 1303 - 1314

Helms, A.W. und Johnson, J.E. (1998)

Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression.

Development, **125**, 919 - 925

Helms, A.W. und Johnson, J.E. (2003)

Specification of dorsal cord interneurons.

Current Opinion in Neurobiology, **13**, 42 - 49

Helms, A.W., Battiste, J., Henke, R.M., Nakada, Y., Simplicio, N., Guillemot, F. und Johnson, J.E. (2005)

Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal chord interneurons.

Development, **132**, 2709 - 2719

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J und Ish-Horowicz D. (1995)

Expression of a Delta homolog in prospective neurons in the chick.

Nature, **375**, 787 - 790

Hill, R.E., Jones, P.F., Rees, A.R., Sime, C.M., Justice, M.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Graham, E. und Davidson, D.R. (1989)

A new family of mouse homeobox-containing genes: molecular structure, chromosomal location and developmental expression of Hox-7.1.

Genes and Development, **3**, 26 - 37

Hollyday, M., McMahon, J.A. und McMahon, A.P. (1995)

Wnt expression patterns in chick embryo nervous system.

Mechanisms of Development, **52**, 9 – 25

Hsieh, J.C. (2004)

Specificity of WNT-receptor interactions.

Frontiers in Bioscience, **1**, 1333 - 1338

Hu, G., Lee, H., Price, S.M., Shen, M.M. und Abate-Shen, C. (2001)

Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of *cyclin D1*.

Development, **128**, 2373 - 2384

Hurtado Vacalla, C.M. und Theil, T. (2002)

Cst, a novel mouse gene related to *Drosophila* Castor, exhibits dynamic expression patterns during neurogenesis and heart development.

Mechanisms of Development, **118**, 265 - 268

Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J. und Israel, M.A. (1994)

The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein.

Genes and Development, **8**, 1270 - 1284

Ikeya, M., Lee, K.J., Johnson, J.E., McMahon, A.P. und Takada, S. (1997)

Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors.

Nature, **389**, 966 - 970

Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990)

High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

Gene, **96**, 23 - 28

Ishibashi, M., Ang, S.L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. und Guillemont, F. (1995)

Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to upregulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis and severe neural tube defects.

Genes and Development, **9**, 3136 - 3148

Isshiki, T., Pearson, B., Holbrock, S. und Doe, C.Q. (2001)

Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny.

Cell, **106**, 511 - 521

Iuchi, S. (2001)

Three classes of C₂H₂ zinc finger proteins.

Cell. Mol. Life Sci., **58**, 625 - 635

Janning, W. and Knust, E. (2004)

Genetik – Allgemeine Genetik – Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik.
Thieme, **1. Aufl.**, 236

Jasoni, C.L., Walker, M.B. und Reh, T.A. (1994)

A chicken achaete-scute homolog (Cash-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system.
Development, **120**, 769 - 783

Jen, Y., Manova, K. und Benezra, R. (1997)

Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis.
Developmental Dynamics, **208**, 92 - 106

Jessell, T.M. und Dodd, J. (1990)

Floor plate-derived signals and the control of neural cell pattern in vertebrates.
Harvey Lect., **86**, 87 - 128

Johnson, J.E., Birren, S.J. und Anderson, D.J. (1990)

Two rat homologues of *Drosophila achaete-scute* specifically expressed in neuronal precursors.
Nature, **346**, 858 - 861

Jones, C.M., Lyons, K.M. und Hogan, B.L. (1991)

Involvement of bone morphogenetic protein-4 (Bmp4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse.
Development, **111**, 531 - 542

Kamachi, Y., Uchikawa, M und Kondho, H. (2000)

Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development.
Trends in Genetics, **16**, 182 - 187

Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S.J. und Odenwald, W.F. (1998)

Regulation of POU genes by *castor* and *hunchback* establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS.
Genes and Development, **12**, 246 – 260

Kenworthy, A.K. (2001)

Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy.
Methods, **24**, 289 - 296

Kriks, S., Lanuza, G.M., Mizuguchi, R., Nkafuku, M. und Goulding, M. (2005)

Gsh2 is required for the repression of Ngn1 and specification of dorsal interneuron fate in spinal chord.
Development, **132**, 2991 - 3002

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage.
Nature, **227**, 680 - 685

le Viseur, Ch. (2002)

Untersuchungen zur Funktion des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors Castor während der Vertebraten-Neurogenese.

Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Lee, K.J., Mendelson, M. und Jessel, T.M. (1998)

Neuronal patterning by BMPs: A requirement for Gdf7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord.

Genes and Development, **12**, 3394 - 3407

Lee, K.J. und Jessel, T.M. (1999)

The specification of dorsal cell fates in the vertebrate.

Annu. Rev. Neuroscience, **22**, 261 - 294

Lee, K.J., Dietrich, P. und Jessel, T.M. (2000)

Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification.

Nature, **403**, 734 - 740

Lee, K.J. und Pfaff, L. (2001)

Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord.

Nature Neuroscience, **4**, 1183 - 1191

Levine, E.M., Close, J., Fero, M. Ostrovsky, A. und Reh, T.A. (2000)

p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina.

Developmental Biology, **219**, 299 – 314

Lewis, J. (1996)

Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis.

Current Opinion in Neurobiology, **6**, 3 - 10

Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D.W. und Rosenfeld, M.G. (2002)

Tissue-specific regulation of retinal and obituitary precursor cell proliferation .

Science, **297**, 1180 - 1183

Liem, K.F., Tremml, G., Roelink, H. und Jessel, T.M. (1995)

Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm.

Cell, **82**, 969 - 979

Liem, K.F., Tremml, G. und Jessel, T.M. (1997)

A role for the roof plate and its resident TGF- β -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal chord.

Cell, **91**, 127 - 138

Lieven, O. (2004)

Charakterisierung von alternativen Isoformen des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors Castor während der Musterbildung im dorsalen Neuralrohr.

Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Lillie, J.W. und Green, M.R. (1989)

Transcription activation by the adenovirus E1A protein.
Nature, **338**, 39 - 44

Ltingtung, Y. und Chiang, C. (2000)

Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3.
Natural Neuroscience, **3**, 979 - 985

Liu, F und Green, M., R. (1994)

Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains.
Nature, **368**, 520 – 525

Liu, Y., Helms, A.W. und Johnson J.E. (2004)

Distinct activities of Msx1 and Msx3 in dorsal neural tube development.
Development, **131**, 1017 - 1028

Liu, Z., Yang, X., Tan, F., Cullion, K. und Thiele, C.J. (2006)

Molecular cloning and characterization of human *Castor*, a novel human gene upregulated during cell differentiation.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **344**, 834 - 844

Lo, L.C., Johnson, J.E., Wuenschell, C.W., Saito, T. und Anderson, D.J. (1991)

Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially-restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells.
Genes and Development, **5**, 1524 - 1537

Logan C., Millar, C., Bharadia, V. und Rouleau, K. (2002)

Onset of Tlx-3 expression in the chick cerebellar cortex correlates with the morphological development of fissures and delineates a posterior transverse boundary.
The Journal of Comparative Neurology, **448**, 138 - 149

Ma, Q., Kintner, C. und Anderson, D.J. (1996)

Identification of *neurogenin*, a vertebrate neuronal determination gene.
Cell, **87**, 43 - 52

Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P. und Anderson, D.J. (1997)

Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands.
Journal of Neuroscience, **17**, 3644 - 3652

Manzanares, M., Trainor, P.A., Ariza-McNaughton, L., Nonchev, S. und Krumlauf, R. (2000)

Dorsal patterning defects in the hindbrain, roof plate and skeleton in the dreher (dr(J)) mouse mutant.
Mechanisms of Development, **94**, 147 - 156

Marcelle, C., Stark, M.R. und Bronner-Fraser, M. (1997)

Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite.
Development, **124**, 3955 - 3963

