

Molekulare Kontrolle der Entwicklung des parasymphatischen Ciliarganglions

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Dipl. Biol. Frank Müller
aus Stolzenau

Frankfurt am Main, 10/2004

D F 1

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Hermann Rohrer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:
Gutachter:

Prof. Dr. H. D. Osiewacz
Prof. Dr. H. Zimmermann
Prof. Dr. H. Rohrer

Datum der Disputation:

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht oder sind in Vorbereitung:

Müller F., Rohrer H. (2002): Molecular control of ciliary neuron development: BMPs and downstream transcriptional control in the parasympathetic lineage. *Development* 129, 5707-5717

Tsarovina K., Pattyn A., Stubbusch J., **Müller F.**, van der Wees J., Schneider C., Brunet J.-F., Rohrer H. (2004): Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development* 131, 4775-4786

Müller F., Lewis M., Henion P., Rohrer H. (in Vorbereitung): Genetic evidence for an essential role of dHand in noradrenergic sympathetic differentiation

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
c	Huhn (Chicken)
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches AMP
Cash	Chicken achaete - scute homologue
CHT1	hochaffiner Cholintransporter 1
cDNA	komplementäre DNA
CEF	chicken embryonic fibroblast
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHO	<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary Zelllinie
CG	Ciliarganglion
D	Dalton
dA	dorsale Aorta
DBH	Dopamin-beta-Hydroxylase
DF1	Huhn Fibroblasten Zelllinie DF1
dHand/Hand2	<u>d</u> eciduum, <u>H</u> earth, <u>A</u> utonomic Nervous System and <u>N</u> eural Crest <u>D</u> erivatives
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eHand/Hand1	<u>e</u> xtraembryonic membranes, <u>H</u> earth, <u>A</u> utonomic Nervous System and <u>N</u> eural Crest <u>D</u> erivatives
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm/Erdbeschleunigungskonstante
HH	Hamburger/Hamilton
kb	Kilo Basenpaare
kD	Kilo Dalton
Mash	Mammalian achaete - scute homologue
NBT	Nitroblauaxolium
NT	Notochord
NF	Neurofilament
NR	Neuralrohr
PCR	Polymerase Chain Reaktion, Polymerase-Kettenreaktion
Phox2a/b	paired like homeodomain containing protein 2a/b
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PNS	Peripheres Nervensystem

RCAS BP	<u>R</u> eplication- <u>c</u> ompetent, <u>A</u> LV LTR (Avian Leucosis virus-Long terminal repeat), <u>S</u> plice acceptor, <u>B</u> ryan High Titer <u>P</u> olymerase)
RT	Rathkes Tasche oder reverse Transkriptase
SCG10	superior cervical ganglion clone 10
SG	sympathisches Ganglion
St.	Stadium
TH	Tyrosinhydroxylase
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
VACHT	vesikulärer Acetylcholinrezeptor
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z	Zebrafisch
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	8
1.1	Das autonome Nervensystem.....	8
1.2	Wanderungswege der Neuralleistenzellen.....	9
1.2.1	Wanderung der sympathischen Vorläuferzellen.....	9
1.2.2	Wanderung der parasympathischen Vorläuferzellen.....	11
1.3	Neurotransmitter im autonomen Nervensystem.....	12
1.3.1	Catecholaminerge Neuronen im sympathischen Nervensystem.....	12
1.3.2	Cholinerge Neuronen im parasympathischen Nervensystem.....	13
1.4	Entwicklungspotential von Neuralleistenzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	14
1.5	BMPs als Signale in der sympathischen Differenzierung.....	16
1.6	BMP-induzierte Transkriptionsfaktoren in der sympathischen Entwicklung.....	18
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Herstellernachweise.....	26
2.1.2	Lösungen.....	27
2.1.3	Medien.....	30
2.1.4	Immunologische Reagenzien.....	31
2.1.5	DNA-Konstrukte.....	31
2.1.6	Oligonukleotide.....	32
2.1.7	Organismen.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Zellkultur.....	33
2.2.2	<i>In vivo</i> -Experimente.....	34
2.2.3	Antikörperfärbung.....	36
2.2.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	37
2.2.5	Planimetrische Analyse von <i>in situ</i> -Hybridisierungssignalen.....	42
2.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	42
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Expression pan-neuronaler und subtypspezifischer Gene im Huhn-Ciliarganglion.....	46
3.2	BMPs sind in der Umgebung der entstehenden Ciliarganglien exprimiert.....	49
3.3	BMPs sind notwendig für die Differenzierung des Ciliarganglions.....	50
3.4	BMP4-Überexpression induziert ektopische cholinerge Neuronen.....	53
3.5	Transiente Coexpression von noradrenergen und cholinergen Markergenen im parasympathischen Ciliarganglion.....	55
3.6	Analyse des oberen Cervikalganglions in der Zebrafisch- <i>dHand</i> -Mutante "Hands off"/ <i>han</i> ^{s6}	57
3.7	Die Expression von <i>dHand</i> erhöht die Anzahl noradrenerger Zellen im Ciliarganglion.....	62
3.8	BMP4 induziert <i>dHand</i> im cranialen Ciliarganglion.....	63
4	Diskussion	65
4.1	Expression von Kontroll- und Markergenen im parasympathischen Ciliarganglion.....	65
4.2	Die Rolle von BMPs in der Entwicklung der parasympathischen Ciliarganglien.....	66

4.2.1	Die Differenzierung der Ciliarvorläuferzellen ist BMP-abhängig.....	66
4.2.2	BMPs induzieren die Entwicklung des Ciliarganglienphänotyps.....	68
4.3	Unterschiedliche Kontrolle der Expression noradrenerger Gene in Ciliarganglien und sympathischen Ganglien	69
4.3.1	Die Rolle von <i>Cash1</i> und <i>Phox2a/b</i>	69
4.3.2	Die Rolle von <i>dHand</i> in der noradrenergen Genexpression	70
	Die Expression noradrenerger Gene in sympathischen Neuronen ist <i>dHand</i> - abhängig - Analyse der "Hands off"/ <i>han^{sf}</i> -Mutante.....	70
	<i>dHand</i> reicht aus, die Zahl noradrenerger Neuronen im Ciliarganglion zu erhöhen.....	71
4.3.3	Entstehung unterschiedlicher neuronaler Subtypen im autonomen Nervensystem: extrinsische Faktoren und intrinsische Signaltransduktion.....	72
	Die ektopische Expression von <i>BMP4</i> induziert zusätzliche Ciliarneuronen, ohne den relativen Anteil noradrenerger Zellen zu erhöhen.....	72
	Wirkungsmechanismen von <i>dHand</i> in der Kontrolle noradrenerger Differenzierung.....	74
	Präspezifizierung von cranialen Ciliarvorläuferzellen und sympathischen Vorläuferzellen aus dem Rumpf ?	75
4.3.4	Regulation noradrenerger Gene im Ciliarganglion in späten Entwicklungsphasen	77
4.4	Andere parasympathische Ganglien - Expression von <i>dHand</i> und transiente noradrenerge Expression.....	78
4.5	Cholinerge Differenzierung autonomer Neuronen.....	78
4.6	Ausblick.....	79
5	Zusammenfassung.....	81
6	Literatur	83

1 Einleitung

Die Frage, wie aus einer einzigen befruchteten Eizelle ein vielzelliger Organismus mit völlig verschiedenen Zelltypen wie z.B. Blutzellen, Endothelzellen, Knochenzellen oder Nervenzellen entsteht, ist eine der spannendsten Fragen der Entwicklungsbiologie. In Zellen mit identischer genetischer Grundausstattung müssen je nach Zelltyp gezielt Teile der zur Verfügung stehenden Gene exprimiert werden, um schließlich die Vielzahl unterschiedlicher Zellen mit unterschiedlichem Proteom zu generieren. Zellen und Gewebe kommunizieren untereinander mit Hilfe von Signalmolekülen, deren Signale letztlich zur Regulation von Transkriptionsfaktoren und damit zur Steuerung der Genexpression führen.

Nervensysteme stellen dabei aufgrund ihrer Komplexität und ihrer Bedeutung ein besonders interessantes Forschungsgebiet dar. Nervensysteme sind hoch komplexe Ansammlungen unterschiedlicher Zellen, die funktionell miteinander verknüpft sind und über eine Vielzahl von Neurotransmittern miteinander kommunizieren. Die verschiedenen Zelltypen werden dabei aus multipotenten Vorläuferzellen gebildet. Die Frage, welche Signale und Transkriptionsfaktoren daran beteiligt sind, einen speziellen Typ von Nervenzelle zu bilden, läßt sich gut am Beispiel einfacher Teilsysteme beantworten. Ein einfaches Teilsystem, an dem sich die Bildung von Neurotransmitterphänotypen studieren läßt, stellt das autonome Nervensystem dar.

1.1 Das autonome Nervensystem

Das autonome Nervensystem entsteht aus Zellen der Neuralleiste, einer Struktur, die nach der Fusion der Neuralplatte zum Neuralrohr entsteht und deren Zellen von diesem delaminieren. Das autonome Nervensystem enthält die vorwiegend catecholaminergen Zellen der sympathischen Ganglien, die vorwiegend cholinergen Zellen der parasympathischen Ganglien sowie die Zellen des enterischen Nervensystems, die eine Vielzahl verschiedener Neurotransmitter verwenden. Das autonome Nervensystem stellt die motorische Innervation visceraler Zielzellen, wie z. B. der glatten Muskulatur der Blutgefäße.

Das sympathische autonome Nervensystem enthält präganglionäre Neuronen im Neuralrohr, deren Fasern zu postganglionären Neuronen projizieren, die in den paravertebralen und prävertebralen sympathischen Ganglien liegen.

Das parasympathische Nervensystem erhält die präganglionäre Innervation aus dem ZNS durch die cranialen Nerven III, VII, IX und X sowie die sacralen Nerven. Die präganglionären Fasern sind mit Ganglien verbunden, die, im Gegensatz zu den sympathischen Ganglien, nahe an oder in den Zielorganen liegen.

Die Neuronen des enterischen Nervensystems sind als Auerbach-Plexus (Plexus myentericus) in der Darmwand und als Meissner-Plexus (Plexus submucosus) in der Submucosa des Magen-Darm-Traktes verteilt (Le Douarin und Kalcheim, 1999).

1.2 Wanderungswege der Neuralleistenzellen

1.2.1 Wanderung der sympathischen Vorläuferzellen

Der Ursprung der verschiedenen Teile des autonomen Nervensystems konnte verschiedenen Abschnitten der Neuralleiste zugeordnet werden. Le Douarin und Teillet führten wesentliche Studien im Wachtel-Huhn-Chimären-System durch. Isotope und isochrone Transplantationsexperimente entlang der gesamten Achse des Embryos gaben über den Ursprung der einzelnen Bestandteile des autonomen Nervensystems Aufschluß. Im Huhn entsteht das sympathische Nervensystem aus Neuralleistenzellen, die sich caudal des fünften Somiten befinden. Aus den Zellen zwischen dem fünften und dem zehnten Somiten entstehen die oberen Cervikalganglien (Superior cervical ganglion, SCG). Zellen aus diesem Bereich tragen ebenfalls zum rostralsten Paar der sympathischen Ganglien bei (Le Douarin und Teillet, 1973), während der größte Teil der sympathischen Ganglienketten aus Neuralleistenzellen caudal des sechsten Somiten entsteht. Die Neuralleiste der Somiten 18-24 bildet zudem die chromaffinen Zellen der Nebenniere. Innerhalb der verschiedenen Spezies besteht eine hohe Ähnlichkeit in den Beiträgen der Neuralleiste zur Entstehung der sympathischen Ganglien. In der Ratte entstehen die Neuronen des SCG aus Neuralleistenzellen aus dem Bereich der ersten Somiten, zusätzlich gibt es Beiträge aus der thorakalen Neuralleiste (Rubin, 1985). Durbec *et al.* (1996b) zeigten in der Maus anhand von Injektionen mit dem Farbstoff DiI, daß die SCG von Neuralleistenzellen aus dem Bereich der Somiten eins bis fünf gebildet werden.

Die Neuralleistenzellen des Rumpfs wandern entlang zweier Hauptwanderungswege. Der ventrale Pfad verläuft entlang von Neuralrohr und Somiten. Die Zellen wandern durch die rostrale Hälfte des Somiten und bilden die primären sympathischen Ganglien, die

Hinterwurzelganglien (Dorsal root ganglia, DRG) und Schwannsche Zellen (Teillet *et al.*, 1987; Debby-Brafman *et al.*, 1999).

Der laterale Pfad verläuft zwischen Somiten und Ektoderm. Zellen, die auf dem lateralen Pfad wandern, bilden z.B. die Melanozyten. Bei Vögeln beginnt die Wanderung auf dem ventralen Pfad einen Tag vor der Wanderung auf dem lateralen Pfad (Erickson *et al.*, 1992).

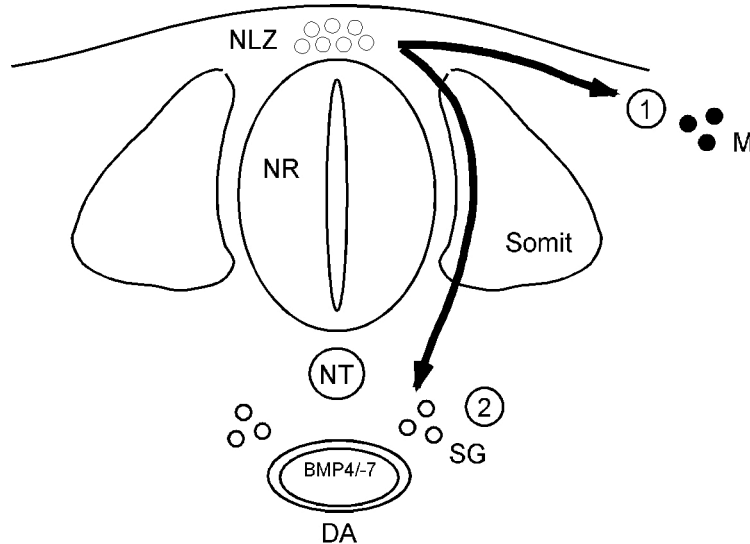


Abb. 1.1: Wanderungswege der Neuralleistenzellen im Rumpf.

Die Neuralleistenzellen wandern auf einem (dorso)lateralen (1) und einem ventralen (2) Wanderungsweg in ihre Zielgebiete. Zellen auf dem lateralen Weg differenzieren z.B. zu Melanozyten. Die Zellen auf dem ventralen Weg erreichen die dorsale Aorta und bilden dort u. a. neuronale und nicht-neuronale Zellen der sympathischen Ganglien. DA: dorsale Aorta; M: Melanozyten; NLZ: Neuralleistenzellen in der Neuralleiste; NR: Neuralrohr; NT: Notochord; SG: primäre sympathische Ganglien.

Die Wanderungswege der Neuralleistenzellen sind zwischen den verschiedenen Spezies sehr konserviert, wie durch Färbungen mit dem Oberflächenmarker HNK-1 in Hühnchen und Ratten gezeigt werden konnte (Erickson *et al.*, 1989). Anhand von Färbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil konnte gezeigt werden, daß die Migration der Neuralleistenzellen in Mausembryonen am Embryonaltag 8,5 beginnt. Die erste Welle auf dem ventralen Wanderungsweg bildet hier die sympathischen Ganglien, die zweite die Hinterwurzelganglien (Serbedzija *et al.* 1989; Serbedzija *et al.*, 1990).

Im Zebrafisch findet die Wanderung der Neuralleistenzellen ebenfalls auf zwei Wanderungswegen statt, einem dorsoventralen zwischen dem Neuralrohr und den Somiten und einem lateralen unterhalb des dorsalen Ektoderms (Raible *et al.*, 1992; zusammengefaßt bei Eisen und Weston, 1993).

1.2.2 Wanderung der parasympathischen Vorläuferzellen

Die parasympathischen Ganglien entstehen aus den cranialen und sacralen Abschnitten der Neuralleiste. Im Rumpf befinden sich u.a. das parasympathische Remak-Ganglion und parasympathische Ganglien im Herzen.

Als craniale parasympathische Ganglien sind zu nennen das Ciliarganglion, das otische Ganglion, das submandibulare Ganglion, das linguale Ganglion, das ethmoidale Ganglion und das Ganglion Sphenopalatinum. Das Ciliarganglion liegt caudal und ventral des optischen Nervs und bildet ein morphologisch klar abgegrenztes Ganglion. Aufgrund des einfachen experimentellen Zugangs, der Morphologie und seiner Größe gehört das Ciliarganglion des Huhns zu den am besten untersuchten parasympathischen Ganglien. Die Neuronen des Ciliarganglions bestehen aus zwei Populationen. Die Ciliarneuronen innervieren die gestreifte Muskulatur der Iris, die kleineren Choroidneuronen innervieren die glatte Gefäßmuskulatur der Choroidea (Marwitt *et al.*, 1971).

Die Vorläuferzellen des Ciliarganglions entstammen der cranialen Neuralleiste des Mesencephalons an der Grenze zum Metencephalon (Hammond und Yntema, 1958; Narayanan und Narayanan, 1978b). Sie wandern zunächst lateral und dann rostral entlang des okulomotorischen Nervs zu ihrer Position im retroorbitalen Mesenchym in der Nähe von Rathkes Tasche (Abb. 1.2), einer Einstülpung des Ektoderms im oberen Gaumendach, aus der sich später gemeinsam mit Teilen aus der Bodenplatte des Mittelhirns die Hypophyse bilden wird (Jacobson *et al.*, 1979; Bellairs und Osmond, 1998).

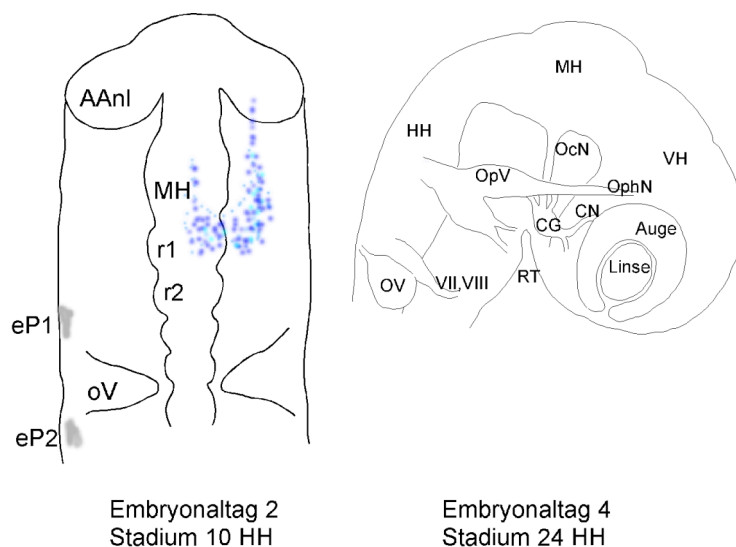


Abb. 1.2: Wanderungsweg der Ciliarganglienvorläuferzellen aus der cranialen Neuralleiste
Neuralleistenzellen (blau) aus dem Bereich der Mittelhirn-/Hinterhirngrenze wandern ab Stadium 10/11 HH zunächst lateral, dann rostral entlang des okulomotorischen Nervs in das craniale Mesenchym in die Nähe des Sehnervs. AAAnl: Augenanlage, eP1/2: ektodermale Plakode, CG: Ciliarganglion; CN: Ciliarnerv; HH: Hinterhirn; MH: Mittelhirn, OcN: Okulomotorischer Nerv; OpV: Ophthalmischer Ast des Trigeminalganglions; OphN:

Ophthalmischer Nerv; oV: otisches Vesikel, r1/r2: Rhombomer 1/2; RT: Rathkes Tasche; VH: Vorderhirn; VII, VIII: 7. und 8. Hirnnerv. Nach Lee *et al.*, 2003

Das Ciliarganglion des Huhns enthält am Embryonaltag 8 ca. 8000 Neuronen. Nachdem die Neuronen ihr Zielgebiet kontaktiert haben, wird diese Zahl auf 3200 Neuronen im adulten Huhn reduziert (Landmesser & Pilar, 1974). Diese Zahl kann in anderen Spezies deutlich differieren, so enthält das Ciliarganglion in der adulten Ratte nur etwa 150 Zellen (Landis *et al.*, 1987).

1.3 Neurotransmitter im autonomen Nervensystem

Sympathikus und Parasympathikus bilden ein antagonistisches System. Das sympathische Nervensystem liefert aktivierende Signale, während das parasympathische Nervensystem inhibierende Signale gibt. Dazu setzen die beiden Teilsysteme des autonomen Nervensystems unterschiedliche Neurotransmitter ein.

1.3.1 Catecholaminerge Neuronen im sympathischen Nervensystem

Die überwiegende Mehrzahl der Neuronen in den sympathischen Ganglien verwendet Catecholamine als Neurotransmitter. Eine Ausnahme bilden die Neuronen, welche die Schweißdrüsen in Säugern innervieren. Nach Zielgebietskontakt findet in ihnen ein Wechsel des Neurotransmitterphänotyps statt, so daß sie den cholinergen Neurotransmitter Acetylcholin und das coexprimierte Neuropeptid Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) ausschütten (zusammengefaßt bei Ernsberger und Rohrer, 1999). Sie werden als cholinerge sympathische Neuronen bezeichnet.

Die catecholaminergen Neuronen produzieren die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin oder Adrenalin. Die Aminosäure Tyrosin wird in einer mehrstufigen enzymatischen Reaktion in die Neurotransmitter L-Dopa, Dopamin, Noradrenalin und schließlich Adrenalin umgewandelt (Abb. 1.3). Es gibt zwei Schritte in der Reaktionskette, welche die Geschwindigkeit bestimmen. Die an diesen Reaktionen beteiligten Enzyme können als Phänotypmarker für catecholaminerge bzw. noradrenerge Zellen eingesetzt werden. Die Tyrosinhydroxylase (TH, Tyrosine hydroxylase) setzt die Aminosäure Tyrosin zu L-Dopa um und dient als Marker für catecholaminerge Zellen. Die Dopamin-beta-Hydroxylase wandelt schließlich Dopamin in Noradrenalin um und dient als Marker für noradrenerge Zellen. In noradrenergen Zellen werden die beiden Enzyme TH und DBH gemeinsam exprimiert (zusammengefaßt bei Goridis und Rohrer, 2002).

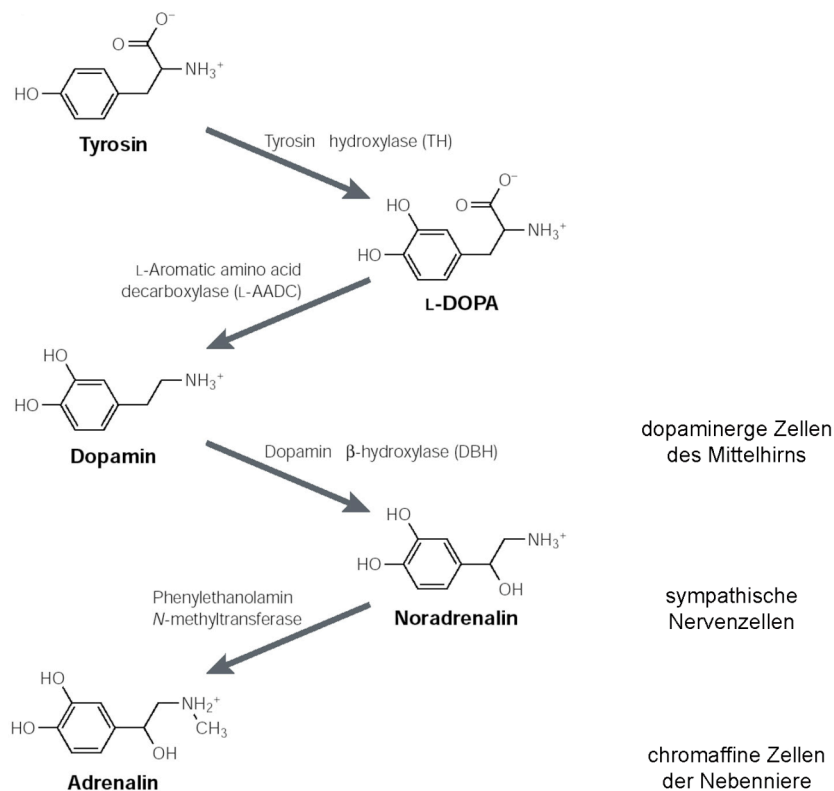


Abb. 1.3: Syntheseweg catecholaminergen Neurotransmitter
Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin-beta-Hydroxylase (DBH) bestimmt. Sie können als Markergene für catecholaminerge bzw. noradrenerge Zellen benutzt werden. (Abb. nach Goridis und Rohrer, 2002)

1.3.2 Cholinerge Neuronen im parasympathischen Nervensystem

Die parasympathischen Ciliarneuronen sind funktionell cholinerg. Sie werden von präganglionären Neuronen aus dem Edinger-Westphal-Nucleus im Mittelhirn (Klooster *et al.*, 1993; Reiner *et al.*, 1991) cholinerg innerviert, und die Transmission zu den Zielorganen im Auge ist cholinerg (Landmesser & Pilar, 1972).

Der Neurotransmitter Acetylcholin wird aus Cholin und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert. Acetylcholin wird durch den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VACHT) in synaptische Vesikel transportiert. Die Expression der beiden Gene wird dabei von einem sogenannten "cholinergen Genlocus" aus gesteuert. Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter repräsentiert ein Exon innerhalb des Cholinacetyltransferase-Gens (Mallet *et al.*, 1998). Beide Gene werden in cholinergen Zellen des Nervensystems coexprimiert und dienen als Marker für cholinerge Neuronen (Erickson *et al.*, 1994).

Wird Acetylcholin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, wird es durch die Acetylcholinesterase (AChE) in Cholin und Acetat hydrolysiert. Das Cholin wird dann durch einen Na^+ -abhängigen, Hemicholinium-3-sensitiven, hochaffinen Transporter, den

Cholintransporter 1 (CHT1), wieder in die präsynaptische Endigung aufgenommen und kann erneut in Acetylcholin umgewandelt werden. Die Aufnahme von Cholin ist der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt in der Synthese von Acetylcholin (Okuda *et al.* 2000; Okuda und Haga 2003).

1.4 Entwicklungspotential von Neuralleistenzellen *in vitro* und *in vivo*

Die Neuralleiste bildet in sich keine völlig homogene Zellpopulation. Durch monoklonale Antikörper können Teilpopulationen erkannt werden (z.B. Marusich *et al.*, 1986; Barald 1988a; Barald 1988b; Barald 1989; Marusich und Weston, 1992). Aus unterschiedlichen Bereichen der Neuralleiste entstehen eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, einschließlich der verschiedenen Neuronen der sensorischen, autonomen und enterischen Ganglien (Le Douarin und Kalcheim, 1999). Die Vorläuferzellen besitzen eine hohe Pluripotenz hinsichtlich ihrer Entwicklungsmöglichkeiten, zugleich enthält die Neuralleiste aber auch Zellen mit eingeschränktem Entwicklungspotential. In heterotopen Transplantationsexperimenten in verschiedene axiale Levels wurde gezeigt, daß die Neuralleistenzellpopulationen in der Lage sind, verschiedene Derivate des peripheren Nervensystems zu bilden. Werden Neuralrohre mit prämitotischer Neuralleiste aus der Wachtel in Hühnerembryonen implantiert, so entwickeln sich die auswandernden Zellen weitgehend zu Zellen des neuen axialen Levels, anstatt entweder ihren angestammten Phänotyp zu entwickeln oder zu Orten zu wandern, zu denen sie in der Wildtypsituation ihrer Herkunft gemäß wandern würden (Le Douarin und Teillet, 1974; Le Douarin *et al.*, 1975; Le Douarin, 1978; Noden 1975; Noden 1978a; Noden 1978b). Signale in der Umgebung der wandernden Neuralleistenzellen oder im Zielgebiet üben also wesentlichen Einfluß auf den späteren Phänotyp der differenzierenden Zellen aus.

Das Potential der Neuralleistenzellen, andere als ihre angestammten Entwicklungsschicksale zu erfüllen, ist jedoch nicht für alle Zellen identisch. So sind Neuralleistenzellen aus dem Rumpf im Gegensatz zu cranialen Neuralleistenzellen z.B. nicht in der Lage, Knorpelzellen zu bilden (Abzhanov *et al.*, 2003) oder zu mesenchymalen Herzzellen zu differenzieren, auch wenn sie an die korrekte anterioposteriore Position transplantiert werden (Kirby, 1989). Diese Unterschiede im Entwicklungspotential zwischen cranialer Neuralleiste und Rumpf-Neuralleiste werden in der unterschiedlichen Expression von Hox-Genen und in der nur cranialen Expression von Id2 wiedergespiegelt (Martinsen und Bronner-Fraser, 1998; Trainor und Krumlauf, 2001). Für die Hox-Gene ist eine Funktion in der Spezifizierung von

Neuralleistenzellen gezeigt worden (Rijli *et al.*, 1993; Grammatopoulos *et al.*, 2000; Abzhanov *et al.*, 2003). So führt die ektopische Expression des Rumpf-spezifischen Gens *Hoxa10* in der cranialen Neuralleiste zur Induktion von Neuralleistenzellen mit Eigenschaften, die für die Neuralleistenzellen des Rumpfs typisch sind (Abzhanov *et al.*, 2003). Durch Transplantation von Rhombomeren wurde gezeigt, daß die Identität der Neuralleistenzellen im Hinterhirn durch den Hox-Gen-Code eines bestimmten Rhombomers bestimmt ist, wobei die Expression nur in Zellgruppen, nicht aber in Einzelzellen, aufrecht erhalten wird (Trainor und Krumlauf, 2000).

Neben rostrocaudalen Beschränkungen unterschiedlicher Neuralleistenzellpopulationen gibt es auch Unterschiede im Entwicklungspotential von Populationen, welche die Migration zu unterschiedlichen Zeitpunkten beginnen. Die ersten vom Neuralrohr delaminierenden Zellen bilden die primären sympathischen Ganglien, während die später auswandernden Zellen die sensorischen Hinterwurzelganglien bilden und die Melanozyten von den zuletzt auf dem dorso-lateralen Weg wandernden Zellen gebildet werden (Serbedzija *et al.*, 1989; Raible und Eisen, 1996). Werden die spät migrierenden Zellen in junge Wirtsembryonen verpflanzt, so haben sie die Fähigkeit verloren, noradrenerge Neuronen zu bilden. Dieses Ergebnis führte zu dem Schluß, daß das Entwicklungspotential von wandernden Neuralleistenzellen mit zunehmendem Alter eingeschränkt wird, obwohl die alternative Möglichkeit sich ändernder Signale aus der Umgebung nicht ausgeschlossen wurde (Artinger und Bronner-Fraser, 1992; Raible und Eisen, 1996).

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten Unterschiede in der Pluripotenz von Zellpopulationen, die in der antero-posterioren Position begründet sind oder die sich während der Entwicklung der Zellen einstellen. Aus diesen Untersuchungen ist jedoch kein Schluß auf das Entwicklungspotential einzelner Neuralleistenzellen möglich, da die unterschiedlichen Entwicklungspotentiale beispielsweise in den Transplantationsexperimenten auf unterschiedliche Selektion der Vorläuferzellen zurückgehen könnten. Das Entwicklungsschicksal und das Entwicklungspotential einzelner Zellen wurde in klonalen Zellkulturexperimenten und durch Verfolgung einzelner Zellen *in vitro* und *in vivo* mittels Markerfarbstoffen näher untersucht. Hierbei muß jedoch beachtet werden, daß sich die Eigenschaften der Zellen in Kultur ändern können. In Einzelzellkultur wurde gezeigt, daß die große Mehrheit der Neuralleistenzellen pluripotent ist, und durch Subklonierung einzelner Zellen aus den ursprünglich gebildeten Klonen wurde gezeigt, daß zumindest ein Teil der Zellen in der Lage ist, sich selbst zu erneuern (Sieber-Blum und Cohen, 1980; Baroffio *et al.*, 1988; Stemple und Anderson, 1992). Trotz Pluripotenz vieler Zellen wurde ein beträchtlicher

Teil von Zellen gefunden, die nur einen einzigen Zelltyp generieren (Baroffio *et al.*, 1988; Ito und Sieber-Blum, 1991). Etwas näher an der *in vivo* Situation sind Massenkulturen. In Experimenten, in denen einzelne Zellen in Kultur markiert wurden, konnte gezeigt werden, daß zunächst pluripotente Zellen vorhanden sind, daß aber ihre Zahl in Kultur rapide abnimmt. Nahezu die Hälfte der Zellen generierte nur einen Zelltyp (Henion und Weston, 1997). *In vivo* wurde das Schicksal einzelner Neuralleistenzellen durch Injektion eines Markerfarbstoffes oder durch Infektion mit replikationsdefizienten Retroviren verfolgt. Ein Teil der Zellen zeigte Multipotenz, ein Teil der Zellen bildete nur jeweils ein Derivat der Neuralleiste (Bronner-Fraser und Fraser, 1988; Fraser und Bronner-Fraser, 1991; Frank und Sanes, 1991). In Zebrafischen scheint diese Beschränkung auf eine Zelllinie weit stärker zu sein, als in Vögeln oder Säugern. Mehr als 80% der markierten Zellen generierten nur einen Zelltyp (Raible und Eisen, 1994).

Die Bildung von Vorläuferzellen mit eingeschränktem Entwicklungspotential könnte durch zufällige Differenzierung dieser Zellen oder durch die Wirkung positiv oder negativ instruierender Signale auf eine zunächst homogene Population von Zellen erklärt werden. Die erwähnten Resultate lassen auf eine frühe Heterogenität der Neuralleiste schließen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Neuralleiste aus eine Mischung pluripotenter und unterschiedlich stark festgelegter Zellen besteht.

1.5 BMPs als Signale in der sympathischen Differenzierung

Die adrenerge Differenzierung der primären sympathischen Ganglien findet in der Nähe des Notochords und der dorsalen Aorta statt (Stern *et al.*, 1991; Ernsberger *et al.*, 1995; Groves *et al.*, 1995) (Abb. 1.1). Während der Wanderung der Vorläuferzellen entlang von Neuralrohr, Somiten, Bodenplatte und Notochord erfahren diese für die Differenzierung wichtige Signale, wie durch Transplantations- und Zellkulturexperimente gezeigt wurde (Cohen *et al.*, 1972; Norr *et al.*, 1973; Teillet und Le Douarin 1983; Howard und Bronner-Fraser 1985; Howard und Bronner-Fraser 1986). Wird das Notochord und das ventrale Neuralrohr im Huhn entfernt, unterbleibt die Differenzierung adrenerger Zellen (Teillet und Le Douarin 1983; Stern *et al.*, 1991; Groves *et al.*, 1995). Obwohl Neuralleistenzellen nach Entfernung des Notochords und Rotation des Neuralrohrs bis zur dorsalen Aorta wandern, findet keine adrenerge Differenzierung statt (Groves *et al.*, 1995).

In den axialen Strukturen Neuralleiste, Neuralrohr, Notochord und dorsale Aorta sind Signalmoleküle wie Fibroblast Growth Factor (FGF), Wnt, Sonic hedgehog (Shh) und

Mitglieder der Bone morphogenetic protein-Familie (BMP-Familie) zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wiederholt exprimiert und sind für verschiedene Entwicklungsvorgänge essentiell (McMahon und Bradley 1990; Thomas und Capecchi 1990; Liem *et al.*, 1995; Liem *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 1996; Reissmann *et al.*, 1996; Crossley *et al.*, 1996a; Crossley *et al.*, 1996b; Schneider *et al.*, 1999).

Mitglieder der BMP-Familie sind zunächst wichtig für die neurale Induktion (Hemmati-Brivanlou und Melton 1997) und an der Bildung der Neuralleiste und der Dachplatte beteiligt (Liem *et al.*, 1995; Liem *et al.* 1997; La Bonne und Bronner-Fraser 1998; Selleck *et al.*, 1998), bevor sie die Entstehung autonomer Neuronen aus den Neuralleisten induzieren.

Die BMPs sind Mitglieder der Transforming growth factor beta-Superfamilie (TGF β -Superfamilie). Sie sind extrazelluläre Signalmoleküle, die an BMP-Rezeptoren binden. Diese Rezeptoren sind Serin-/Threonin-Kinasen. BMPs binden an Typ II BMP-Rezeptoren, welche dann Typ I BMP-Rezeptoren rekrutieren und phosphorylieren. Die so aktivierten Typ I Rezeptoren phosphorylieren ihrerseits intrazelluläre Signalmoleküle, die sogenannten Rezeptor-aktivierten SMADs 1, 5 oder 8 (R-SMAD1,- 5,-8). Gemeinsam mit einem weiteren SMAD-Protein, SMAD 4, transloziert der SMAD-Komplex schließlich in den Zellkern und kann dort als aktivierender oder hemmender Modulator der Transkription das BMP-Signal vermitteln (zusammengefaßt bei Hogan, 1996; Mehler *et al.*, 1997; Ebendahl *et al.*, 1998; Moustakas *et al.*, 2001).

In der Entwicklung der sympathischen Ganglien und der noradrenergen Entwicklung spielen die BMPs eine wesentliche Rolle. BMP2, -4 und -7 sind in der dorsalen Aorta zu einem Zeitpunkt exprimiert, an dem die Vorläuferzellen der sympathischen Ganglien in der unmittelbaren Nähe zur dorsalen Aorta zu den primären sympathischen Ganglien kondensieren. Erst nachdem sie an der dorsalen Aorta BMPs sehen, beginnen sie zu differenzieren (Stern *et al.*, 1991; Ernsberger *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1996; Reissmann *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1999; Howard 2000). BMPs induzieren die Expression der Transkriptionsfaktoren Mash1, Phox2a und Phox2b und dHand, sowie der terminalen Differenzierungsgene TH, DBH, SCG10 (Superior cervical ganglion clone number 10; Stein *et al.*, 1988) und Neurofilament 160 *in vitro* (Varley *et al.*, 1995; Reissmann *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1996; Varley und Maxwell 1996; Lo *et al.*, 1998) und *in vivo* (Reissmann *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 2000).

Die Untersuchung verschiedener Nullmutanten in Mäusen zeigte die Bedeutung von BMPs für die Embryonalentwicklung (Dudley *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995; Winnier *et al.*, 1995; Zhang und Bradley 1996; Solloway und Robertson, 1999). Redundante Expression und

Funktion von BMPs konnte ebenfalls in mehreren Mutanten gezeigt werden. So zeigen die Mutanten von *BMP5* keine und die von *BMP7* nur schwache Defekte in der Augenentwicklung, während die Augenentwicklung in der Doppelmutante massiv gestört ist (Kingsley *et al.*, 1992; King *et al.*, 1994; Lyons *et al.*, 1995; Dudley und Robertson 1997; Solloway und Robertson 1999). Die frühe Letalität einerseits und die z. T. redundante Funktion von BMPs andererseits verhinderten die Untersuchung vergleichsweise später Prozesse wie der Differenzierung der sympathischen Ganglien. Eine Möglichkeit, diese Prozesse dennoch zu untersuchen, ergab sich durch den Umstand, daß der natürliche Inhibitor Noggin in der Lage ist, BMPs mit hoher Affinität zu binden. Der Komplex aus BMP und Noggin ist dann nicht mehr in der Lage, an die BMP-Rezeptoren zu binden und das BMP-Signal zu vermitteln (Smith und Harland 1992; Zimmerman *et al.*, 1996).

Appliziert man Noggin *in vitro* in Neuralleistenkulturen, so unterbleibt die BMP-induzierte Expression der noradrenergen Marker *TH* und *DBH* sowie der neuronalen Marker *Neurofilament 160* und *SCG10*. *In vivo* in Huhnembryonen appliziert, verhindert Noggin die Differenzierung der sympathischen Vorläuferzellen (Schneider *et al.*, 1999). Die Expression der neurogenen (*Mash1*) und autonomen (*Phox2a*, *Phox2b*) Transkriptionsfaktoren wie die Expression noradrenerger und neuronaler Gene (*TH*, *DBH*, *SCG10*, *Neurofilament 160*) unterbleibt. Die Wanderung der Neuralleistenzellen ist unbeeinflusst, was durch die Anwesenheit *Sox10*-positiver Zellen gezeigt wurde (Schneider *et al.*, 1999).

1.6 BMP-induzierte Transkriptionsfaktoren in der sympathischen Entwicklung

BMPs induzieren in den Vorläuferzellen der sympathischen Ganglien die Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren. Die Expression des proneuralen Gens *Mash1* (*Cash1* im Huhn), der Transkriptionsfaktoren *Phox2a* und *Phox2b*, die durch paired ähnliche Homöodomänen (paired like homeodomain) charakterisiert sind, und des Transkriptionsfaktors *dHand*, der wie *Mash1/Cash1* durch ein Helix-Schleife-Helix-Motiv mit einer basischen DNA-Bindedomäne (basic Helix Loop Helix, bHLH) gekennzeichnet ist, wird durch BMPs induziert oder kann durch Noggin-Applikation verhindert werden (Reissmann *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000). Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren führt ihrerseits zur Differenzierung von sympathischen Vorläuferzellen (Abb. 1.4) (Guillemot *et al.* 1993; Lo *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1999; Hirsch *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1997; Pattyn *et al.*, 1999; Stanke *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000). Für *Phox2b* und *Mash1* wurde in Nullmutanten gezeigt, daß

sie für die noradrenerge bzw. neuronale Differenzierung notwendig sind (Guillemot *et al.*, 1993; Hirsch *et al.*, 1998; Pattyn *et al.*, 1999).

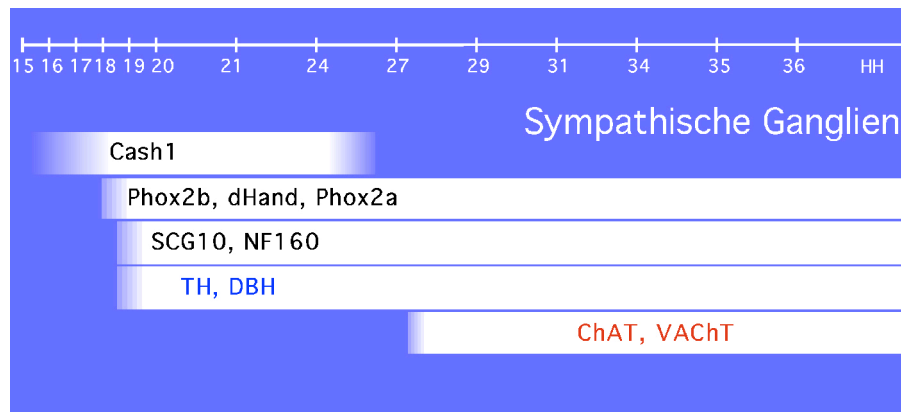


Abb 1.4: Expressionsverlauf von Transkriptionsfaktoren und Markergenen in den sympathischen Ganglien.