-
- Marine, J.C., Bellefroid, E.J., Pendeville, H., Martial, J.A. und Pieler, T. (1997)**
A role for *Xenopus* Gli-type zinc finger proteins in the early embryonic patterning of mesoderm and neuroectoderm.
Mechanisms of Development, **63**, 211 - 225
- Martinsen, B.J. und Bronner-Fraser, M. (1998)**
Neural crest specification regulated by the Helix-Loop-Helix repressor Id2.
Science, **281**, 988 - 991
- Matise, M.P. und Joyner, A.L. (1997)**
Expression patterns of developmental control genes in normal and *Engrailed-1* mutant mouse spinal cord reveal early diversity in developing interneurons.
Journal of Neuroscience, **17**, 7805 - 7816
- Megason, S.G. und McMahon, A.P. (2002)**
A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS.
Development, **129**, 2087 - 2098
- Mellerick, D.M., Kassis, J.A., Zhang, S.D und Odenwald, W.F. (1992)**
castor encodes a novel zinc finger protein required for the development of a subset of CNS neurons in *Drosophila*.
Neuron, **9**, 789 - 803
- Millonig, J.H., Millen, K.J. und Hatten, M.E. (2000)**
The mouse Dreher gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in vertebrate CNS.
Nature, **403**, 764 - 769
- Minshull, J. Blow, J.J. und Hunt, T. (1989)**
Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis.
Cell, **56**, 497 - 956
- Mishra, K., Gui, G. und Matise, M.P. (2008)**
Prox1 regulates a transitory state for interneuron neurogenesis in the spinal cord.
Developmental Dynamics, **237**, 393 - 402
- Moran-Rivard, L., Kagawa, T., Saueressig, H., Gross, M.K, Burrill, J. und Goulding, M. (2001)**
Evx1 is a postmitotic determinant of V0 interneuron identity in the spinal cord.
Neuron, **29**, 385 - 399
- Morgan, B., Sun, L., Avithal, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T. und Gonzales, E. (1997)**
Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with *Ikaros* to regulate lymphocyte differentiation.
EMBO, **16**, 2004 - 2013
- Mullen, R.J., Buck, C.R. und Smith, A.M. (1992)**
NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.
Development, **116**, 201 - 211
- Müller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P.A., Lewein G.R., Jessell, T.M. und Birchmeier, C. (2002)**
The homeodomain factor *Lbx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation
-

in the dorsal spinal cord.
Neuron, **34**, 551 - 562

Müller, T., Anlag, K., Wildner, H., Britsch, S., Treier, M. und Birchmeier, C. (2005)
The bHLH factor Olig3 coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord.
Genes and Development, **19**, 733 - 743

Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y. und Okumura, J. (1997)
Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **230**, 376 - 380

Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S. (2002).
Wnt signalling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord.
Genes and Development, **16**, 548 - 53.

Mutschler, E. (Hrsg.), Schaible, .G. und Vaupel, P. (2007).
Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Nakada, Y., Hunsaker, T.L., Henke, R.M. und Johnson, J.E. (2004)
Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neural differentiation versus neuronal cell-type specification.
Development, **131**, 1319 - 1330

Nakamura, Y, Skakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R. und Okano, H. (2000)
The bHLH gene Hes5 acts as a repressor of the neural commitment of CNS stem cells.
Journal of Neuroscience, **20**, 283 - 293

Nguyen, V.H., Trout, J., Connors, S.A., Andermann, P., Weinberg, E. und Mullins, M.C. (2000)
Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal chord are established by a BMP signaling pathway.
Development, **127**, 1209 - 1220

Norton, J.D. (2000)
ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis.
Journal of Cell Science, **113**, 3897 - 3905

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemont, F. und Kageyama, R. (2001)
Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain.
The Journal of Biological Chemistry, **276**, 30467 - 30474

Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.H., Turner, P.A., Hazel, T.G. und McKay, R.D. (2001)
BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors.
Genes and Development., **15**, 2094 - 2110

- Park, H.L., Bai, C., Platt, K.A., Matise, M.P., Beeghly, A., Hui, C.C., Nakashima, M. und Joyner, A.L. (2000)**
Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in Shh signaling in combination with a Gli2 mutation.
Development, **127**, 1593 - 1605
- Parras, C.M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D.J. and Guillemot, F. (2002)**
Divergent functions of the proneural genes *Mash1* and *Ngn2* in the specification of neuronal subtype identity.
Genes and Development, **16**, 324 - 338
- Perez, S.E., Rebelo, S. And Anderson, D.J. (1999)**
Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo.
Development, **126**, 1715 - 1728
- Periani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C. und Jessell, T.M. (1999)**
A Sonic hedgehog-independent, retinoid-activates pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord.
Cell, **97**, 903 - 915
- Perrson, M., Welscher, P., Andersson, E., Bose, J., Rüther, U., Ericson, J. und Briscoe, J. (2002)**
Dorsal-ventral patterning of the spinal chord requires Gli3 transcriptional repressor activity.
Genes and Development, **16**, 2865 – 2878
- Piston, D.W. und Kremers, G.J (2007)**
Fluorescent protein FRET: the good, the bad, the ugly.
Trends in Biochemical Science, **32**, 407 - 414
- Placzek, M. (1995)**
The role of the notochord and floor plate in inductive interactions.
Current opinion in genetic development, **5**, 499 - 506
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T. Jessell, T. und Dodd, J. (1990)**
Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord.
Science, **250**, 985 - 988
- Polyak, K., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. und Massague, J. (1992)**
Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitotic signals.
Cell, **78**, 59 - 66
- de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J. und Conlon, R.A. (1997)**
Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis.
Development, **124**, 1139 - 1148
- Quan, X.J., Denayer, T., Yan, J., Jafar-Nejad, H., Phillippi, A., Lichtarge, O., Vleminchz, K. und Hassan, B.A. (2004)**