Überexpressionsstudien zeigten, daß *Phox2a*, *Phox2b* und *dHand* ausreichend sind, um sympathische Neuronen aus Neuralleistenvorläuferzellen *in vitro* und *in vivo* zu generieren (Stanke *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000). *Phox2a* und *Phox2b* binden an die Homöodomänen-Bindestellen im *DBH*-Promotor (Kim *et al.*, 1998; Zellmer *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2002) und können die Transkription aktivieren. Zusätzlich gibt es *in vitro*-Daten, die eine Interaktion von BMP-Phox2-Signalen mit cAMP, Proteinkinase A oder dem MAPK-Signalweg nahelegen (Lo *et al.*, 1999; Swanson *et al.*, 1997; Swanson *et al.*, 2000; Wu und Howard, 2001). In Zellkulturexperimenten mit Neuralleistenzellen war *Phox2a* zusammen mit cAMP/PKA in der Lage, TH-Expression zu induzieren (Lo *et al.*, 1999). Analysen des *DBH*-Promotors identifizierten eine cAMP response element/activator protein 1 (CRE/AP1) Domäne. Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß der MAPK-Signalweg in der Induktion noradrenerger Gene beteiligt ist (Swanson *et al.*, 1997; Swanson *et al.*, 2000; Wu und Howard, 2001).

Mash1/Cash1

bHLH-Transkriptionsfaktoren regulieren die Bildung der Skelettmuskulatur (Olson und Klein, 1994; Weintraub *et al.*, 1994), die Hämatopoiese (Zhuang *et al.*, 1994) und die Neurogenese (Jan und Jan, 1993; Lee *et al.*, 1995). bHLH-Proteine können an ihren HLH-Domänen dimerisieren. Dabei geraten die beiden basischen Domänen in eine Position, in der sie die DNA an der E-box Konsensus-Sequenz (CANNTG) binden können (Johnson *et al.*, 1992).

Das "mammalian achaete scute homologe 1" (Mash1) ist ein bHLH-Transkriptionsfaktor, der in einer Reihe von Vertebraten kloniert wurde (Johnson *et al.*, 1990; Ferreiro *et al.*, 1993; Guillemot und Joyner, 1993).

Die Expression von Mash1 ist auf das zentrale und periphere Nervensystem beschränkt und ist postnatal nur in neurogenen Zonen zu finden. Mash1 ist im peripheren Nervensystem in den enterischen, parasymphatischen und den sympathischen Vorläuferzellen exprimiert (Lo *et al.*, 1991; Guillemot und Joyner, 1993).

Mash1 ist notwendig für die Entwicklung autonomer Neuronen. Sowohl die Expression des Transkriptionsfaktors *Phox2a* wie auch die Expression des neuronalen Markergens *SCG10* und des subtypespezifischen Markergens *TH* in den sympathischen Ganglien ist im *Mash1*-Knockout betroffen (Hirsch *et al.* 1998). Während die Expression von *Phox2a* im *Mash1*-Knockout fehlt, reicht Mash1 *in vitro* aus, *Phox2a*-Expression zu induzieren (Lo *et al.*, 1998). Die Expression von *Phox2b* ist im *Mash1*-Knockout nicht beeinträchtigt (Hirsch *et al.*, 1998). Neben der Genexpression ist im *Mash1*-Knockout auch die Bildung von Bestandteilen des autonomen Nervensystems betroffen. Während die sympathischen Ganglien zunächst gebildet werden, entstehen die parasymphatischen und enterischen Ganglien nur eingeschränkt (Guillemot *et al.*, 1993; Hirsch *et al.*, 1998). Das parasymphatische Ciliarganglion konnte in keinem der untersuchten Stadien nachgewiesen werden, so daß also die Entwicklung des Ciliarganglions direkt oder indirekt von Mash1abhängig ist (Hirsch *et al.*, 1998).

Phox2a und Phox2b

Die Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren Phox2 (paired like homeobox transcription factor 2) gehören zu der großen Gruppe von Homöodomänen-Genen, die durch eine hochkonservierte DNA-Bindestelle, die an die Homöobox binden kann, gekennzeichnet sind (zusammengefaßt bei Gehring, 1990). In Säugern und Vögeln wurden zwei Paraloge Phox2-Faktoren identifiziert, Phox2a und Phox2b (Pattyn *et al.*, 1997). Bindestellen für Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren enthalten ein ATTA-Motiv (Scott *et al.*, 1989; Laughon *et al.*, 1991), an welches auch die Phox2-Proteine binden können (Kim *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998).

Die Expression von Phox2a und Phox2b ist auf verschiedene Klassen differenzierender Neuronen beschränkt, die gemeinsam die neuronalen Schaltkreise der Eingeweide bilden (zusammengefaßt bei Brunet und Pattyn, 2002). Die Expression von Phox2-Transkriptionsfaktoren ist in den Neuronen der afferenten Nervenbahnen, d. h. in den

cranialen sensorischen Ganglien und deren Zielneuronen im zentralen Nervensystem, sowie in den efferenten Nervenbahnen, d. h. den Neuronen des sympathischen, parasympathischen und enterischen Nervensystems sowie den präganglionären visceralen Motorneuronen zu finden (Brunet und Pattyn, 2002). Der *Phox2b*-Knockout führt zur Agenese dieser Schaltkreise, besonders deutlich zu sehen im parasympathischen und enterischen Nervensystem (Brunet und Pattyn, 2002). Im Detail finden sich Phox2-Proteine im peripheren Nervensystem in allen sich bildenden autonomen (sympathischen, parasympathischen und enterischen) Ganglien (Valarché *et al.*, 1993; Pattyn *et al.*, 1997) und den drei distalen Ganglien des facialis (VII.), hypoglossalen (IX.) und vagalen (X.) Hirnnerven. Im Zentralnervensystem sind alle noradrenergen Zentren, die cranialen Motorkerne, Nucleus solitarius, die Area postrema, die Motoneuronen des Hinterhirns und der Locus coeruleus Phox2-positiv (Valarché *et al.*, 1993; Tiveron *et al.*, 1996; Pattyn *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997; Pattyn *et al.*, 1999; Pattyn *et al.*, 2000). In den sensorischen Ganglien im Rumpf findet sich keine Phox2-Expression (Valarché *et al.*, 1993).

Im okulomotorischen und trochlearen Motorkern, den cranialen sensorischen Ganglien und dem Locus coeruleus wird *Phox2a* vor *Phox2b* exprimiert, in den Motorneuronen im Hinterhirn, den enterischen Neuroblasten und den sympathischen Ganglien *Phox2b* vor *Phox2a*. *Phox2b* und *Phox2a* können sich gegenseitig regulieren (Hong *et al.*, 2001). In der *Phox2a*-Mutante finden sich nur sehr wenige *Phox2b*-positive Zellen in den cranialen sensorischen Ganglien, im III. und IV. Motorkern sowie dem Locus coeruleus fehlt *Phox2b* (Pattyn *et al.*, 1997).

Phox2a und *Phox2b* werden in Zellen exprimiert, die transient oder permanent noradrenerge Gene exprimieren (Grzanna und Coyle 1978; Jonakait *et al.*, 1979; Iacovitti *et al.*, 1985; Teitelman *et al.*, 1985; Landis *et al.*, 1987; Leblanc *et al.*, 1989; Baetge *et al.*, 1990; Kapur *et al.*, 1991; Mercer *et al.*, 1991; Valarché *et al.*, 1993). Die Vermutung, daß Phox2-Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung des noradrenergen Phänotyps involviert sind, wird durch Untersuchungen an *Phox2a*- und *Phox2b*-Nullmutanten unterstützt. Die Expression von *DBH* im Locus coeruleus ist Phox2a-abhängig (Morin *et al.*, 1997; Pattyn *et al.*, 1997). In der *Phox2b*-Mutante bilden sich die autonomen sympathischen, parasympathischen und enterischen Ganglien nur unvollständig und degenerieren in der späteren Embryonalentwicklung. Während in der *Phox2a*-Mutante die Expression von *TH* und *DBH* in den sympathischen Ganglien erhalten ist, fehlt sie in der *Phox2b*-Mutante. Phox2b ist zudem notwendig, um in den Anlagen des enterischen Nervensystems und der

sympathischen Ganglien die Expression von *Mash1* zu erhalten. (Pattyn *et al.* 1999; Pattyn *et al.* 2000).

Während die Untersuchungen an Nullmutanten die Notwendigkeit von *Phox2a* und *Phox2b* für die noradrenerge Differenzierung zeigten, konnte in Überexpressionsexperimenten gezeigt werden, daß *Phox2*-Transkriptionsfaktoren ausreichen, um sympathische Neuronen zu induzieren (Stanke *et al.*, 1999). *Phox2a*-Expression in Neuralleistenkulturen führte zu einem starken Anstieg sympathoadrenerger Zellen. *In vivo*-Überexpression von *Phox2a* oder *Phox2b* führte in den Hinterwurzelganglien und im peripheren Nerv zu ektopischen Zellen mit sympathischem Phänotyp, d. h. zu Zellen, welche die neuronalen Gene *SCG10* und *Neurofilament160*, dazu vorwiegend *TH* und *DBH*, und in geringer Zahl auch die cholinergen Gene *ChAT* und *VACHT* exprimieren (Ernsberger *et al.*, 1997; Stanke *et al.*, 1999). Darüber hinaus zeigte sich auch in Überexpressionsexperimenten, daß sich *Phox2a* und *Phox2b* gegenseitig regulieren und zusammen mit *Mash1* und *dHand* (siehe unten) eher ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren bilden, statt linear nacheinander reguliert zu sein (Pattyn *et al.*, 1997; Stanke *et al.*, 1999; Howard *et al.* 2000). Nach Überexpression von *Phox2a* und *Phox2b* in Hühnerembryonen konnte in den ektopischen Neuronen jeweils die ganze Gruppe von Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Stanke *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000).

dHand

Der bHLH-Transkriptionsfaktor *dHand* (auch *Hand2*, *Hed*, *Thing-2*) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in den sympathischen Ganglien exprimiert ist und in das transkriptionelle Netzwerk der sympathischen Neuroblasten integriert ist (Srivastava *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000). *dHand* und das homologe Protein *eHand* wurden in der Maus und im Huhn kloniert (Srivastava *et al.*, 1995; Cserjesi *et al.*, 1995). *dHand* kodiert für ein 217 Aminosäuren langes Protein. Es ist zwischen den Spezies hochkonserviert, die Ähnlichkeit von Maus-*dHand* und Huhn-*dHand* beträgt 96% (Srivastava *et al.*, 1995). Der Name *dHand* bzw. *eHand* leitet sich vom Expressionsmuster ab. *dHand* ist im Deciduum, Herz, autonomen Nervensystem und in Neuralleistenderivaten exprimiert (deciduum, heart, autonomic nervous system and neural crest derivatives), *eHand*-Expression findet sich in extraembryonalen Membranen, dem Herz, und Neuralleistenderivaten (extraembryonic membranes, heart autonomic nervous system and neural crest derivatives).

Frühe *dHand*-Expression findet sich im Deciduum, im lateralen Mesenchym, welches später in der Herzentwicklung beteiligt ist, in den von Neuralleistenzellen besiedelten

Branchialbögen und in den Extremitätenanlagen. Im autonomen Nervensystem findet man *dHand* in den sympathischen Ganglien und der adrenalen Medulla. In der Maus wird die Expression ab Embryonaltag 16 herunterreguliert. Die Expression von *eHand* unterscheidet sich im Herz von Säugern deutlich von der von *dHand*, indem beide Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten des Herzens exprimiert sind und in der Herausbildung der Asymmetrie des Herzens beteiligt sind (Srivastava *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1997; Overbeek, 1997; Yamagishi *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist *dHand* in der Extremitätenbildung beteiligt und sorgt auch hier für die Herausbildung der Asymmetrie der Extremität (Charité *et al.*, 2000; Yelon *et al.*, 2000).

Experimente im Huhn mit Antisense-Oligonukleotiden und die Analyse von *dHand*-Nullmutanten zeigten ebenfalls die wesentliche Rolle von *dHand* in der Entwicklung des Herzens. Da die Mausembryonen anhand eines Herzphänotypen am Embryonaltag 10.5 sterben, ist die Analyse der sympathischen Ganglien bisher nicht möglich gewesen (Srivastava *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1997).

Da *dHand* in den sympathischen und enterischen Neuronen exprimiert ist, war es von Interesse, die *dHand*-Wirkung im Kontext der sympathischen Neurogenese zu untersuchen. Die Expression von *dHand* startet im Huhn an St. 18 HH, kurz nach *Phox2b* und kurz vor *Phox2a*. Die Expression von *dHand* in den sympathischen Ganglien ist BMP-kontrolliert. Wird die Wirkung von BMP durch Noggin-Applikation blockiert, fehlt *dHand* in den sympathischen Ganglien. Nach Überexpression von BMP4 ist *dHand* in ektopischen Zellen im Brachialnerv exprimiert. In Neuralleistenkulturen kann durch BMP-Gabe die Differenzierung catecholaminerger Neuronen induziert werden. Dieser Effekt ist durch Antisense-Nukleotide gegen *dHand* blockierbar. Die Expression von *dHand* mit Hilfe eines replikationskompetenten Retrovirus (*dHand*-RCASBP) hingegen führt zu einer drastischen Erhöhung catecholaminerger Differenzierung (Howard *et al.*, 1999). Werden Huhnembryonen mit retroviralem *dHand* infiziert, so werden ektopische Neuronen mit sympathischen Phänotyp induziert. Auch die ektopische Expression von *Phox2a* oder *Phox2b* induziert *dHand* in den generierten ektopischen Neuronen. *dHand* läßt sich somit in das BMP-induzierte transkriptionelle Netzwerk in der Entwicklung der sympathischen Neuronen einordnen (Howard *et al.*, 2000).

Gata2/-3

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Gata3 ist ein weiterer Kandidat, der mit der noradrenergen Differenzierung in Verbindung steht. Er ist u. a. im sympathischen Nervensystem und in Teilen der cranialen Neuralleiste exprimiert. Die Nullmutante ist embryonal lethal am Embryonaltag 11, und diese Lethalität wird mit einer reduzierten Expression von TH und DBH und daraus resultierendem vermindertem Noradrenalinegehalt im sympathischen Nervensystem in Verbindung gebracht (Lim *et al.*, 2000).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen der frühen Entwicklung noradrenerger sympathischer Neuronen ermöglichten die Identifizierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (Mash1, Phox2a/b, dHand) und Signalmoleküle (BMPs), die für die Differenzierung wesentlich sind. Die aus der Neuralleiste stammenden Vorläuferzellen erhalten an der dorsalen Aorta ein BMP-Signal (Reissmann *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1999), das die Transkriptionsfaktoren *Mash1/Cash1*, *Phox2a/b* und *dHand* induziert. In einer Reihe von *in vitro*- und *in vivo*- Experimenten konnte gezeigt werden, daß jeweils die ektopische Expression jedes einzelnen Transkriptionsfaktors im sympathischen Ganglion oder im Brachialnerv des Huhns ausreicht, die Expression der anderen Transkriptionsfaktoren und der terminalen Differenzierungsgene zu induzieren (Reissmann *et al.*, 1996; Stanke *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000). Dies führte zu der Vorstellung, daß ein Netzwerk sich gegenseitig regulierender Transkriptionsfaktoren gebildet wird, welches zur Aktivierung terminaler Differenzierungsgene führt: die Expression pan-neuronaler Gene (*SCG10* und *Neurofilament160*), noradrenerger Gene (*TH*, *DBH*) sowie cholinergere Gene (*ChAT*, *VACHT*) kann nachgewiesen werden.

In Mash1- bzw. Phox2a/b-Nullmutanten ist sowohl die sympathische wie auch die parasymphatische Differenzierung massiv gestört oder verhindert (Hirsch *et al.*, 1998; Pattyn *et al.*, 1997; Pattyn *et al.*, 1999).

Da die Entwicklung der Ciliarneuronen von der Expression von Transkriptionsfaktoren abhängt, die in der Entwicklung der noradrenergen sympathischen Neuronen wesentlich beteiligt sind und die durch BMP induziert werden können, liegt die Frage nahe, ob auch die Entwicklung des Ciliarganglions durch BMPs gesteuert wird. Zur Untersuchung dieser Frage sollten zunächst der Expressionsbeginn der einzelnen Transkriptionsfaktoren und

Phänotypmarker im Ciliarganglion genauer analysiert werden. Danach sollte analysiert werden, ob BMPs für die Bildung des Ciliarganglions essentiell sind. Dazu sollte der natürliche Inhibitor Noggin *in vivo* appliziert werden. In einem weiteren Versuchsansatz sollte mittels Überexpression von BMP4 untersucht werden, ob BMPs ausreichend sind, um in Ciliarvorläuferzellen eine Differenzierung zu autonomen Neuronen auszulösen.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle des bHLH-Transkriptionsfaktors dHand in der noradrenergen Differenzierung weiter untersucht werden. dHand ist ausreichend, um *in vitro* und *in vivo* die Expression noradrenerger Gene zu induzieren und scheint in der Differenzierung sympathischer noradrenerger Neuronen beteiligt zu sein. Es sollte untersucht werden, ob dHand diese Rolle auch in der Entwicklung des parasymphatischen Ciliarganglions einnehmen kann. Durch Überexpression von dHand sollte die Frage beantwortet werden, ob dHand im parasymphatischen peripheren Nervensystem ausreicht, noradrenerge Differenzierung auszulösen. Die Analyse von Nullmutanten sollte klären, ob dHand für die Differenzierung noradrenerger peripherer Neuronen essentiell ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herstellernachweise

Costar, Cambridge, Massachusettes, USA; Gewebekulturflaschen T75 (75 cm² Kulturfläche)

DIFCO, Detroit, Michigan USA; Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton, Bacto-Agar

Greiner, Frickenhausen, Deutschland; 35 mm Gewebekulturschalen aus Polystyrol mit 4 Kulturarealen (Durchmesser der Areale 6 mm, 95 mm² Kulturfläche)

Life Technologies, Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland; Agarose, Glutamin, Penicillin-Streptomycin (PS)-Lösung (5000 U/ml, 5000 µg/ml), Trypsin-EDTA-Lösung, fötales Kälberserum, DMEM, MEM, Taq DNA Polymerase, 10 x Taq DNA Polymerase Puffer

Menzel, Braunschweig, Deutschland; SuperFrostPlus Objektträger

Merck, Darmstadt, Deutschland; Natriumacetat, Eisessig, MgCl₂, CaCl₂ x 2 H₂O, NaCl, NaHCO₃, MgSO₄ x 7 H₂O, Tween 20, Natriumcitrat, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Glucose, Saccharose, Kaisers Glycerin Gelatine, KCl, KH₂HPO₄, Aceton, LiCl

Messer Griesheim, Frankfurt, Deutschland; CO₂, N₂

Millipore, Eschborn, Deutschland; Sterivex-GS 0,22 µm Filtereinheiten (Glockenfilter)

Mobitec, Göttingen, Deutschland, Zweitantikörper

Nunc, Wiesbaden, Deutschland; 35mm Gewebekulturschalen aus Polystyrol (9,62 cm² Kulturfläche)

Pelikan AG, Hannover, Deutschland; Tusche (schwarz)

Qiagen, Hilden, Deutschland; Plasmid Kits (Midi, Mini), Gel Extraktionskit, PCR Extraktionskit

Riedel-de-Haen, Seelze, Niederlande; Ethanol, NaOH, HCl

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland; Ampicillin, RNase freie DNaseI, DAB Substrat-Lösung, DNA Längenstandard, DIG-Nucleinsäure-Detektions-Kit, DIG-RNA-labeling Kit, Fast-Red Tabletten, Fluorescein-RNA-labeling-Kit, NBT, BCIP, NBT/BCIP Lösung, RNase Inhibitor, Restriktionsendonucleasen mit den zugehörigen Puffern, RNase Inhibitor

Roth, Karlsruhe, Deutschland; Glycerin, Triton-X-100, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Sakura, Zoeterwoude, Niederlande; Tissue-Tek

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland; Faltenfilter, Filterhalter (0,22 µm Rotrand, 0,22 µm Braunrand, 0,45 µm Weißrand)

Serva, Heidelberg, Deutschland; Paraformaldehyd

Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Diethylpyrocarbonat (DEPC), Ethidiumbromid (EtBr), Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), Isopropanol, Gelatine, Levamisol, Mineralöl, Hefe-RNA, Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat)

Stratagene, La Jolla, Californien, USA; XL-1 blue (elektrokompetente Zellen), DNA Polymerase I, StrataScriptTMMRT-PCR Kit

Worthington, Freehold, Ohio, USA; Trypsin

2.1.2 Lösungen

Sämtliche Lösungen werden, sofern nicht anders angegeben, in hochgereinigtem H₂O (MilliQ-Filtersystem der Firma Millipore) angesetzt.

2.1.2.1 Lösungen für die Zellbiologie

10 x PBS 1,3 M NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄,
26 mM KCl, pH7,3

Trypsin Trypsin wird mit 18900 U/10 ml PBS angesetzt. Nach Sterilfiltration wird die Lösung bei -20°C gelagert und 1:10 verdünnt eingesetzt.

PS-Lösung Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml, Gibco 15070-063

2.1.2.2 Lösungen für die Molekularbiologie

TAE 40 mM Tris-acetat, 2 mM EDTA (pH 8,0)

TE-Puffer 50 mM Tris-HCl, (pH 8,25), 1 mM EDTA (pH 8,0)

Embryo-DNA Präparations- für 10 ml: 9,7 ml H₂O, 15 µl 1M MgCl₂; 100 µl 1M Tris-
medium HCl pH 8,3, 125 µl 4M KCl, 30 µl Tween20, 30 µl NP40; die
Lösung kann bei -20°C gelagert werden

PCR-Mix für Zebrafisch-Genotypisierung

Finale Konzentration: 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 0,001% Gelatine, 125 mM dNTPs, 0,1 U Taq-Polymerase, 0,1 mM Oligonukleotide (Primer); Für ca. 20 l Aliquots: 18,1 ml H₂O, 39,3 µl 1M MgCl₂, 262 µl 1M Tris-HCl pH 8,4, 327 µl 4M KCl, 26 µl Gelatine, 347 µl BSA (100 mg/ml), 26 µl dATP, dCTP, dGTP und dTTP (je 100 mM)

2.1.2.3 Lösungen für die Immuncytochemie

PBT1

PBS mit 0,1% (v/v) Triton und 1% (w/v) BSA

PBT2

PBS mit 0,1% (v/v) Triton und 0,1% (w/v) BSA

KRH

125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 25 mM HEPES, 1,2 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 1,2 mM KH₂PO₄, 6 mM Glucose, pH 7,3

4% Paraformaldehyd

Paraformaldehyd im Wasserbad bei 60°C in Phosphatpuffer 0,1M, pH 7,4 lösen, bei -20°C lagern

2.1.2.4 Lösungen für die *in situ*-Hybridisierungen auf Schnittpräparaten

Natriumphosphatpuffer (0,1 M NaP)

7g Na₂HPO₄ x 2 H₂O und 1,38g NaH₂PO₄ in 500 ml H₂O lösen, pH 7,0

Hybridisierungspuffer

1 ml 10 x Salz, 5 ml Formamid, 1 ml Hefe RNA (10 mg/ml), 2 ml 50% (w/v) Dextransulfat, 100 µl 50 x Denhardts, 900 µl H₂O

20 x SSC

3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat in H₂O, pH 7,0

10 x Salz

0,46 g Tris (pH 7,5), 3,24 g NaCl, 0,23 g NaH₂PO₄ x H₂O, 3 ml 0,5 M EDTA, auf 30 ml mit H₂O auffüllen, autoklavieren

0,5 M EDTA	186,12 g Ethylendiamintetraacetat in H ₂ O lösen, pH 8,0 mit NaOH-Plätzchen (ca.23 g) und 1 M NaOH einstellen, mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen.
50 x Denhardts	1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) Polyvinylpyrillidon (PVP), bei -20°C lagern
Waschlösung	1 x SSC, 50% (v/v) Formamid, 0,1% (v/v) Tween 20
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, autoklavieren (MAB), vor Gebrauch 0,1% (v/v) Tween 20 zugeben (MABT)
AP-Puffer	200 ml 1M Tris (pH 9,5), 10 ml 1 M MgCl ₂ , 4 ml 5 M NaCl, 200 µl Tween20, 48 mg Levamisol, auf 200 ml mit H ₂ O auffüllen
15% Saccharose in 0,1 M NaP-Puffer	15 g Saccharose in 100 ml 0,1 M NaP-Puffer lösen, sterilfiltrieren

2.1.2.5 Lösungen für die *in situ*-Hybridisierungen auf Zebrafisch-Embryonen

Lösungen für die Dehydrierung und Rehydrierung in Methanol	100%, 75%, 50% und 25% Methanol in PBT
PBT	PBS mit 0,1% Tween20
Proteinase K-Stocklösung	Proteinase K 10 µg/ml in PBT
Hybridisierungsmix	25 ml Formamid, 12,5 ml 20 x SSC, 50 µl Heparin (50 mg/ml Stocklösung), 2,5 ml Hefe-RNA (10 mg/ml Stocklösung), 50 µl Tween20, 0,46 ml 1M Zitronensäure, mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen. Kann in Aliquots portioniert bei -20°C eingefroren werden

Waschlösungen	2 x SSC; 0,2 x SSC; 75%, 50% und 25% Hybridisierungsmix in 2 x SSC; 75%, 50% und 25% 0,2 x SSC in PBT	
Inkubationslösung für die Antikörperbindung	PBT mit 2 mg/ml BSA und 2% Schaf-Serum (200 µl Schaf-Serum + 1 ml 0,2 g/10 ml BSA in PBT für 10 ml Lösung)	
NTMT	100 mM Tris-HCL pH 9,5	10 ml 1M/100ml
	50 mM MgCl ₂	5 ml 1M/100ml
	100 mM NaCl	2 ml 5M/100ml
	0,1% Tween20	0,1 ml/100ml

2.1.3 Medien

2.1.3.1 Medien für die Zellkultur

CEF-Fibroblasten	DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), 10% (v/v) fötales Kälberserum, 1 % (v/v) PS-Lösung
DF1-Fibroblastenlinie	DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), 10% (v/v) fötales Kälberserum, 1% (v/v) PS- Lösung
CHO-Zelllinie	(MEM ohne Nukleotide mit Glutamax I (88 ml, Bestellnr. 32561-037 (Gibco)), 10% FCS (fötales Kälberserum, dialysiert, 10 ml), 1% Na-Pyruvat (1 ml, Bestellnr. 11360-039 (Gibco)), 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (1 ml, Bestellnr. 11140-035 (Gibco)), 80 µl Methotrexat (100 µm Stocklösung, Sigma)

CHO-Noggin produzierende wie CHO-Zelllinie
Zelllinie

Das verwendete Serum wird vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

2.1.3.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium 10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl in 1 l H₂O lösen. Autoklavieren

LB-Agarplatten 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, 15 g Agar in 1 l H₂O lösen, autoklavieren und unter Rühren auf 60°C abkühlen lassen. Die Platten können bei 4°C gelagert werden

Zur Herstellung von Selektionsmedien werden nach dem Abkühlen der Lösungen auf 50°C 50-100 mg/ml Ampicillin dazugegeben.

2.1.4 Immunologische Reagenzien

2.1.4.1 Antikörper

anti-GAG-(AMV3C2): IgG1 Maus Hybridomaüberstand, wechselnde Konzentrationen, Developmental Studies Hybridoma Bank

Cy3- oder Cy5-konjugiert-anti-Maus IgG (H+L) aus Esel oder Ziege und Cy3-konjugiert-anti-Kaninchen IgG (H+L) aus Ziege, Dianova, Hamburg

Alexa 488 oder Alexa 594 anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege, 1:500 verdünnt, Mobictec, Göttingen

2.1.5 DNA-Konstrukte

2.1.5.1 virale Konstrukte

dHand-RCAS(B) M. Howard, Ohio, USA

mBMP4-RCAS(B) P. Brickell, London, England

2.1.5.2 Plasmide für Sondensynthesen

Cash1	1,9 kb cDNA Sequenz in pBluescript/SK, (T. Reh, Washington, USA)
cChAT	2,8 kb Fragment in pBluescript/SK, (T. Jessell, New York, USA)
cCHT1	selbst
cDBH	480 bp Fragment in pBluescript/SK, (T. Jessell, New York, USA)
cPhox2a	346 bp cDNA Sequenz in pBluescript/SK, (Ernsberger et al., 1995)
cPhox2b	374 bp PCR-Fragment in pBluescript/SK, (C. Goridis, Marseille, Frankreich)
cVACHT	800 bp Fragment in pBluescript/SK, (M. Stanke)
cTH	1,8 kb cDNA Sequenz in pBluescript/SK, (U. Ernsberger)
cNF160	ca. 1 kb Fragment in pBluescript/SK, (E. Gundelfinger, Magdeburg)
Reverse Transkriptase	405bp Fragment aus RCAS in pBluescript/SK, (S. Heller)
cSCG10	890 bp cDNA Sequenz in pGEM-3Z (T. Jeffrey)
cSOX10	3kb cDNA Sequenz in pBluescript/SK, (M. Wegner, Erlangen)
zDBH	780 bp Fragment in pGEM-T-easy, (W. Driever, Freiburg)
zTH	linearisieren mit Sal I, transkribieren mit T7 (P. Henion, Ohio)
zPhox2a	Sequenz in Topo TA, (Susie Lee, SanFrancisco)
zPhox2b	1091 bp Sequenz in pBS KS Blueskript (Jochen Holzschuh, Freiburg)

2.1.6 Oligonukleotide

Sequenzierprimer	T3:	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
	T7:	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
RCAS:sense:		5'-GTGAAATACGCTTTTGTCTGTGTG-3'
antisense:		5'-ACAACCGAAGCCCCGCTTTTCGCC-3'
hand2-F		5'-CACCTGTAAATGCACCATGAC'-3'
hand2-R		5'-CTTGTCATTGCTGCTCCCTGAAC-3'

2.1.7 Organismen

Zur retroviralen Infektion von Embryonen werden virusfreie Embryonen des Haushuhns (*Gallus domesticus*; white Leghorn) verwendet. Für die Expressionsanalysen werden herkömmliche Hühnereier verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Passagieren und Kultivierung von Huhn-Fibroblasten- und CHO-Zelllinien

Die Zellen werden in 6 cm-Kulturschalen mit 6 ml Medium kultiviert. Sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet haben (ca 6×10^5 Zellen), werden sie passagiert, d. h. in geringerer Dichte in eine neue Kulturschale überführt. Das Medium wird dazu unter sterilen Bedingungen abgesaugt, anschließend werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt, und 1 ml Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben. Das Trypsin verdaut Oberflächenproteine und dient dazu, die Zellen vom Untergrund zu lösen. Die Ablösung wird am Mikroskop beobachtet und kann durch vorsichtiges Klopfen an der Kulturschale beschleunigt werden. Das Trypsin wird durch Zugabe von serumhaltigem Medium blockiert, 10-20% der Zellen werden in eine neue 6 cm Kulturschale überführt (entsprechend mehr für größere Kulturbehälter. Die Zellen werden bei 37°C und 5% (CEF, CHO, CHO-Noggin) bzw. 10% (DF1) CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Es ist möglich, Fibroblastenzellen in flüssigem Stickstoff zu lagern. Zellen einer konfluenten Kulturflasche (75 cm²) werden trypsiniert (siehe oben), die Reaktion wird mit serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen werden in der Zentrifuge mit 150 x g für 10 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt, und die Zellen werden in kaltem Medium mit 10% (v/v) DMSO aufgenommen. Für eine konfluente 75 cm²-Kulturflasche werden 5 ml Medium verwendet. Die Suspension wird zügig in Kryoröhrchen überführt, die in einer Einfrierbox (Qualifreeze) eingefroren werden. Die Einfrierbox ermöglicht ein definiertes Einfrieren (-1°C/min) bei -70°C. Die Zellen können am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

2.2.1.3 Transfektion von Fibroblasten

Superfekt (Qiagen)

Die Zellen werden nach Vorschrift des Herstellers transfiziert. Für eine Kulturschale (Durchmesser 6 cm) wird 1 µg Plasmid-DNA verwendet.

Die Zellen werden mit der DNA replikationskompetenter Viren (RCAS) transfiziert. Daher kann auf eine Cotransfektion mit einem Reporterplasmid verzichtet werden. Die DNA wird ins Wirtsgenom integriert, transfizierte Zellen können anhand viraler Proteine immunocytochemisch identifiziert werden

Effectene (Qiagen)

Die Zellen werden nach Vorschrift des Herstellers transfiziert. Für eine Kulturschale (Durchmesser 6 cm) wird 0,4 µg Plasmid-DNA verwendet.

Auch hier erfolgt die Transfektionskontrolle anhand viraler Proteine.

2.2.2 *In vivo*-Experimente

Es ist möglich, in die embryonale Entwicklung von Huhnembryonen einzugreifen, indem virus- bzw. faktorproduzierende Zellaggregate in zwei Tage alte Embryonen implantiert oder Teile des Embryos explantiert werden. Die operierten Embryonen werden weiterbebrütet, bis das gewünschte Stadium erreicht ist.

Die Implantationen der virusproduzierenden Zellen sowie die Entfernung der Augenanlage wurden von Prof. Dr. H. Rohrer durchgeführt, die Implantation der CHO- bzw. CHO-Noggin-Zellen wurden nach Anleitung selbst ausgeführt.

2.2.2.1 Herstellung von Zellaggregaten

Zellaggregate für die Implantation werden aus einer konfluenten 6 cm-Kulturschale hergestellt. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die abgelösten Zellen werden bei 150 x g für 10 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen werden in ca. 60-100 µl Medium resuspendiert. Damit sich Zellaggregate bilden, werden die Zellen in hängenden Tropfen kultiviert ("Hanging-Drop-Culture"). Dazu werden

zunächst die 60-100 μl Zellen in den offen in der Sterilbank liegenden Deckel der Kulturschale pipettiert. Nun wird eine Verdünnungsreihe erstellt, indem der Tropfen wiederholt halbiert und mit neuem Medium auf 60 μl aufgefüllt wird, so daß 5-6 verschiedene Verdünnungen entstehen. Der Deckel wird mit vorsichtigem Schwung gedreht und auf die mit Medium gefüllte Kulturschale gegeben, so daß die Tropfen über einer feuchten Kammer hängen. Alternativ zu dieser Methode können die Tropfen direkt von unten an den Deckel pipettiert werden. Die Tropfen werden über Nacht kultiviert, so daß sich die Zellen zu festen Aggregaten zusammenlagern können. Kleine Teile eines Aggregats können dann implantiert werden.

2.2.2.2 Herstellung von CHO-Zellsuspensionen für die Implantation

CHO-Zellen von einer konfluenten 6 cm Kulturschale werden trypsinisiert und bei 150 x g für 10 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wird entfernt, und die Zellen im gleichen Volumen in PBS mit 10% PS-Lösung aufgenommen. Die Zellsuspension kann dann in die Injektionskanüle aufgesaugt und in den Embryo injiziert werden.

2.2.2.3 Implantation

Die Eier werden für die Implantationsexperimente für 40-42 Stunden bei 37°C und 60-70% Luftfeuchtigkeit liegend bebrütet, so daß sie während der Operation Stadium 11 nach Hamburger und Hamilton (1951), d.h. zwischen 10 und 14 Somiten, erreicht haben.

Um den Dotter abzusenken, werden dem Ei zunächst durch die Luftblase 4 ml Eiweiß mit einer sterilen Spritze abgesaugt. Das Ei wird mit Scotch-Film abgeklebt, um die Schale zu verstärken und um das Ei nach der Operation abdichten zu können. Dann wird mit einer feinen Schere die Schale an der Längsseite kreisförmig geöffnet, so daß das Ei nun oben eine ca. 3 cm durchmessende Öffnung aufweist. Die Vitellinmembran wird über der Implantationsstelle geöffnet und das Zellaggregat wird mit Hilfe einer feinen Nadel seitlich der Mittelhirn-/Hinterhirngrenze in das craniale Mesenchym eingeführt. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Blutgefäße beschädigt werden. Um den Embryo vor Austrocknung zu bewahren, werden 100 μl PBS/10% PS-Lösung auf den Embryo geträufelt. Das Ei wird mit Klebeband versiegelt und bis zum gewünschten Stadium bebrütet.

2.2.2.4 Injektion von CHO-/CHO-Noggin-Zellsuspension

Die Eier werden wie für die Implantation von Zellaggregaten vorbereitet. Die Operation verläuft im Prinzip wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Anstelle eines Zellaggregats wird mit einer feinen Glaskanüle eine Suspension von CHO- oder CHO-Noggin-Zellen in das craniale Mesenchym des Embryo injiziert.

2.2.2.5 Präparation und Fixierung von Embryonen

Die Embryonen werden aus dem Ei entnommen und in PBS gespült. Das Entwicklungsstadium wird nach Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt. Anschließend werden die Embryonen über Nacht in 4% (w/v) Paraformaldehyd bei 4°C fixiert, danach wird der Wassergehalt der Embryonen ebenfalls über Nacht bei 4°C in 15% (w/v) Saccharose in NaP-Puffer reduziert. Die Embryonen können nun auf Trockeneis in TissueTek-Einbettmedium eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden. Die Paraformaldehydlösung kann bei -20°C gelagert und einmal aufgetaut werden. Das Fixier- bzw. Entwässerungsmedium sollte in ca. 20-50 fachem Überschuß auf die Embryonen gegeben werden.

2.2.2.6 Anfertigung von Gefrierschnitten mit dem Kryostat

Die in TissueTek eingebetteten Embryonen werden mit dem Kryostat (Leica CM 3050 S) bei ca. -20°C geschnitten. 12-14 µm dicke Schnitte werden auf SuperFrostPlus-Objektträgern (Menzel, Braunschweig) aufgenommen, für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3 Antikörperfärbung

2.2.3.1 Immuncytochemische Verfahren

Für die Antikörperfärbung werden die Zellen in 35 mm Kulturschalen mit 4 Kulturarealen kultiviert. Pro Kulturareal werden 80 µl Antikörperlösung eingesetzt. Das Medium wird

abgesaugt, die Zellen mit KRH gewaschen. Es ist während der gesamten Prozedur darauf zu achten, daß die Zellen nicht trocken fallen. Es werden jeweils 1 ml Wasch-/Fixierlösung verwendet. Die Zellen werden für 15 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert, anschließend für 5 min mit KRH gewaschen. Die Zellen werden mit PBT1 für 15 min permeabilisiert. Der erste Antikörper wird nach Anleitung in PBT1 verdünnt und für 30 min auf die Zellen gegeben. Anschließend wird zunächst 3 x 5 min mit PBT1, dann 1 x 10 min mit PBT2 gewaschen. Der zweite Antikörper wird nach Anleitung in PBT2 verdünnt und ebenfalls für 30 min auf die Zellen gegeben. Nichtgebundener Antikörper wird durch zweimaliges Waschen mit PBT2 entfernt. Die Zellen können nun in 50% (v/v) Glycerin in PBS eingebettet werden. Der Zweitantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und kann unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.2.4 *In situ*-Hybridisierung

Die Transkription verschiedener Gene kann durch einen Nachweis der mRNA geschehen. Eine Digoxigenin- (DIG-) oder Fluoresceinmarkierte RNA-Sonde, die zur nachzuweisenden mRNA komplementär ist, kann an diese binden und dann nachgewiesen werden (Schaeren-Wiemers und Gerfin-Moser, 1993). Die Sonden können durch *in vitro*-Transkription hergestellt werden. Das Gewebe wird fixiert und mit der Sonde hybridisiert. Überschüssige, nichthybridisierte Sonde wird abgewaschen und die gebundene Sonde wird durch Antikörper, die spezifisch Digoxigenin oder Fluorescein erkennen, gebunden. An den Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gebunden, die ein Farbsubstrat in einen farbigen, nicht-löslichen Niederschlag umsetzt (Höltke *et al.*, 1995). Als Farbsubstrate dienen NBT/BCIP oder Fast Red (beide von Roche), die in einen blauen bzw. roten Farbstoff umgesetzt werden.

2.2.4.1 *In situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten

A) Einfach-*in situ*-Hybridisierung (Ernsberger *et al.* 1997).

Hybridisierung

Die Gewebeschnitte werden auf Raumtemperatur angeglichen. Währenddessen wird die Sonde in Hybridisierungspuffer 1:100 bis 1:300 verdünnt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Pro Objektträger werden 110 µl Sondenlösung aufgetragen. Die Objektträger werden mit

einem sterilen Deckglas abgedeckt und über Nacht in einer mit Waschpuffer befeuchteten Kammer bei 68°C inkubiert.

Antikörper-Applikation

Die Gewebeschnitte werden für eine Stunde bei 68°C in Waschpuffer, dann eine Stunde in MABT (0,1% (v/v) Tween20 in Maleinsäurepuffer) gewaschen. Die Schnitte werden anschließend für eine Stunde mit MABT/20% (v/v) Hühnerserum blockiert. Der anti-DIG-Antikörper bzw. der anti-Fluorescein Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:3000 in Blocklösung vorbereitet und kann auf Eis eine Stunde präinkubieren. Für die Antikörper-Reaktion werden pro Objektträger 110 µl Antikörperlösung aufgetragen. Sie werden mit einem Deckglas abgedeckt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Farbreaktion

Nicht gebundener Antikörper wird durch einstündiges Waschen der Schnitte in MABT bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend werden die Gewebeschnitte zweimal für je 10 min mit AP-Puffer äquilibriert. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 110 µl Substratlösung (1% (v/v) NBT/BCIP Stocklösung in AP-Puffer) pro Objektträger im Dunkeln durchgeführt. Die Objektträger werden dabei mit Deckgläsern abgedeckt. Die Reaktion wird durch Waschen in PBS beendet und die Schnitte schließlich in Kaisers Glyceringelatine mit einem Deckglas eingebettet.

Die Hybridisierungssignale können am Mikroskop analysiert werden.

B) Doppel-*in situ*-Hybridisierung

Hybridisierung

Durch die gleichzeitige Hybridisierung mit zwei unterschiedlich markierten RNA-Sonden kann die Expression zweier Gene analysiert werden. So können die Co-Expression oder die exklusive Expression zweier Gene in derselben Zelle nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt wie in der Einzelhybridisierung mit Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind. Während die Hybridisierungsreaktion mit beiden Sonden parallel verläuft, erfolgt die Antikörper- und die Farb-Reaktion in zwei getrennten Schritten. Zunächst wird Sonde A mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper und rotem Farbsubstrat nachgewiesen. Die Schnitte werden fotografiert, der Antikörper wird danach durch Waschen mit Glycin pH

1,8 entfernt und die zweite Sonde kann anschließend mit einem anti-Fluorescein-Antikörper und blauem Farbsubstrat nachgewiesen werden. Ob erst Digoxigenin oder erst Fluorescein nachgewiesen wird ist dabei frei wählbar, jedoch empfiehlt es sich, das als stärker erwartete Signal mit rotem Farbsubstrat zu färben. Das dunklere Substrat kann dann die schwächere Sonde nachweisen. Die Hybridisierung verläuft wie oben beschrieben. Die beiden Sonden werden 1:100 verdünnt in 110 µl Hybridisierungspuffer auf die Schnitte gegeben. Die Hybridisierung erfolgt, wie beschrieben, über Nacht in einer feuchten Kammer bei 68°C

Antikörper-Applikation 1

In Abhängigkeit des zuerst nachzuweisenden Hybridisierungsereignisses wird ein anti-Fluorescein-Antikörper oder ein anti-DIG-Antikörper eingesetzt. Beide Antikörper sind mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Der Verlauf der Antikörper-Applikation ist identisch zu der oben beschriebenen.