Evolution of neural precursor selection: functional divergence of proneural proteins.
Development, **131**, 1679 - 1689

Robert, B., Sasson, D., Jacq, B., Gehring, W. und Buckingham, M. (1989)
Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis.
EMBO J, **8**, 91 - 100

Roelink, H. R., Porter, J. Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T. Beachy, P.A. und Jessell, T.M. (1995)
Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of Sonic hedgehog autoproteolysis.
Cell, **81**, 445 - 455

Ross, S.E, Greenberg, M.E. und Stiles, C.D. (2003)
Basic Helix-Loop-Helix factors in cortical development.
Neuron, **39**, 13 - 25

Roztocil, T. Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M. und Matter, J.M. (1997)
NeuroM a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis.
Development, **124**, 3263 - 3272

Saba, R., Saito, T. und Nakatsuji, N. (2003)
Mammalian BarH1 confers commissural neuron identity on dorsal cells in the spinal cord.
Journal of Neuroscience, **23**, 1987 - 1991

Saba, R., Johnson, J.E., Saito, T. und Nakatsuji, N. (2005)
Commissural neuron identity is specified by a homeodomain protein, Mbh1, that is directly downstream of Math1.
Development, **132**, 2147 - 2155

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989)
Molecular Cloning. A Laboratory manual.
2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. und Nakanishi, S. (1992)
Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split .
Genes and Development, **6**, 2620 - 2634

Shimeld, S.M., McKay, I.J. und Sharpe, P.T. (1996)
The murine homeobox gene Msx-3 shows highly restricted expression in the developing neural tube.
Mechanisms of Development, **55**, 201 - 210

Schmidt, R.F. (Hrsg.) und Birbaumer, N. (2006).
Neuro- und Sinnesphysiologie. 5., neu bearbeitete Auflage.
Springer Verlag, Heidelberg.

Schoenwolf, G.C. und Alvarez, I.S. (1989)
Roles of neuroepithelial cell rearrangements and division in shaping of the avian neural plate.
Development, **106**, 427 - 439

- Schoenwolf, G.C.** (1991)
Cell movements driving neurulation in avian embryos.
Development 2, [Suppl.], 157 – 168
- Schumacher, J., Randels, J. und Riesner, D.** (1983)
A two-dimensional electrophoretic technique of the detection of circular viroids and virusoids.
Anal. Biochem., **135**, 288 - 295
- Sekar, R.B. und Periasamy, A.** (2003)
Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations.
Journal of Cell Biology, **160**, 629 - 633
- Shi, Y. und Berg, J.M.** (1995)
Specific DNA-RNA hybrid binding by zinc finger proteins.
Science, **268**, 282 - 284
- Smith, D.B. und Concoran, L.M.** (1990)
John Wiley & Sons, New York
Current protocols in molecular biology, 16.7.1 - 16.7.8
- Smith, S.T. und Jaynes, J.B.** (1996)
A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, NK1-, NK2-, and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo.
Development, **122**, 3141 - 3150
- Stern, C.D.** (2005)
The chick. A great model system becomes even greater.
Developmental Cell, **8**, 9 - 17
- Stone, D. und Rosenthal, A.** (2000)
Achieving neuronal patterning by repression.
Nature Neuroscience, **3**, 967 - 985
- Sun, L., Liu, A. und Georgopoulos, K.** (1996)
Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development.
EMBO, **15**, 5358 - 5369
- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G. und Greenberg M.E.** (2001)
Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms.
Cell, **104**, 365 - 376
- Suzuki, A., Ueno, N. und Hemmati-Brivanlou, A.** (1997)
Xenopus Msx1 mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4.
Development, **124**, 3037 - 3044
- Tanabe, Y. und Jessell, T.M.** (1996)
Diversity and pattern in the developing spinal cord.
Science, **274**, 1115 - 1123