Farbreaktion 1

Die Gewebeschnitte werden 1 Stunde in MABT gewaschen. Danach werden sie zweimal 10 min in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,2) inkubiert. Eine Tablette Fast-Red (Roche Diagnostics, Mannheim) wird in 2 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,2) gelöst und sterilfiltriert. Diese Substratlösung (110 µl/Objektträger) wird auf die Gewebeschnitte gegeben und die Farbreaktion dadurch gestartet. Die Objektträger werden dabei mit Deckgläsern abgedeckt. Die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase setzt das Substrat in einen roten Farbstoff um. Die Reaktion wird im Dunkeln über Nacht durchgeführt.

Antikörper-Applikation 2

Die Gewebeschnitte werden eine Stunde in PBS gewaschen und dadurch die erste Farbreaktion beendet. Um den Antikörper der ersten Reaktion abzulösen, werden die Gewebeschnitte dreimal 10 min in 0,1 M Glycin in H₂O (pH 1,8) inkubiert. Die Schnitte werden in PBS/50%Glycerin eingedeckelt und photographiert. Danach werden die Gewebeschnitte 1 Stunde in MABT gewaschen.

Der weitere Verlauf der Antikörper-Applikation ist identisch zu der bereits beschriebenen. Hierbei wird in Abhängigkeit von der noch nachzuweisenden Hybridisierung ein anti-DIG- oder anti-Fluorescein-Antikörper eingesetzt.

Farbreaktion 2

Die zweite Farbreaktion wird mit NBT/BCIP-Substrat durchgeführt. Sie verläuft wie oben beschrieben. Die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase setzt das eingesetzte Substrat in einen blauen Farbstoff um.

2.2.4.2 *In situ*-Hybridisierung auf Zebrafischembryonen

Die Zebrafisch-Embryonen werden zunächst in einer Methanolreihe fixiert. Dazu werden sie jeweils 5 min in 25%, 50%, 75% und 100% Methanol in PBT (PBS mit 0,1% Tween) fixiert. Anschließend wird 3 mal für 5 min 100% Methanol ausgetauscht. Die Fische können dann bei -20°C gelagert werden.

Um die Fische zu verarbeiten, werden sie in einer umgekehrten Methanolreihe wieder in PBT überführt, dann 3 x 5 min in PBT gewaschen.

Proteinase K-Verdau:

Die Embryonen werden für 30 min (2 Tage alte Embryonen) bzw. 1 h 30 min (3 Tage alte Embryonen) in Proteinase K (10 µg/ml in PBT (10 µl Stocklösung 10 mg/ml in 10 ml PBT)) verdaut.

Refixierung:

Um den Proteinase K-Verdau zu stoppen, werden die Fische für 20 min in 4% Paraformaldehyd fixiert, anschließend 5 x 5 min mit PBT gewaschen und in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt.

Prähybridisierung:

Die Fische werden für 2-5 h bei 68°C in 200 µl Hybridisierungsmix prähybridisiert.

Hybridisierung:

Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 68°C in 200 µl Hybridisierungsmix mit der entsprechenden Sonde (1:100 verdünnt). Am nächsten Tag wird folgendermaßen gewaschen:

- 1x kurz mit 100% Hybridisierungsmix (HM, 68°C)
- 15 min 75% HM-25% 2x SSC (68°C)
- 15 min 50% HM-50% 2x SSC (68°C)
- 15 min 25% HM-75% 2x SSC (68°C)
- 15 min 2 x SSC (68°C)
- 2 x 30 min 0,2 x SSC (68°C)

ab jetzt Raumtemperatur

- 5 min 75% 0,2 x SSC/25% PBT
- 5 min 50% 0,2 x SSC/50% PBT
- 5 min 25% 0,2 x SSC/75% PBT
- 5 min PBT

Antikörperbindung:

Präinkubation der hybridisierten Embryos: Die hybridisierten Fische werden für 2-5 h in PBT + 2 mg/ml BSA + 2% Schafserum inkubiert. Dabei wird leicht (60-120 rpm) geschüttelt.

Inkubation mit anti-Digoxigenin-Antikörper: Die Antikörperreaktion erfolgt über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln. Der Antikörper wird 1:3000 in PBT + 2 mg/ml BSA + 2% Schafserum inkubiert.

Farbreaktion:

Nach der Antikörperreaktion wird bei Raumtemperatur wie folgt gewaschen:

- 1 x kurz mit PBT
- 6 x 15 min mit PBT
- 3 x 5 min in NTMT

Die Färbung verläuft für 5 min bis 24 h in 1 ml Färbelösung bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln im Dunkeln

Färbelösung: 4,5 µl NBT (Roche) + 1 ml NTMT + 3,5 µl BCIP (Roche)

Die Färbung wird am Stereomikroskop verfolgt. Sie wird bei hinreichender Färbung durch Waschen in 3 x 5 min PBT, dann 3 x 5 min PBS gestoppt. Sollte sich die Färbung als nicht ausreichend erweisen, kann die Farbreaktion an diesem Punkt fortgesetzt werden. Dazu 3 x 5 min in PBT, dann 3 x 5 min in NTMT waschen, dann weiterfärben mit Färbelösung.

Zur besseren Analyse und für die Genotypisierung können mit einer sterilen Kanülenspitze Dotter und Gewebeteile entfernt und in DNA-Präparationsmedium aufgenommen werden.

Die Farbreaktion wird durch Waschen in Glycin, pH 1,8 (2 x 30 min) endgültig gestoppt. Die Embryonen können in Glycerin bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden.

2.2.5 Planimetrische Analyse von *in situ*-Hybridisierungssignalen

Die planimetrische Analyse erfolgt am Mikroskop mit Hilfe des Metamorph Bild-Analyse-Systems. Digitale schwarz/weiß Bilder der Gewebeschnitte mit den Hybridisierungssignalen werden erstellt, wobei die Beleuchtungs- und Vergrößerungsbedingungen während der Messungen konstant gehalten werden. Die Hybridisierungssignale, deren Fläche bestimmt werden soll, werden markiert. Die Größe der Fläche wird durch das Computerprogramm errechnet und in μm^2 angegeben. Für jeden analysierten Embryo wird die durchschnittliche Hybridisierungssignalfläche (z. B. die Fläche der Ciliarganglien + eventuelle ektopische Zellen) ermittelt. Zur Erstellung einer Meßreihe werden mindestens drei Embryonen herangezogen, deren Werte als Durchschnittswerte + s.e.m. (Standardfehler des Mittelwertes) wiedergegeben werden.

Um den Effekt der BMP4-Behandlung zu visualisieren, wurden digitale Bilder *Phox2b*-gefärbter Serienschnitte für die 3D-Rekonstruktion mittels Metamorph Bild-Analyse-System verwendet.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Vermehrung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA kann durch Elektroporation in *E. coli*-Bakterien eingebracht werden. Die Bakterienzellen erhalten einen kurzen elektrischen Impuls, der Poren in der Zellmembran erzeugt, durch die im elektrischen Feld beschleunigte Plasmid-DNA in das Bakterieninnere gelangen kann. Pro Transformation werden ca. 0,1-1 ng DNA und 50 μl elektrokompente Bakterien (XL1-Blue) eingesetzt. DNA und Bakterien werden gemischt, in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette gegeben (0,2 cm, Biorad), und einem elektrischen Impuls (5 ms, 200 W, 25 mF, 2,5 kV (Feldstärke 12 kV/cm)) ausgesetzt. Die Bakterien werden sofort anschließend in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Danach wird die Bakteriensuspension auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien werden am nächsten Tag in Flüssigkultur überimpft und über Nacht vermehrt.

2.2.6.2 Präparation von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA aufzureinigen, werden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet, lysiert und die freien Plasmide werden auf einer Silikatsäule gebunden und isoliert. Es wurden Säulen und Puffer der Fa. Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die aufgereinigte DNA wird in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen und kann bei -20°C gelagert werden.

2.2.6.3 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode unter Verwendung eines DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems). Als Sequenzierprimer wurden T3, T7, SP6, RCAS-Sequenzierprimer oder PCR-Primer in einer Konzentration von 5 pmol/ μl eingesetzt. Die Reaktion wird nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.6.4 Restriktionsspaltung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Um Plasmid-DNA zu linearisieren oder DNA-Sequenzen anhand von Restriktionsschnittstellen zu überprüfen, kann DNA durch Endonukleasen an definierten Stellen gespalten werden. Pro μg zu spaltender DNA werden 2-5 U Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37°C für 1-5 h zum Verdau eingesetzt. Zur Überprüfung der Reaktion wird eine Probe des Restriktionsansatzes durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Probe wird mit Ladepuffer versetzt und im Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird in Ethidiumbromid-Lösung ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) für 10 min gefärbt und kann dann im UV-Durchlicht analysiert werden. Soll die DNA für *in vitro*-Transkriptionsreaktion verwendet werden, wird sie mit dem PCR-Aufreinigungs-Kit der Fa. Qiagen aufgereinigt. Die Konzentration wird photometrisch (Spektrometer DU640, Beckmann) bei 260 nm bestimmt.

2.2.6.5 Herstellung von RNA-Hybridisierungs sonden durch *in vitro*-Transkription

Die Sonden für die *in situ*-Hybridisierungen werden durch *in vitro*-Transkription mit dem DIG- oder Fluorescein-RNA-Labeling-Kit der Fa. Roche hergestellt. Eine 20 μl *in vitro*-

Transkriptionsreaktion wird mit 1 µg linearisiertem Plasmid, 2 µl Nukleotidmix in 1 x Transkriptionspuffer angesetzt. Der Abbau neusynthetisierter RNA wird durch 50 U RNase-Inhibitor verhindert. Der Start der Reaktion erfolgt in Abhängigkeit vom verwendeten Promotor durch Zugabe von 10-20 U T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase. Der Ansatz wird für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 10-20 U RNase freier DNase wird die Plasmid-DNA abgebaut. Die *in vitro*-transkribierte RNA wird durch Zugabe von 3,5 µl 4M LiCl und 100 µl Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen in 70% Ethanol wird die Sonde in 100 µl H₂O aufgenommen.

2.2.6.6 Genotypisierung der Zebrafisch-Embryonen

Die Zebrafische können vor oder nach der *in situ*-Hybridisierung genotypisiert werden. Dazu wird eine Gewebeprobe, z.B. Dotter oder Schwanz (siehe auch Abb. 3.10) in DNA-Präparationsmedium aufgenommen und für 12 h mit Proteinase K verdaut:

98°C 10 min
55°C 12 h (nach ca. 5 min wird die Proteinase K zugegeben)
98°C 10 min
4°C lagern bis zur weiteren Verwendung

Die DNA wird nun für eine PCR-Reaktion verwendet. Dazu werden 2 µl DNA mit 17 µl PCR-Mix für die Zebrafisch Genotypisierung, 1 µl hand2-F, 1 µl hand2-R (20µM Stocklösung ansetzen. Für 2 µM Arbeitslösung 10 µl hand2-F, 10 µl hand2-R und 80 µl H₂O ansetzen) und 0,1 µl Taq-Polymerase (Invitrogen) in angesetzt:

94°C 5 min

94°C 30 sec
55°C 30 sec
72°C 1 min
--> 44 x wiederholen

72°C 5 min
4°C halten

Die DNA wird mittels Gelelektrophorese analysiert. Die „Hands off“/*han^{s6}*-Mutante ist eine Deletionsmutante, bei der der gesamte *dHand*-Genlocus fehlt (Yelon *et al.*, 2000). Das *dHand*-Wildtypallel ergibt eine Bande von 765 Basenpaaren Länge, fehlt der *dHand*-Genlocus, ergeben sich eine bis mehrere kleinere unspezifische Banden unbestimmter Größe.

3 Ergebnisse

3.1 Expression pan-neuronaler und subtypspezifischer Gene im Huhn-Ciliarganglion

Sympathische Neuronen zeigen im Verlauf ihrer Entwicklung ein charakteristisches Muster in der Expression verschiedener Gene. Unter der Einwirkung von BMPs, die von der dorsalen Aorta produziert werden, beginnt in den Vorläuferzellen die Expression einer Reihe proneuraler (*Mash1/Cash1*) und autonomer Transkriptionsfaktoren (*Phox2a/b*, *dHand*), worauf die Expression neuronaler sowie spezifisch noradrenerger und/oder cholinergischer Gene folgt.

Die Untersuchung der Entwicklung des Ciliarganglions zeigte einen bemerkenswert ähnlichen Verlauf der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren und Differenzierungsgene.

Charakteristische Markergene konnten zuerst am Embryonaltag 3 (E3), Stadium 18 HH in den Ganglienvorläuferzellen registriert werden, die sich um den okulomotorischen Nerv herum zum Ganglion zusammenlagern. Der früheste untersuchte Transkriptionsfaktor, das proneurale Gen *Cash1*, wird ab Stadium 18 HH exprimiert (Abb. 3.1; Abb. 3.2), gefolgt von der Expression von *Phox2b* und *Phox2a* (Abb. 3.1 und nicht gezeigt; Abb. 3.2).

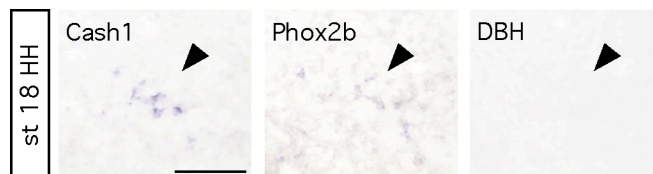


Abb. 3.1: Expressionsbeginn proneuraler und autonomer Transkriptionsfaktoren

Die Expression des proneuralen Markergens *Cash1* ist bereits an Stadium 18 HH zu sehen. Die Expression von *Phox2b* beginnt nach der Expression von *Cash1*, aber

deutlich vor der Expression des noradrenergen Markergens *DBH*. Gezeigt sind Ciliarganglien auf Parallelschnitten. Längensstandard 100 μ m

Die Expression von *Cash1*, *Phox2b* und *Phox2a* bleibt während der untersuchten Stadien (bis Embryonaltag 8, bevor der Zielgebietskontakt hergestellt ist (Landmesser & Pilar, 1974)) erhalten. Anders als *Phox2a/b* ist die Expression von *Cash1* am Embryonaltag 8 deutlich reduziert (Abb. 3.2, vergleiche *Cash1*-Expression an St. 24/25 (E4,5) mit St. 32/33 (E8)).

In den sympathischen Ganglien werden die bHLH-Transkriptionsfaktoren *dHand/HAND2* und *eHand/HAND1* nach *Phox2b* und vor *Phox2a* exprimiert (Howard et al., 2000; Tsarovina et al., 2004). In den Ciliarganglien wurde in keinem der untersuchten Stadien *dHand*- oder *eHand*-Expression detektiert (Abb. 3.2 und nicht gezeigt).

Die Expression der pan-neuronalen Gene *SCG10* sowie *Neurofilament160* beginnt an Stadium 19 HH (Abb. 3.2 und nicht gezeigt (*NF160*)).

Die Expression der noradrenergen Markergene *DBH* und *TH* beginnt kurz nach der Expression von *Phox2a/b* an St. 19 HH (Abb. 3.1, Abb. 3.2 und nicht gezeigt). Zunächst finden sich nur noradrenerge Zellen, cholinerge Marker werden noch nicht exprimiert (Abb. 3.2, St. 19/20). Der relative Anteil der *TH*- bzw. *DBH*-positiven Zellen nimmt bis zum Embryonaltag 5, ca. St. 27-28 HH ab (Abb. 3.2 und nicht gezeigt, vergleiche *DBH* in Relation zu *Phox2b* oder *VACHT*), am Embryonaltag 8 sind kaum noch noradrenerge Zellen im Ciliarganglion zu finden (Abb. 3.2, St. 32/33 HH). In allen untersuchten Stadien exprimiert jeweils nur eine Teilpopulation der *Phox2*-positiven Zellen auch *DBH* oder *TH* (Abb. 3.2).

Die cholinerge Differenzierung wurde anhand dreier verschiedener Gene untersucht, *ChAT*, *VACHT* (Erickson *et al.*, 1994) und *CHT1* (Okuda *et al.*, 2000; Misawa *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2002). Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit der hochaffine Cholintransporter 1 im Huhn kloniert. Mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden wurde per PCR ein Fragment von 435 bp Länge amplifiziert, welches dann mit sequenzspezifischen und degenerierten Oligonukleotiden noch weiter verlängert wurde. Das benutzte Fragment hatte schließlich 1134 bp Länge, die den Basen 426-1559 der humanen Sequenz entsprechen. Das resultierende cDNA-Fragment weist auf Nukleotidebene eine Homologie von 80% und auf Proteinebene eine Homologie von 85% mit der humanen Sequenz auf (Daten nicht gezeigt; EMBL/GenBank/DDBJ Nummer AJ11267). Für alle drei untersuchten Gene beginnt die Expression an Stadium 21 HH, nach der initialen Expression der noradrenergen Markergene *DBH* und *TH* (Abb. 3.2, St. 19/20 HH und St. 24/25 HH). Das Ciliarganglion enthält schließlich am Embryonaltag 8 nur noch einen äußerst geringen Anteil noradrenerger *DBH*- oder *TH*-exprimierender Zellen und setzt sich nahezu ausschließlich aus cholinergen Neuronen zusammen (Abb. 3.2, vergleiche *DBH* an St. 32 HH mit *VACHT*).

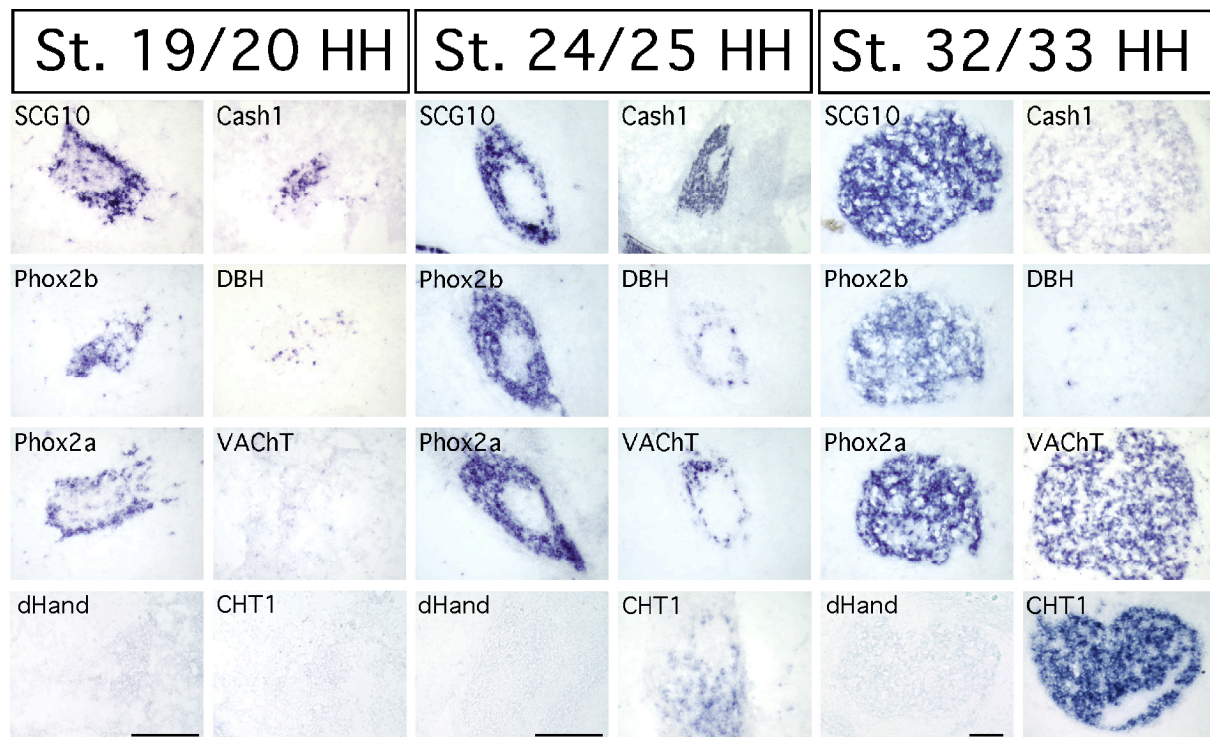


Abb. 3.2 : Expression verschiedener Markergene während der Entwicklung des Ciliarganglions
 Expression pan-neuronaler (*SCG10*), noradrenerger (*DBH*, *TH*) und cholinerges (*VAcHT*, *ChAT*, *CHT1*) Markergene sowie autonomer Transkriptionsfaktoren *Cash1*, *Phox2a*, *Phox2b* und *dHand* am Stadium 19/20 HH (E3), Stadium 24/25 HH (E4,5) sowie Stadium 32/33 HH (E8). An allen untersuchten Stadien ist jeweils nur eine Teilpopulation der *SCG10*-/*Phox2a/b*-positiven Zellen auch positiv für die noradrenergen Markergene *DBH* bzw. *TH*. Das gleiche gilt für die cholinergen Marker *ChAT/VAcHT* sowie *CHT1* an Stadium 19/20 HH bzw. 24/25 HH, wohingegen an Stadium 32/33 HH alle *Phox2a/b*-positiven Zellen cholinerge Marker exprimieren. Längenstandards 100µm.