- Tanabe, Y., William, C. und Jessell, T.M.** (1998)
Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein.
Cell, **95**, 67 - 80
- Timmer, J.R., Wang, C. und Niswander, L.** (2002)
BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors.
Development, **129**, 2459 - 2472
- Thews, G (Hrsg.), Mutschler, E. und Vauperl, E.** (1999)
Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5., überarbeitete Auflage.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Trepel, M. (Hrsg.)** (2004)
Neuroanatomie Struktur und Funktion. 3. neu bearbeitete Auflage
Urban und Fischer Verlag, München
- Tsai, R.Y. und Reed, R.R.** (1998)
Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Raoz.
Molecular Cell Biology, **18**, 6447 – 6456
- Vetter, M. und Harris, W.** (2003)
Neural development: bHLH genes.
Encyclopedia of life science, **9**, 1839 - 1852
- Vogelstein, B. und Gillespie, D.** (1979)
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc Natl Acad Sci USA, **76**, 615 - 619
- Wagner, S. und Green, M.R.** (1994)
DNA-binding domains: targets for viral and cellular regulators.
Current Opinion in Cell Biology., **6**, 410 - 414
- Wang, W., Chen, X., Xu, H. und Lufkin, T.** (1996)
Msx3: a novel murine homologue of the Drosophila *msh* homeobox gene restricted to the dorsal embryonic central nervous system.
Genes and Development, **5**, 395 – 399
- Wang, C., Bian, W., Xia, C., Zhang, T. Guillemot, F. und Jing, N.** (2006)
Visualization of bHLH transcription factors in living mammalian cell nuclei and developing chicken neural tube by FRET.
Cell Research, **16**, 585 - 598
- Wilt, F.H. und Hake, S.** (2004)
Principles of developmental biology. 1st Edition
Norton, New York
- Wine-Lee, L., Ahn, J.K., Richardson, R.D., Mishina, Y., Lyons, K.M. und Crenshaw, E.B.** (2004)
Signaling through BMP type 1 receptor is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal chord.
Development, **131**, 5393 - 5403

Wolpert, L. (2004)

Much more from the chicken's egg than breakfast – a wonderful model system.
Mechanisms of Development, **121**, 1015 - 1017

Wolpert, L. (Hrsg.), Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E. und Smith, J. (2007)

Principles of development.
Oxford University Press, Third Edition

Xia, Z. und Liu, Y. (2001)

Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes.
Biophysical Journal, **81**, 2395 - 2402

Yang, D., Buchholz, F., Huang, Z., Goga, A., Chen, C.Y., Brodsky, F.M. und Bishop, J.M. (2002)

Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNaseIII mediate effective RNA interference in mammalian cells.
Proc Natl Acad Sci USA, **99**, 9942 - 9947

Yang, M., May, W.S. und Ito, T. (1999)

JAZ requires the double-stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization.
Journal of Biological Biochemistry, **274**, 27399 - 27406

Yu, J.T., DeRuiter, S.L. und Turner, D.L. (2002)

RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells.
Proc Natl Acad Sci USA, **99**, 6047 - 6052

Zechner, D. Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw III, E.B., Birchmeier, W. und Birchmeier, C. (2003)

Beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system.
Developmental Biology, **258**, 406 - 418

Zechner, D., Müller, T., Wende, H., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw III, E.B., Treier, M., Birchmeier, W. und Birchmeier, C. (2007)

Bmp and Wnt/ β -catenin signals control expression of the transcription factor Olig3 and the specification of spinal cord neurons.
Developmental Biology, **303**, 181 - 190

Zimmermann, L.B., De Jesus-Escobar, J.M. und Harland, R.M. (1996)

The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.
Development, **131**, 5393 - 5403

7.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther danke ich für die offizielle Vertretung meiner Dissertation und die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seinem Institut anfertigen zu können.

Herrn Dr. Thomas Theil danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit.

7.7 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Charakterisierung der Funktion des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Cst während der Musterbildung im dorsalen Neuralrohr" selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet sowie Zitate gekennzeichnet habe. Die vorgelegte Dissertation wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, Mai 2008