Sympathische Ganglien und Ciliarganglien weisen eine hohe Ähnlichkeit in der Sequenz der Expression von Transkriptionsfaktoren und neuronaler bzw. subtypspezifischer Differenzierungsgene auf (Abb. 3.3). Die Abwesenheit von *dHand/eHand* sowie die nur transiente Expression von *TH* und *DBH* repräsentieren dabei wesentliche Unterschiede in der Differenzierung von Ciliar- bzw. sympathischen Neuronen.

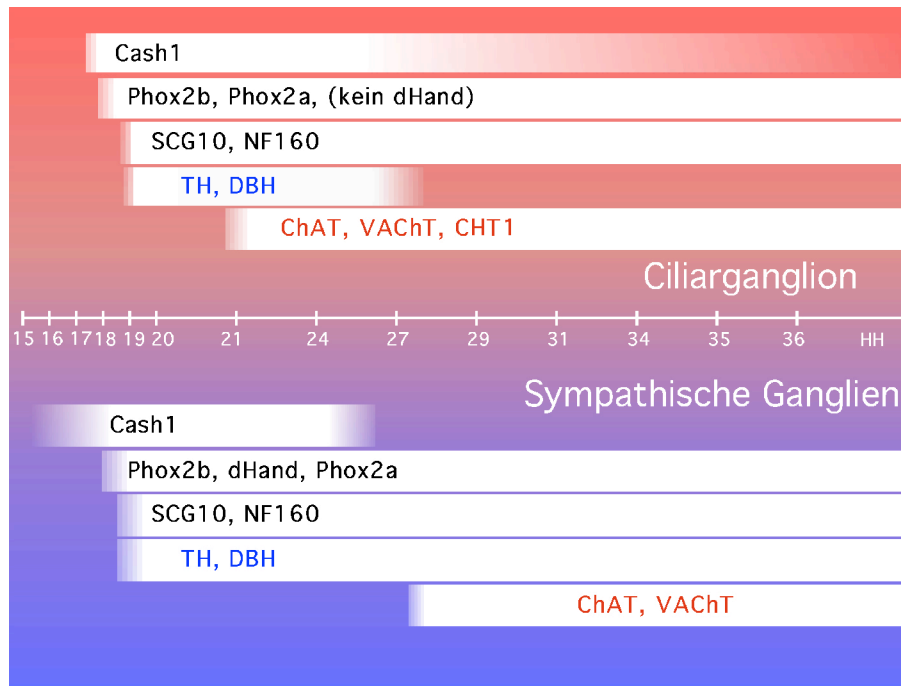


Abb. 3.3: Expression von Transkriptionsfaktoren und spezifischer Markergene Ciliarganglien und sympathische Ganglien zeigen eine ähnliche Abfolge von Transkriptionsfaktoren und subtypspezifischer Gene. Die Expression von *Cash1* wird von der Expression der Transkriptionsfaktoren *Phox2b* und *Phox2a* gefolgt. Im Gegensatz zu den sympathischen Ganglien fehlt in den Ciliarganglien die Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors

dHand. Neuronale (*SCG10*, *NF160*) und noradrenerge (*TH*, *DBH*) Gene werden deutlich vor cholinergen Genen (*ChAT*, *VAcHT*) exprimiert. Im Gegensatz zu den sympathischen Ganglien ist die Expression der noradrenergen Gene im Ciliarganglion nur transient.

3.2 BMPs sind in der Umgebung der entstehenden Ciliarganglien exprimiert

BMPs kontrollieren die Expression von *Cash1* sowie *Phox2a/Phox2b* in den sympathischen Ganglien (Reissmann *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1999). BMP2 und -7 in der Maus bzw. BMP4 und -7 im Huhn werden während der frühen sympathischen Entwicklung in der dorsalen Aorta gebildet, bevor die sympathischen Vorläuferzellen auf ihrer Wanderung an der dorsalen Aorta ankommen. Sie wirken auf die Vorläuferzellen der sympathischen Ganglien und induzieren deren Differenzierung. Gemeinsam mit der hohen Ähnlichkeit in der Expression von Transkriptionsfaktoren, die durch BMP kontrolliert werden, und der Abhängigkeit der Entwicklung des Ciliarganglions von diesen Transkriptionsfaktoren (Hirsch *et al.*, 1998; Pattyn *et al.*, 1997; Pattyn *et al.*, 1999), legt dies die Frage nahe, ob BMPs eine ähnliche Rolle in der Entwicklung des Ciliarganglions einnehmen. Es war daher von Interesse, ob BMPs in der Nähe oder direkt am Ort der Entstehung der sich bildenden Ciliarganglien exprimiert sind. Untersuchungen der Expression von *BMP4*, -5 und -7 an Stadium 18-19 in der retro-orbitalen Region des Auges zeigen *BMP5* und *BMP7* Expression an der Position des sich bildenden Ciliarganglions (Abb. 3.4). *BMP7* ist ebenfalls in der Retina des Auges und in Rathkes Tasche, einer ektodermalen Einstülpung,

aus der später die anterioren Teile der Hypophyse (die Adenohypophyse) entstehen werden (Jacobson *et al.*, 1979; Bellairs und Osmond, 1998), zu sehen (Abb. 3.4). Neben *BMP7* ist *BMP5* in der Retina exprimiert. *BMP5* ist an der Position des Ciliarganglions schwächer exprimiert als *BMP7* (Abb. 3.4). *BMP4* Expression konnte in Rathkes Tasche detektiert werden, jedoch nicht in der Nähe des Ciliarganglions (nicht gezeigt). Das Expressionsniveau von *BMP5* und -7 nimmt zwischen Stadium 18 HH und 20 HH ab (nicht gezeigt).

Von den untersuchten BMPs sind also *BMP5* und -7 zum richtigen Zeitpunkt exprimiert, bevor die Differenzierung des Ciliarganglions mit der Expression von *Cash1* und *Phox2b* an Stadium 18 HH beginnt.

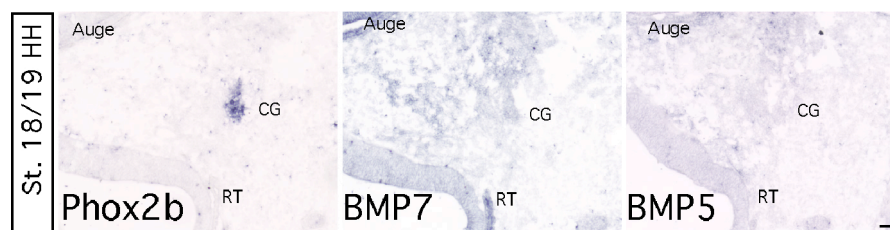


Abb. 3.4: *BMP*-Expression im cranialen Mesenchym. *BMP5* und *BMP7* sind an der Position des sich entwickelnden Ciliarganglions (*Phox2b*-

positiv) exprimiert. *BMP7* ist ebenfalls in Rathkes Tasche und *BMP5* und *BMP7* in der Retina im sich entwickelnden Auge sowie im retroorbitalen Mesenchym exprimiert. Die Expression von *BMP5* ist schwächer als die *BMP7* Expression. CG: Ciliarganglion; RT: Rathkes Tasche. Längenstandard 100 μm .

Das Expressionsmuster von *BMP5* und -7 unterstützt die These, wonach auch die Entwicklung des Ciliarganglions durch BMPs kontrolliert wird. Um zu untersuchen, ob BMP-Signale auch tatsächlich wirksam sind, wurde versucht durch Überexpression von BMPs oder durch Blockierung der BMP-Signale *in vivo* die Entwicklung der Ciliarganglien zu beeinflussen.

3.3 BMPs sind notwendig für die Differenzierung des Ciliarganglions

BMPs spielen eine wichtige Rolle als Signalmoleküle in der sympathischen Differenzierung. Sie kontrollieren die Expression der Transkriptionsfaktoren *Cash1*, *Phox2a/b* und *dHand* und damit direkt oder indirekt die Entwicklung der sympathischen Ganglien. Da sie zum richtigen Zeitpunkt am Ort des sich bildenden Ciliarganglions exprimiert sind, stellt sich die Frage, ob sie eine vergleichbare Rolle in der Differenzierung dieses Ganglions erfüllen. Zunächst soll beantwortet werden, ob BMPs für die Entwicklung des Ciliarganglions essentiell sind. BMPs sind extrazelluläre Signalmoleküle, die spezifisch an transmembrane BMP-Rezeptoren binden. Diese Rezeptoren sind Serin-/Threonin-Kinasen, die ihrerseits intrazelluläre

Signalmoleküle, die rezeptoraktivierten SMADs, phosphorylieren und so deren Translokation in den Zellkern ermöglichen, wo sie die Transkription von Zielgenen modulieren können. Eine Möglichkeit, das BMP-Signal *in vivo* zu unterbinden, besteht darin, die Bindung an die Rezeptoren zu verhindern. Der BMP-Antagonist Noggin bindet an BMP (Zimmerman *et al.*, 1996; Schneider *et al.* 1999; Vogel-Höpker *et al.*, 2002). Der BMP/Noggin-Komplex ist nicht mehr in der Lage, die BMP-Rezeptoren zu binden (Zimmerman *et al.* 1996). Zellsuspensionen Noggin-produzierender CHO-Zellen (Smith und Harland, 1992; Lamb *et al.*, 1993) wurden an Stadium 10/11 HH unilateral in das craniofaciale Mesenchym in die Nähe des prospektiven optischen Nervs injiziert. In Kontrolltieren wurden CHO-Zellen injiziert. Die Embryonen wurden an Stadium 24/25 HH analysiert. Die Injektion von Kontrollzellen hatte keinen Einfluß auf die Entwicklung des Ciliarganglions (in 5 von 6 Tieren; nicht gezeigt). In den mit Noggin behandelten Tieren fehlte im Ciliarganglion in 5 von 6 Fällen die Expression des neuronalen Markergens *SCG10*, der autonomen Marker *Cash1* und *Phox2b* sowie des cholinergen Markers *VACHT* (Abb. 3.5 , A-E). Die Entwicklung der Trigeminalganglien war auf beiden Seiten unbeeinflusst (Abb. 3.5). Das Ciliarganglion auf der nicht behandelten Seite befand sich an der korrekten Position und exprimiert die untersuchten Gene (Abb. 3.5). Um auszuschließen, daß durch die Injektion der CHO-Zellen die Wanderung der Vorläuferzellen des Ciliarganglions beeinflusst wird, wurde die Expression des Neuralleistenmarkers *Sox10* (Kuhlbrodt *et al.*, 1998) analysiert. Ein großes, *Sox10*-positives Zellaggregat an der Stelle, an der sich das Ciliarganglion normalerweise bildet, zeigt an, daß die Wanderung der Zellen und die Aggregation zu Ganglienanlagen unbeeinflusst ist (Abb. 3.5 E, F). Die Existenz *Sox10*-positiver Zellen, die *Cash1*-, *Phox2b*- und *VACHT*-negativ sind (Abb. 3.5) deutet darauf hin, daß die Vorläuferzellen ihr Zielgebiet erreichen, dort aber in Gegenwart des BMP-Inhibitors Noggin nicht differenzieren.

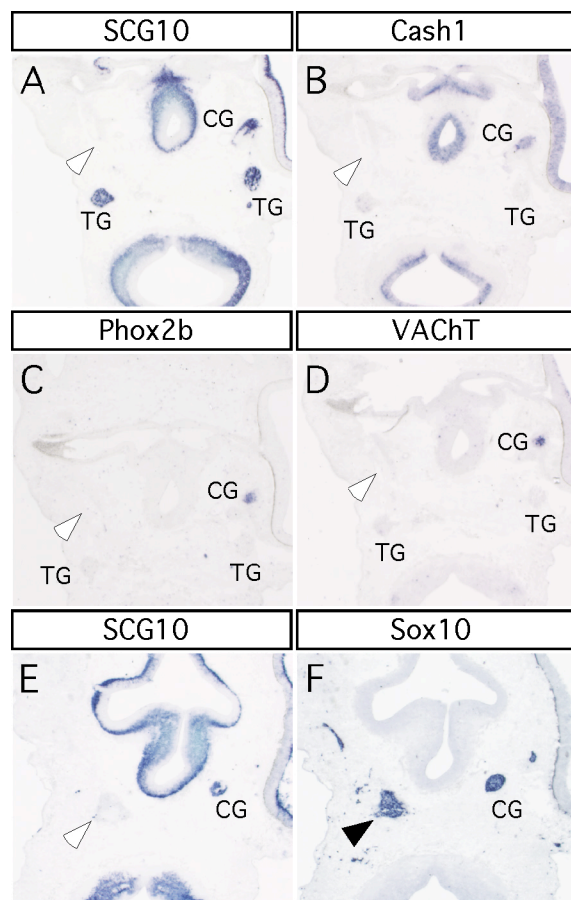


Abb. 3.5 : Die Applikation des BMP-Antagonisten Noggin verhindert die Differenzierung des Ciliarganglions

A-D: Noggin verhindert die Expression neuronaler (*SCG10*), autonomer (*Cash1*, *Phox2b*) sowie cholinerges (*VACHT*) Gene im Ciliarganglion (weiße Pfeilspitzen). Das Ciliarganglion auf der nicht behandelten Seite, die Trigeminalganglien, sowie das Auge auf der nicht behandelten Seite sind nicht betroffen. Auf der behandelten Seite fehlt die Augenanlage weitgehend bis vollständig.

E, F: *Sox10*-positive Zellen an der Position des Ciliarganglions (schwarze Pfeilspitze in F), die negativ für den pan-neuronalen Marker *SCG10* sind (weiße Pfeilspitze in E), belegen, daß die Vorläuferzellen ihr Ziel erreichen, aber in Anwesenheit des BMP-Inhibitors Noggin nicht differenzieren. CG: Ciliarganglion; TG: Trigeminalganglion

BMPs sind ebenfalls an der Augenentwicklung beteiligt. Die *BMP7*-Mutante zeigt einen milden Augenphänotyp, und in der *BMP5*-/*BMP7*-Mutante ist die Entwicklung des Auges massiv beeinflusst (Solloway und Robertson, 1999). In Noggin-behandelten Embryonen war in den meisten Fällen neben dem Effekt auf die Bildung des Ciliarganglions die Entwicklung des Auges auf der behandelten Seite stark gestört (Abb. 3.5). Die Retina des Auges fehlte entweder oder war nur rudimentär vorhanden (Abb. 3.5). Es besteht die Möglichkeit, daß die fehlende Differenzierung der Ciliarganglienzellen indirekt auf die Abwesenheit des Auges zurückzuführen ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Entwicklung des Ciliarganglions nach der Entfernung des Augenbechers an Stadium 10/11 HH untersucht. Die Entfernung der Augenanlage resultierte in der Abwesenheit des Auges auf der operierten Seite (Abb. 3.6). Die Expression der Markergene *SCG10*, *Cash1*, *Phox2b* und *VACHT* wurde im Ciliarganglion an Stadium 24/25 HH untersucht. Auf der operierten Seite wie auf der nicht operierten Seite zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der untersuchten Gene (gezeigt für *SCG10* und *Phox2b*, Abb. 3.6). In einigen Fällen war der okulomotorische Ast des Trigeminalganglions vergrößert (*SCG10*-positive Struktur neben dem Ciliarganglion in Abb. 3.6 A). Die Expression der untersuchten Gene zeigt an, daß die Bildung des Ciliarganglions

durch die Entfernung der Augenanlage unbeeinflusst ist. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein die zeigten, daß das Überleben der Ciliarneuronen bis Embryonaltag 8 nicht vom Vorhandensein der peripheren Zielgebiete abhängt (Landmesser und Pilar, 1974; Lee *et al.*, 2001).

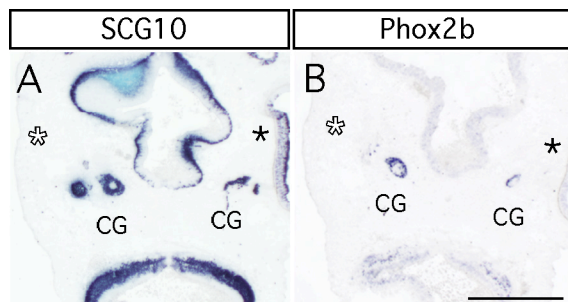


Abb. 3.6: Die Entfernung der Augenanlage hat keinen Einfluß auf die Entwicklung des Ciliarganglions

Trotz fehlender Augenanlage (weißer Stern) zeigen die Zellen des Ciliarganglions das gleiche Expressionsmuster wie auf der nicht operierten Seite (gezeigt für *SCG10* und *Phox2b*). (Weißer Stern: entferntes Auge; schwarzer Stern: nicht operiertes Auge). Längenstandard 1 mm.

3.4 BMP4-Überexpression induziert ektopische cholinerge Neuronen

Die Applikation von Noggin zeigt, daß BMPs für die Differenzierung des Ciliarganglions notwendig sind. Um die Rolle von BMPs in der Differenzierung der Ciliarneuronen weiter zu untersuchen, wurde BMP4 im Ciliarganglion und seiner Umgebung überexprimiert. Für diese Untersuchungen wurde ein retroviraler Vektor, RCAS BP (B), verwendet (Homburger und Fekete, 1996; Duprez *et al.*, 1996; Reissmann *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 2000). Anstelle des viruseigenen Oncogens *src* wurde *BMP4* aus der Maus in den Vektor kloniert (Abb. 3.7).

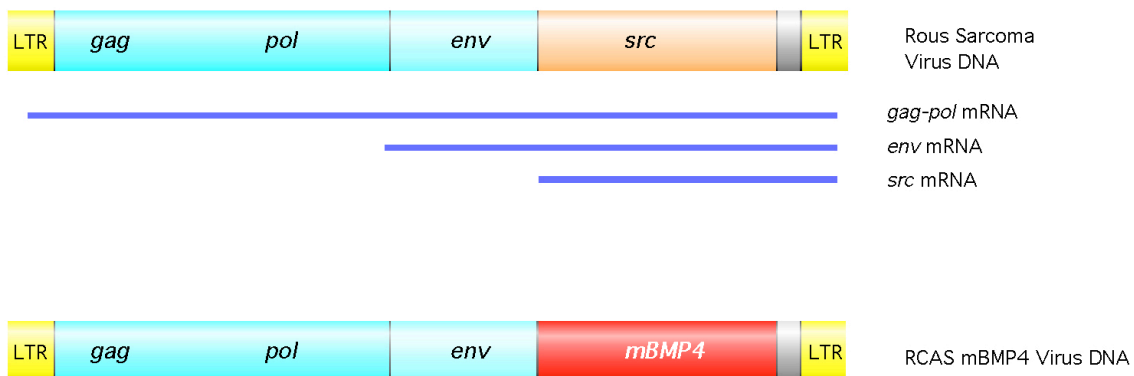


Abb. 3.7 : Replikationskompetente Viren für Transplantationsexperimente

Die RCAS-Virus-DNA kann in Fibroblastenzelllinien aus Vögeln transfiziert werden. Aggregate aus infizierten, virusproduzierenden Zellen werden dann in Hühnerembryonen implantiert. Zellen, die mit dem Virus infiziert sind, produzieren neuen Virus und das virusfremde Protein, in diesem Fall mBMP4.

Die Virus-DNA kann in Zelllinien transfiziert werden und integriert in mitotischen Zellen ins Genom. Infizierte Zellen produzieren einerseits neuen Virus und exprimieren andererseits das inserierte Gen der Wahl, Maus-*BMP4*. Aggregate aus virusproduzierenden Fibroblastenzellen, Chicken Embryonic Fibroblasts (CEF), wurden dann an Stadium 10/11 HH unilateral ins retroorbitale Mesenchym implantiert. Die Embryonen wurden am Embryonaltag 5 analysiert.

Anhand von Färbungen mit dem retroviralen Gen *reverse Transkriptase* können die infizierten Gewebeabschnitte identifiziert werden. Die Implantation resultierte regelmäßig in der Infektion auf einer Seite des Kopfes, mit deutlicher Infektion des Ciliarganglions und des umgebenden Mesenchyms (nicht gezeigt). *In situ*-Hybridisierungen mit *Phox2b* zeigen, daß das Ciliarganglion auf der infizierten Seite deutlich vergrößert ist (Abb. 3.8 a). In 3D-Rekonstruktionen von *Phox2b*-gefärbten Schnittserien zeigen sich ektopische Zellen im okulomotorischen Nerv und in den postganglionären Ciliarnerven (nicht gezeigt). Zudem ist das Ganglion selber vergrößert (Abb. 3.8). Die vergrößerten Ciliarganglien waren aus Zellen zusammengesetzt, welche die gleichen Charakteristika aufwiesen, die in der Normalentwicklung zu finden sind. Ein hoher Anteil der *Phox2b*-positiven Zellen war *ChAT*-positiv, ein kleinerer Anteil *TH*-positiv (Abb. 3.8). Um die Frage zu beantworten, ob durch *BMP4*-Überexpression die noradrenerge Differenzierung der parasymphatischen Ciliarganglien stimuliert wird, wurde die Zahl der *TH*-positiven Zellen/Schnitt auf der infizierten und der nichtinfizierten Seite bestimmt. Auf Parallelschnitten wurde die *ChAT*- bzw. *Phox2b*-positive Fläche bestimmt. Sowohl die Fläche der *Phox2b*- und *ChAT*-positiven Zellen wie auch die Zahl der *TH*-positiven Zellen ist auf der infizierten Seite des Embryos signifikant erhöht (Abb. 3.8 B,C). Setzt man hingegen die *TH*-positiven oder *ChAT*-positiven Zellen in Relation zur Fläche der *Phox2b*-positiven Zellen, d.h. also zur Gesamtfläche des Ciliarganglions, so ist weder der relative *TH*-Anteil noch der relative *ChAT*-Anteil durch die *BMP4*-Überexpression erhöht (Abb. 3.8 D,E). Die Expression von *BMP4* führt also zur Differenzierung der Ciliarvorläufer. Im Gegensatz zu den Vorläuferzellen der sympathischen Ganglien differenzieren die Vorläuferzellen des Ciliarganglions jedoch zu Zellen mit parasymphathischem Phänotyp.

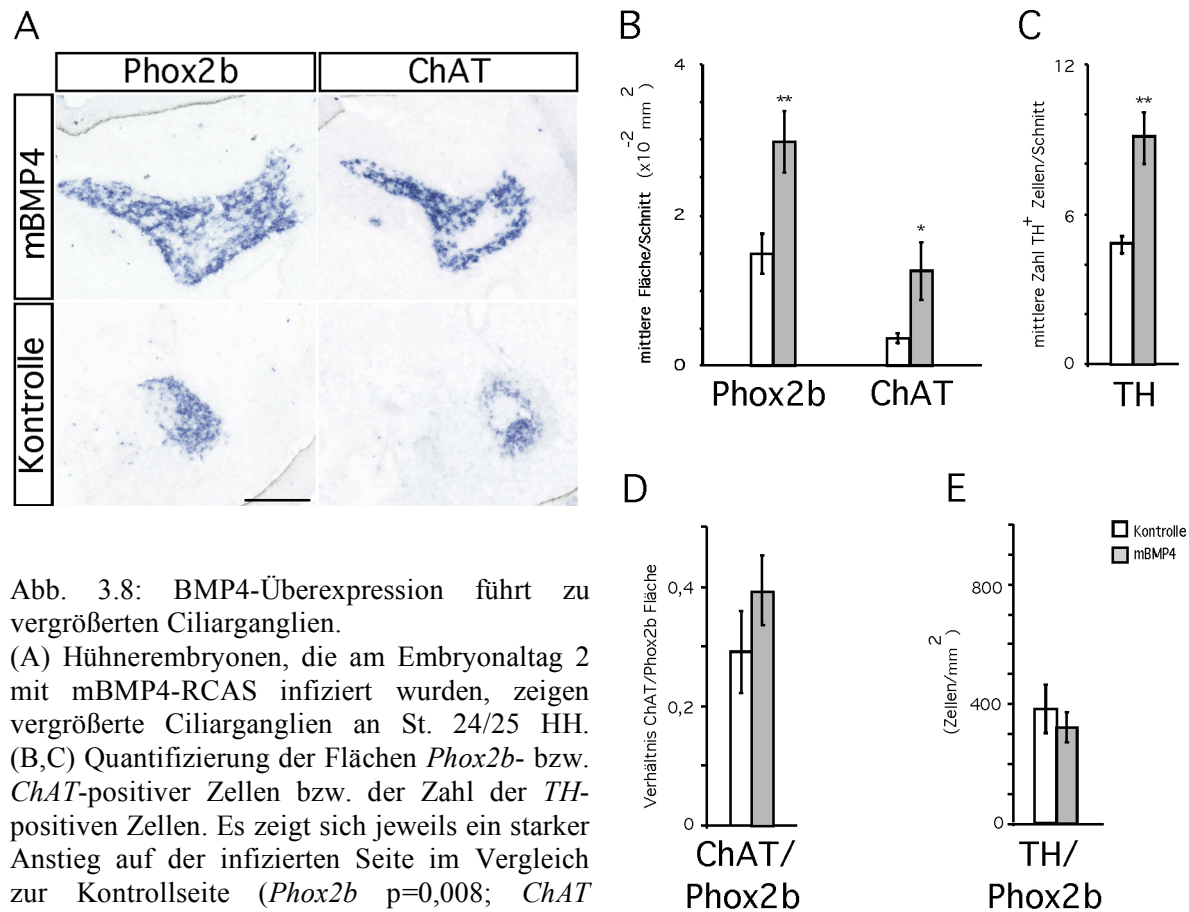


Abb. 3.8: BMP4-Überexpression führt zu vergrößerten Ciliarganglien.

(A) Hühnerembryonen, die am Embryonaltag 2 mit mBMP4-RCAS infiziert wurden, zeigen vergrößerte Ciliarganglien an St. 24/25 HH. (B,C) Quantifizierung der Flächen *Phox2b*- bzw. *ChAT*-positiver Zellen bzw. der Zahl der *TH*-positiven Zellen. Es zeigt sich jeweils ein starker Anstieg auf der infizierten Seite im Vergleich zur Kontrollseite (*Phox2b* $p=0,008$; *ChAT* $p=0,039$; *TH* $p=0,002$; Student's t-Test).

(D,E) Vergleich der Fläche/Zellzahl *ChAT*- bzw. *TH*-positiver Zellen mit der *Phox2b*-positiven Fläche. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der mBMP4-implantierten und der Kontrollseite.

3.5 Transiente Coexpression von noradrenergen und cholinergen Markergenen im parasymphathischen Ciliarganglion

Am Embryonaltag 8 enthält das Ciliarganglion vor allem cholinerge Neuronen. Die Anzahl der Zellen, die für die noradrenergen Markergene *TH* und *DBH* positiv sind, ist verschwindend gering. In früheren Phasen der Entwicklung hingegen exprimieren relativ viele Zellen im Ciliarganglion noradrenerge Gene. Interessanterweise kann zunächst die Expression noradrenerger Gene beobachtet werden, erst später beginnt die Expression cholinergischer Gene (siehe Abb. 3.2). Die Kontrolle dieser frühen noradrenergen Genexpression erfolgt offenbar zumindest zum Teil über dieselben Transkriptionsfaktoren, *Cash1*, *Phox2b* und *Phox2a*, die in den sympathischen Ganglien zu einer permanenten noradrenergen Genexpression führen.

Es stellt sich die Frage, was im Verlauf der Entwicklung der Ciliarganglienzellen zur Abnahme der *TH*- bzw. *DBH*-Expression führt. Zwei Erklärungen bieten sich an:

Es könnte zu einem Verlust der *TH*-/*DBH*-positiven Zellen durch Apoptose kommen oder die Zellen könnten ihren Phänotyp wechseln, d.h. die noradrenerge Genexpression herunter- und die cholinerge Genexpression heraufregulieren. Während die Zahl der Ciliarganglienzellen zwischen E2 und E8 anscheinend konstant ansteigt (Landmesser und Pilar, 1974) gibt es neuere Evidenzen, daß Zelltod in bedeutsamen Maße auftritt und durch Differenzierung von Vorläuferzellen kompensiert wird (Lee *et al.*, 2001).

In Doppel-*in situ*-Hybridisierungen konnten Zellen gezeigt werden, die den noradrenergen Marker *TH* und den cholinergen Marker *VAcHT* coexprimieren (Abb. 3.9). Das Vorhandensein dieser Zellen läßt sich mit einem Phänotypwechsel innerhalb der Entwicklung cholinerg Ciliarneuronen vereinbaren, d.h. mit einem Wechsel von einem noradrenergen zu einem cholinergen Phänotyp.

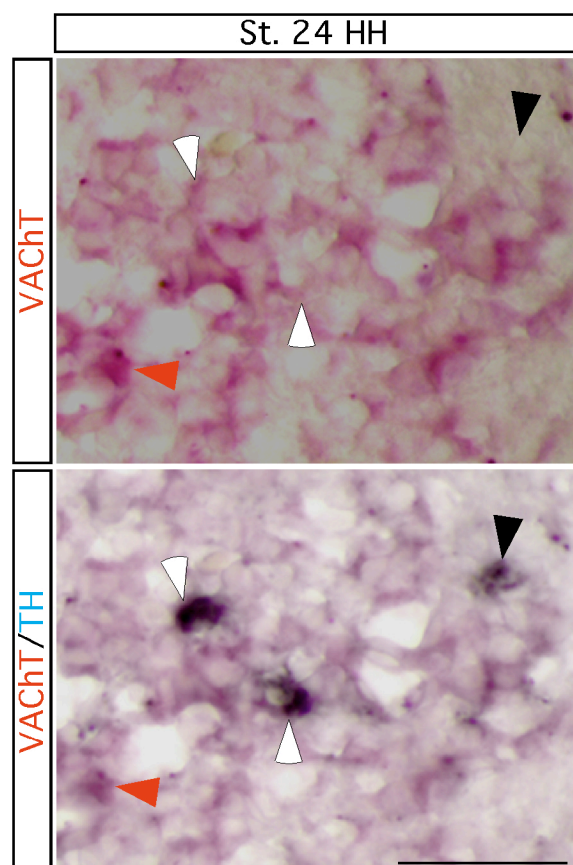


Abb. 3.9: Coexpression cholinerg und noradrenerger Marker im parasympathischen Ciliarganglion

Doppel-*in situ*-Hybridisierung, die rein cholinerge (rote Pfeilspitze; *VAcHT*-Expression), rein noradrenerge (schwarze Pfeilspitze; *TH*-Expression) sowie doppelt positive Zellen zeigt (weiße Pfeilspitzen). Längenstandard 25 μ m

Die relativ geringe Anzahl doppelt-positiver Zellen kann aufgrund der nur transienten *TH*-/*DBH*-Expression und dem graduellen Anstieg der cholinergen Expression erwartet werden. Hinsichtlich der noradrenergen Differenzierung legen diese Daten die Abnahme von *TH* und *DBH* als wesentlichen Unterschied in der Differenzierung ciliarer oder sympathischer Neuronen nahe. Mögliche

Ursachen könnten entweder eine Unterdrückung oder ein Verlust von *TH*-/*DBH*-Expression in den Ciliarneuronen oder eine Erhaltung noradrenerger Genexpression in den sympathischen Neuronen sein.

3.6 Analyse des oberen Cervikalganglions in der Zebrafisch-*dHand*-Mutante "Hands off"/*han*^{s6}

Die differentielle Kontrolle noradrenerger Genexpression setzt Signale voraus, die entweder nur im Ciliarganglion oder nur in den sympathischen Ganglien exprimiert sind. Von den Transkriptionsfaktoren, für die eine direkte oder indirekte Beteiligung an der Kontrolle noradrenerger Genexpression gezeigt wurde, ist nur *dHand* selektiv in den sympathischen Ganglien exprimiert (Howard *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000; Abb. 3.2), wohingegen *Phox2a*, *Phox2b* und *Cash1* in sympathischen und parasymphatischen Ganglien exprimierte Transkriptionsfaktoren sind. In den sympathischen Ganglien ist *dHand* gemeinsam mit Phox2-Transkriptionsfaktoren ab Embryonaltag 3 vor der Expression noradrenerger Gene exprimiert. Es könnte somit in der späteren Regulation der *TH*-/*DBH*-Expression eine Rolle spielen. Die Abwesenheit von *dHand* im Ciliarganglion könnte erklären, warum *TH* und *DBH* nur transient exprimiert werden.

Um die Funktion des *dHand*-Gens in der noradrenergen Differenzierung zu untersuchen, kann man die Expression des Gens entweder ausschalten oder das Gen verstärkt oder an ektopischer Position anschalten. Es existiert ein *dHand*-Knockout in der Maus, bei der das Gen inaktiviert wurde (Srivastava *et al.*, 1997). *dHand* ist im autonomen Nervensystem sowie im Herzen, dem Deciduum und anderen Geweben, die von der Neuralleiste abstammen, exprimiert. Der Knockout zeigt unter anderem einen Herzphänotyp, der an E 10.5 letal wirkt (Srivastava *et al.*, 1997). Die Vorläuferzellen der sympathischen Ganglien erreichen ihr Zielgebiet, die dorsale Aorta, an E 10 und beginnen danach zu noradrenergen Zellen zu differenzieren. Aufgrund dessen, daß die Mutante zum Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung der sympathischen Ganglien stirbt, eignet sie sich leider nicht dazu, die Auswirkung von *dHand* auf die Expression noradrenerger Gene zu untersuchen. Ein anderes System, in dem die Untersuchung der sympathischen Entwicklung möglich ist, ist der Zebrafisch *Danio rerio*, von dem die Nullmutante "hands off"/*han*^{s6} existiert (Yelon *et al.*, 2000). Auch die *han*^{s6}-Mutante ist in der Entwicklung des Herzens und der Extremitätenbildung beeinträchtigt. Im Gegensatz zur Maus entwickeln sich jedoch die Zebrafische bis Embryonaltag 4 so weit, daß die Entwicklung des sympathischen Nervensystems untersucht werden kann. Im Zebrafisch sind die ersten sympathischen Neuronen am zweiten Tag nach der Befruchtung (2 dpf) nachzuweisen (An *et al.*, 2002). Es können zwei Gruppen von sympathischen Neuronen unterschieden werden: cervikale

sympathische, die sich rostral etwa auf Höhe der ersten 6 Somiten befinden und die sympathischen Ganglien im Rumpf, die sich mehr caudal befinden (An *et al.*, 2002).

In Whole-Mount-*In situ*-Hybridisierungen an zwei bzw. drei Tage alten Zebrafisch-Embryonen wurde im Wildtyp und in der Mutante die Expression von *dHand*, *Phox2a* und *Phox2b* sowie *TH* und *DBH* untersucht. Zur besseren Analyse der Expression wurde nach der Farbreaktion der Dottter, der Schwanz und der dorsale Bereich des Kopfes mit Gehirn und Teilen des Rückenmarks entfernt. Der Rumpf mit den sympathischen Ganglien wurde am Mikroskop analysiert, das entfernte Gewebe für eine Genotypisierung mittels PCR verwendet (Abb. 3.10). In der Mutante fehlen ca. 100 kb inclusive des Genlocus für *dHand*. Die Anwesenheit einer PCR-Bande zeigt also die Existenz mindestens eines *dHand*-Allels an, so daß zwischen Wildtyp oder heterozygoten Tieren einerseits und der Mutante andererseits unterschieden werden kann.

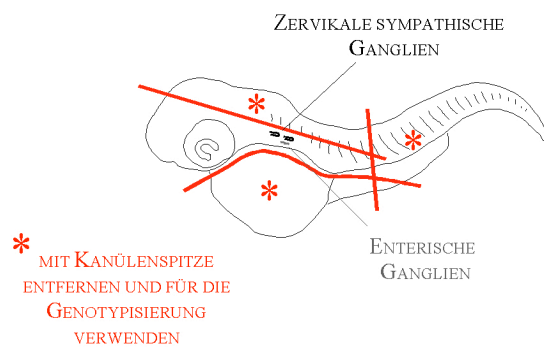


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Zebrafischpräparation

Die mit einem Stern markierten Bereiche in zwei bzw. drei Tage alten Embryonen wurden mit einer Kanülenspitze am Binokular entfernt und für die Genotypisierung verwendet. Der Rumpf mit den sympathischen und enterischen Ganglien wurde von dorsal am Mikroskop fotografiert.

dHand ist in zwei Tage alten sowie drei Tage alten Embryonen in den sympathischen Ganglien exprimiert (Abb. 3.11 und nicht gezeigt). In der Mutante ist wie zu erwarten keine *dHand*-Expression zu finden. Die *dHand*-Expression im Herz, in den Kiemenbögen, den Flossenanlagen sowie den Vorläufern des enterischen Nervensystems (Abb. 3.11 und nicht gezeigt) fehlt in der Mutante ebenfalls.

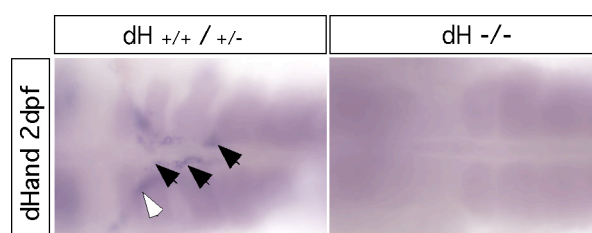


Abb. 3.11: *dHand*-Expression in den sympathischen Ganglien in Zebrafischen

In zwei Tage alten Zebrafisch-Embryonen ist *dHand* in den cervikalen sympathischen Ganglien (schwarze Pfeilspitzen) sowie den enterischen Ganglien (weiße Pfeilspitze) exprimiert. Der Genotyp der Fische wurde mittels PCR bestimmt, wobei nicht zwischen homozygot Wildtyp und

heterozygoten Fischen unterschieden werden kann. In der Nullmutante "Hands off"/*han*⁸⁶ fehlt die Expression von *dHand*.

In den sympathischen Ganglien im Huhn beginnt die Expression von *dHand* nach der Expression von *Phox2b* und vor der Expression von *Phox2a* (Howard *et al.*, 2000; Tsarovina *et al.*, 2004). Es war daher von Interesse, die Auswirkung der Nullmutante auf die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Darüberhinaus wurde untersucht, ob *dHand* für die Expression der noradrenergen Gene *DBH* und *TH* notwendig ist.

Phox2b ist im Zebrafisch in den sympathischen Ganglien am Embryonaltag zwei bis zum vierten Somiten exprimiert. Die Expression erscheint je nach Individuum gleichmäßig in mehreren kleinen Gruppen verteilt oder in zwei größeren Gruppen konzentriert (Abb. 3.12 A). Die Zahl der *Phox2b*-positiven Zellen variiert ebenfalls von Individuum zu Individuum (nicht gezeigt). Die Zellen des enterischen Nervensystems liegen lateral und ventral von den sympathischen Zellen und exprimieren ebenfalls *Phox2b*. Am Embryonaltag drei haben sich zwei größere Gruppen von *Phox2b* exprimierenden Zellen herausgebildet, die sich zwischen dem ersten und zweiten bzw. dem dritten und dem vierten Somiten befinden (Abb. 3.12 B). Zusätzlich sind einzelne Zellen oder kleine Gruppen von Zellen bis zum sechsten Somiten zu finden (Abb. 3.12 B). In der Mutante ist am Embryonaltag zwei keine Veränderung der *Phox2b*-Expression in den sympathischen oder den enterischen Zellen zu finden (Abb. 3.12 A). Auch am Embryonaltag drei scheint die Zahl der sympathischen Zellen unverändert. Die Trennung der Zellen in zwei klare Gruppen scheint leicht gestört, so daß sie entweder in drei etwas kleineren Gruppen oder als kontinuierlicher Streifen von Zellen erscheinen (Abb. 3.12 B). Hinsichtlich der enterischen Zellen ist ebenfalls keine signifikante Veränderung zu erkennen.

Die *Phox2a*-Expression am Embryonaltag zwei und drei entspricht im Wildtyp der Expression von *Phox2b*. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der *Phox2a* exprimierenden sympathischen Zellen in der Mutante am Tag zwei leicht reduziert (Abb. 3.12 A). Am Tag drei ist in der vorderen Gruppe von Zellen an Somit eins bis zwei keine oder nur eine leichte Reduktion zu erkennen. Die hintere Gruppe von Zellen an Somit drei bis vier ist deutlich reduziert (Abb. 3.12 B). In Bezug auf die enterischen Zellen ist kein klarer Effekt offensichtlich.

Die Analyse der Expression der *Phox2*-Transkriptionsfaktoren zeigte sehr geringe Effekte bei *Phox2b* und einen etwas stärkeren Phänotyp bei *Phox2a*. Diese Beobachtung paßt dazu, daß im Wildtyp die Expression von *dHand* vor *Phox2a* und nach *Phox2b* beginnt (Howard *et al.*,

2000; Tsarovina et al., 2004). Die Anwesenheit der *Phox2b*-positiven Zellen deutet darauf hin, daß es sich eher um ein Differenzierungsphänomen handelt, bei dem das Überleben der Zellen nicht betroffen ist.

Die Expression von *DBH* ist in zwei Tage alten Zebrafischembryonen in fünf bis sechs Gruppen von Zellen im Bereich des ersten bis zum fünften Somiten, mit z. T. asymmetrischer Verteilung der Gruppen auf der linken bzw. rechten Seite des Notochords nachzuweisen (Abb. 3.12 A). Dabei scheint die Expression von *DBH* auf Höhe der Somiten drei und vier zu beginnen. In einzelnen Embryonen ist zu beobachten, daß sich nur auf Höhe dieser Somiten *DBH*-positive Zellen befinden, während keine Tiere auftraten, in denen nur die vorderen Gruppen an Somit eins und zwei *DBH* exprimierten (nicht gezeigt). Die enterischen Zellen exprimieren kein *DBH*. In der Mutante zeigte sich eine sehr starke Reduktion der *DBH* Expression in den sympathischen Zellen. Z. T. waren keine, z. T. drei bis vier einzelne Zellen zu beobachten (Abb. 3.12 A und nicht gezeigt).

In drei Tage alten Embryonen haben sich zwei klare Gruppen *DBH*-positiver Zellen an Somit eins bis zwei bzw. drei bis vier gebildet. Zusätzlich gibt es vereinzelte Zellen oder kleine Grüppchen bis hin zu Somit sechs (Abb. 3.12 B; vergleiche mit *Phox2a/b*). In der Mutante ist die Zahl der *DBH*-positiven Zellen drastisch reduziert. Je nach Individuum fehlt die Expression in den sympathischen Zellen vollständig oder ist auf wenige einzelne Zellen reduziert (Abb. 3.12 B).

Die *TH*-Expression ist der *DBH* Expression sehr ähnlich. Sie beginnt am Tag zwei in mehreren kleinen Gruppen *TH*-positiver Zellen im Bereich der ersten fünf Somiten, wobei die Expression auf Höhe der Somiten drei und vier beginnt (Abb. 3.12 A und nicht gezeigt).

Am Tag drei haben sich zwei Gruppen an den Somiten eins bis zwei bzw. drei bis vier herausgebildet (Abb. 3.12 B). In der Mutante ist die Expression von *TH* deutlich reduziert, so daß am Tag drei z. T. keine, z. T. sehr wenige *TH*-positive sympathische Zellen zu finden sind (Abb. 3.12 B). Die Existenz von *Phox2b*-positiven Zellen zeigt, daß der Verlust an *TH*- bzw. *DBH*-Expression nicht auf das Fehlen der Vorläuferzellen zurückzuführen ist.

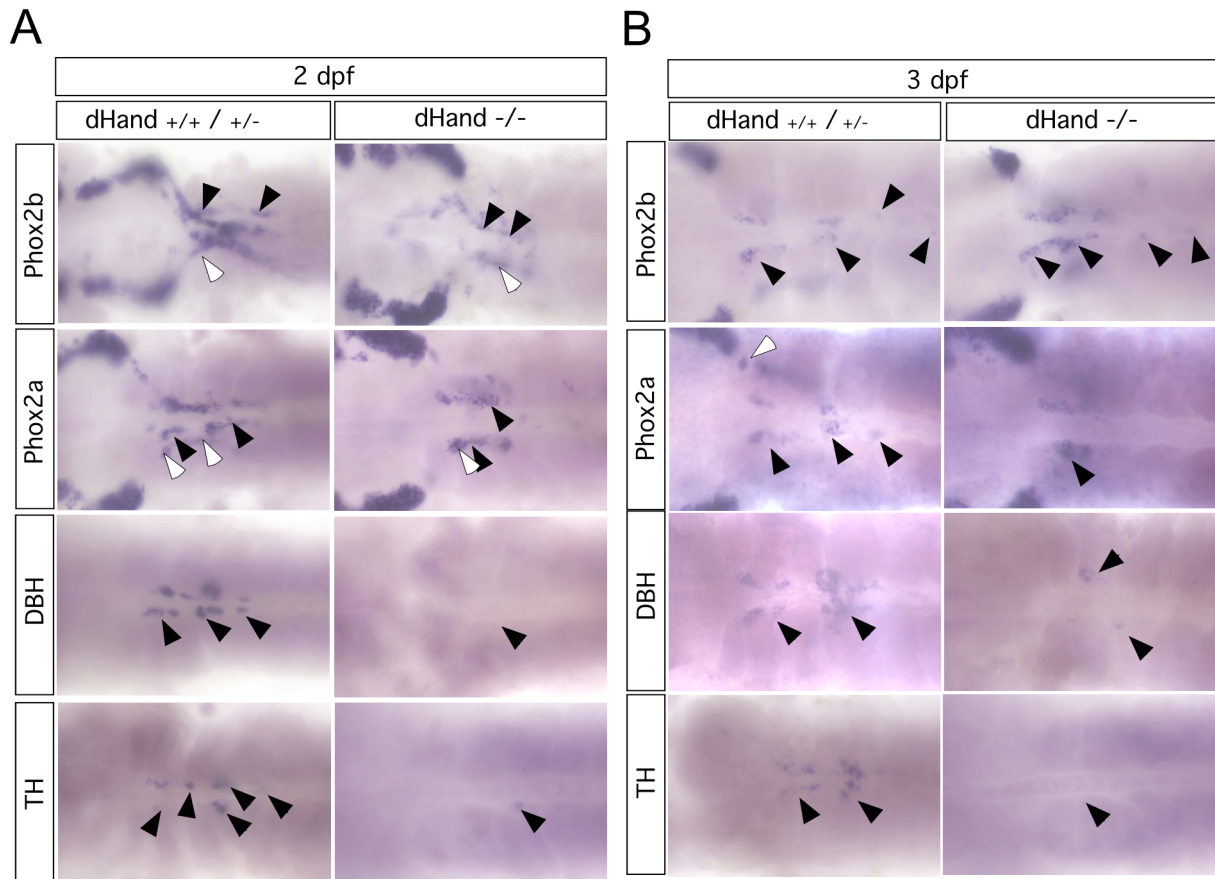


Abb. 3.12 : dHand ist notwendig für die Expression von *Phox2a*, *DBH* und *TH*

(A) In zwei Tage alten Zebrafischembryonen sind die cervikalen sympathischen Neuronen zwischen dem ersten und dem sechsten Somiten differenziert, d.h. sie exprimieren die autonomen Transkriptionsfaktoren *Phox2a* und *Phox2b* sowie die noradrenergen Markergene *TH* und *DBH*. In der *dHand*-Mutante ist die Zahl der *Phox2a*-exprimierenden Zellen leicht reduziert, während der Anteil der *Phox2b*-positiven Zellen keine Veränderung zeigt. Obwohl die Zellen *Phox2b* und *Phox2a* exprimieren, ist die Expression von *DBH* und *TH* nahezu verschwunden.

(B) In drei Tage alten Embryonen haben sich zwei große und mehrere kleine Gruppen von sympathischen Zellen gebildet. Die größte Gruppe befindet sich auf Höhe des vierten Somiten, die zweite größere Gruppe auf Höhe des ersten und zweiten Somiten. Dahinter, bis etwa zum sechsten Somiten befinden sich weitere *Phox2a/b*- bzw. *DBH*- und *TH*-positive Zellen. In der Mutante exprimiert nur die vordere Gruppe von Zellen *Phox2a*. *Phox2b*-positive Zellen sind bis zum sechsten Somiten zu finden, lediglich die klare Trennung in zwei rostrale Gruppen ist eingeschränkt. Die Expression von *DBH* und *TH* ist drastisch reduziert. Die enterischen Neuronen liegen in drei Tage alten Embryonen mehr lateral als in zwei Tage alten Embryonen. Schwarze Pfeilspitzen: sympathische Neuronen; weiße Pfeilspitzen: enterische Neuronen.

3.7 Die Expression von dHand erhöht die Anzahl noradrenerger Zellen im Ciliarganglion

Nachdem in der Zebrafischmutante die Frage untersucht wurde, ob dHand für die noradrenerge Differenzierung notwendig ist, sollte untersucht werden, ob die Expression dieses Transkriptionsfaktors auch hinreichend ist, noradrenerge Differenzierung zu induzieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese bietet sich das Ciliarganglion des Huhnembryos an, bei dem die autonomen Transkriptionsfaktoren *Cash1* und *Phox2* exprimiert werden und die Abwesenheit von *dHand* mit der nur transienten *TH*/*DBH*-Expression korreliert.

dHand wurde deshalb im parasymphatischen Ciliarganglion exprimiert. Dazu wurde ein RCAS BP (B) retroviraler Vektor verwendet, bei dem das *src*-Gen des Virus gegen Huhn-*dHand* ausgetauscht ist (Howard et al., 2000). Zellaggregate virusproduzierender Zellen oder Viruskonzentrat wurde an Stadium 10/11 HH ins retroorbitale Mesenchym in Huhnembryonen implantiert. Die Analyse der Expression von *reverser Transkriptase*, *Phox2b*, *TH* und *DBH* erfolgte am Embryonaltag 8 auf Kryostatschnitten.

Nach dHand-Expression konnte in den infizierten Bereichen ein starker Anstieg der Zahl der *TH*- bzw. *DBH*-positiven Zellen beobachtet werden (Abb. 3.13 A und nicht gezeigt). Um den Effekt zu quantifizieren, wurde die Zahl der *TH*-positiven Zellen in Relation zur *Phox2b*-positiven Fläche auf Parallelschnitten in den infizierten Ganglien bzw. der nichtinfizierten kontralateralen Seite bestimmt (Abb. 3.13 B). Der Anstieg in der Proportion der *TH*-positiven Zellen bewegte sich zwischen 1,4-fach bis 12-fach mit einem Mittelwert von 2,6-fach, was eine unterschiedlich starke Infektion der Ganglien in unterschiedlichen Tieren widerspiegeln könnte. Im Gegensatz zum umgebenden Mesenchym war das Ciliarganglion jeweils nur teilweise infiziert. Das könnte dadurch erklärt werden, daß ein Teil der Ciliarvorläufer früh zu Ciliarneuronen differenzieren, die als postmitotische Zellen nicht infiziert werden können. Die dHand-Überexpression führte in keinem Fall dazu, daß alle *Phox2*-positiven Zellen auch *TH* oder *DBH* exprimierten.

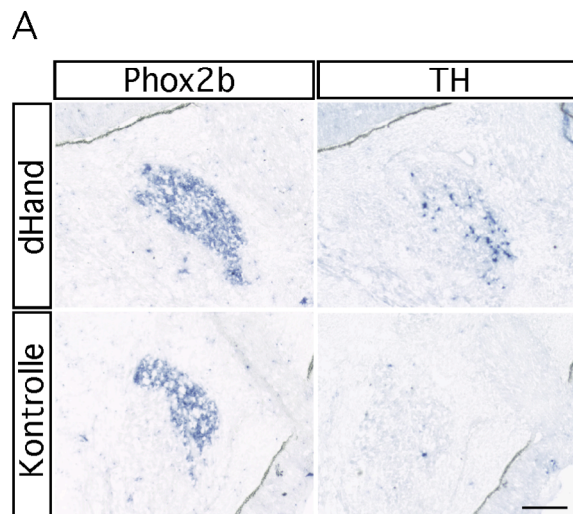
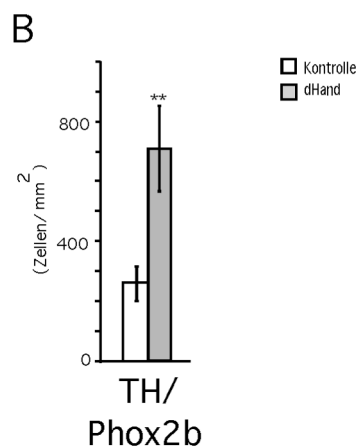


Abb. 3.13 : Erhöhte Anzahl *TH*-positiver Zellen im Ciliarganglion nach *dHand*-Überexpression (A) Embryos, die am Embryonaltag 2 mit *dHand*-RCAS-Virus infiziert wurden, zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl *TH*-positiver Zellen am Embryonaltag 8. Die *Phox2b*-bzw. *TH*-Färbungen wurden auf Parallelschnitten angefertigt.

(B) Die Quantifizierung der *TH*-positiven Zellen relativ zur Fläche der Ciliarganglien (*Phox2b*-positive Fläche) zeigt einen starken Anstieg im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrollseite ($P=0,009$, Student's T-Test). Längenstandard 100 μm



3.8 BMP4 induziert *dHand* im cranialen Ciliarganglion

BMP4 induziert ektopische Neuronen mit sympathischem Phänotyp, wenn es im Rumpf überexprimiert wird (Reissmann et al., 1996). Diese Zellen exprimieren ebenfalls *dHand* (Howard et al., 2000). Wird BMP4 im cranialen Mesenchym und Ciliarganglion überexprimiert, werden Neuronen mit Ciliarganglienphänotyp induziert, die *Phox2b*, *ChAT* und/oder z.T. *TH/DBH* exprimieren, wobei die Relation von *Phox2b*-positiven Zellen zu *ChAT*-positiven Zellen oder zu *TH*-positiven Zellen in infizierten Bereichen keinen Unterschied zur Relation in nicht infizierten Ciliarganglien aufweist. Weiterhin wurde gezeigt, daß *dHand* im sympathischen Ganglion exprimiert wird, im Ciliarganglion hingegen nicht. Wird *dHand* ektopisch überexprimiert, führt dies im Ciliarganglion zur Induktion *TH*-positiver Neuronen (diese Arbeit). Es war daher interessant zu untersuchen, ob *dHand* auch im cranialen, parasympathischen Ciliarganglion durch BMPs induziert werden kann. Dazu wurde auf Schnitten von Huhn-Embryonen, die mit mBMP4-RCAS infiziert wurden, *in situ*-

Hybridisierungen durchgeführt. Färbungen mit der *retroviralen Transkriptase* zeigten eine Infektion im Ciliarganglion, in den Ciliarnerven und im umgebenden Mesenchym (Abb. 3.14). An Stadium 24/25 HH finden sich ektopische *Phox2b*-positive Zellen im Ciliarganglion und im Ciliarnerven. Ein Teil dieser Zellen ist *dHand*-positiv. Nur ein Teil dieser Zellen wiederum ist *TH*-positiv, während der größere Teil cholinerge Marker exprimiert (Abb. 3.14). Das Ergebnis ist insofern überraschend, als daß durch BMP4 induzierte *dHand*-Expression im Gegensatz zu *dHand*-RCAS-Expression nicht ausreicht, den Anteil noradrenerger Zellen im Ciliarganglion zu erhöhen. Dies könnte darauf hindeuten, daß ein gewisser Schwellenwert von *dHand* erreicht werden muß.

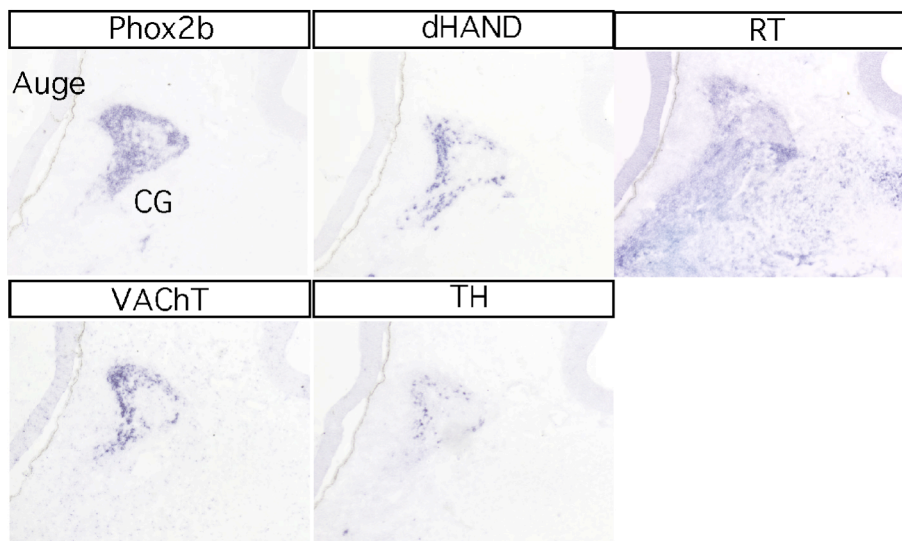


Abb. 3.14: BMP4 induziert *dHand*-Expression im Ciliarganglion. Die *reverse Transkriptase* (*RT*) zeigt den infizierten Bereich im Ciliarganglion und im cranialen Mesenchym. *dHand*-positive Zellen sind im Ciliarganglion und in Ciliarnerven zu finden. Das Verhältnis von *Phox2b* zu cholinergen Zellen und zu

adrenergen Zellen ist im Verhältnis zur Kontrollseite nicht verändert. Nur ein Teil der *dHand*-positiven Zellen ist auch *TH*-positiv.

4 Diskussion

4.1 Expression von Kontroll- und Markergenen im parasympathischen Ciliarganglion

In früheren Arbeiten ist gezeigt worden, daß die Entwicklung des parasympathischen Ciliarganglions von der Expression von Mash1-/Cash1- und Phox2-Transkriptionsfaktoren abhängig ist. Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren ist zudem notwendig und ausreichend für die Bildung noradrenerger sympathischer Neuronen (Guillemot *et al.*, 1993; Lo *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1999; Hirsch *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1997; Pattyn *et al.*, 1999; Stanke *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000).

Die Analyse des Expressionsbeginns von Transkriptionsfaktoren und subtypspezifischer Gene im Ciliarganglion ergab eine ähnliche Situation, wie sie in den sympathischen Ganglien zu finden ist. Wie in den sympathischen Ganglien erfolgt die Expression von *Cash1* vor der Expression von *Phox2b* und *Phox2a*. Die Expression von *Cash1* ist zunächst stark, um im Verlauf der Differenzierung abzunehmen. Während in den sympathischen Ganglien die Expression von *Cash1* ab Embryonaltag 4 nicht mehr nachzuweisen ist, bleibt sie im Ciliarganglion schwach bis mindestens zum Embryonaltag 8 erhalten. Die Expression von *Phox2a/b* ist in allen untersuchten Stadien nach Expressionsbeginn gleichbleibend stark. Der bHLH-Transkriptionsfaktor *dHand* ist im Ciliarganglion im Gegensatz zu den sympathischen Ganglien zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nachzuweisen.

Die hohe Ähnlichkeit im Expressionsmuster setzt sich fort in der Expression subtypspezifischer Gene. Wie im sympathischen Ganglion folgt auf die Expression von *Phox2*-Transkriptionsfaktoren die Expression der neuronalen Gene *SCG10* und *NF160* sowie der noradrenergen Gene *TH* und *DBH* an Stadium 18/19 HH. Erst mit deutlichem zeitlichen Abstand, an Stadium 21 HH, erfolgt die Expression der cholinergen Gene *ChAT*, *VACHT* und *CHT1*. Während allerdings in den sympathischen Ganglien die Mehrzahl der Neuronen den noradrenergen Phänotyp entwickelt und aufrechterhält, ist die Expression noradrenerger Gene in den Ciliarganglien nur transient, so daß nur in einem äußerst geringen Anteil der Zellen die Expression von *TH* und *DBH* bis zum Embryonaltag 8 erhalten bleibt (Abb. 3.3).

In früheren Studien konnte mit einem monoklonalen Antikörper eine Teilpopulation der mesencephalen Neuralleiste identifiziert werden. Der gleiche Antikörper erkannte *in vitro* und *in vivo* embryonale Ciliarganglienzellen, so daß theoretisch die Möglichkeit bestand, Ciliarvorläufer schon während der Wanderung zu identifizieren und gegebenenfalls zu

isolieren. Das erkannte Zelloberflächenantigen war mit der hochaffinen Cholinaufnahme assoziiert (Barald 1988a; Barald 1988b; Barald 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der hochaffine Cholintransporter *CHT1* im Huhn kloniert. Die Expression von *CHT1* (Okuda *et al.*, 2000; Misawa *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2002) beginnt jedoch im Huhn zusammen mit der Expression von *ChAT* und *VACHT* nach Anlage der Ciliarganglien und nachdem bereits neuronale und noradrenerge Gene exprimiert werden. Obwohl also nicht ausgeschlossen ist, daß die Ciliarvorläuferzellen bereits früher spezifiziert werden, kann *CHT1* als Marker für wandernde Vorläufer ciliarer Neuronen ausgeschlossen werden.

4.2 Die Rolle von BMPs in der Entwicklung der parasympathischen Ciliarganglien

BMPs, die in der dorsalen Aorta exprimiert werden, kontrollieren in den Vorläufern der sympathischen Ganglien die Expression der regulatorischen Gene *Mash1/Cash1*, *Phox2a/b* und *dHand*, die gemeinsam die neuronale und subtypspezifische Differenzierung steuern. Wesentliche Mitglieder dieser regulatorischen Genkaskade werden im Ciliarganglion in der gleichen Reihenfolge exprimiert wie in den sympathischen Ganglien, und auch neuronale, noradrenerge und cholinerge Gene werden in der gleichen zeitlichen Abfolge exprimiert. Weiterhin ist die Entwicklung des Ciliarganglions von *Mash1/Cash1* und *Phox2*-Transkriptionsfaktoren abhängig. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die Entwicklung des Ciliarganglions ebenfalls durch BMPs kontrolliert ist.

4.2.1 Die Differenzierung der Ciliarvorläuferzellen ist BMP-abhängig

Welche BMPs kommen für eine mögliche Kontrolle der Entwicklung der Ciliarganglien in Frage? *BMP4*-Expression wurde in Rathkes Tasche und in der Retina der Augenanlage gefunden. *BMP5*- und *BMP7*-Expression wurde an Stadium 18/19 HH in Rathkes Tasche und im Mesenchym in der Umgebung der Anlage des Ciliarganglions detektiert. BMP-Signalmoleküle müssen vom Ort ihrer Bildung zum Wirkungsort gelangen. Es gibt Befunde, die auf eine nur sehr geringe Diffusionsfähigkeit der BMPs hinweisen (Jones *et al.*, 1996; Ohkawara *et al.*, 2002). Während somit die Expression in Rathkes Tasche zu weit vom Entstehungsort der Ciliarganglien entfernt scheint, um eine Quelle von BMP für die undifferenzierten Vorläuferzellen zu sein, ist *BMP7* an Stadium 18/19 HH an der Position exprimiert, an der sich das Ciliarganglion bildet (Luo *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995) und könnte in die Entwicklung des Ciliarganglions involviert sein. Auch *BMP5*, obwohl

schwächer exprimiert als *BMP7*, ist zum richtigen Zeitpunkt an der richtigen Stelle exprimiert. *BMP5* und *BMP7* kommen somit als Kandidaten für ein differenzierendes Signal in Frage. Es muß auch bedacht werden, daß die Vorläuferzellen während der Migration zu ihrem Zielort nicht identifizierte BMP-Signale erfahren könnten. Diese Signale könnten permissiv sein, würden jedoch alleine nicht ausreichen oder zu früh exprimiert sein, um die Differenzierung der Ciliarvorläufer auszulösen.

Die Frage, ob BMPs für die Entwicklung der Ciliarganglien essentiell sind, kann dadurch beantwortet werden, daß man mit ihrer Signalwirkung interferiert. Wird der BMP-Inhibitor Noggin (Zimmerman *et al.*, 1996) in der Nähe der dorsalen Aorta appliziert, so unterbleibt die Differenzierung der sympathischen Ganglien (Schneider *et al.*, 1999). Die Expression von Noggin im retroorbitalen Mesenchym, und damit die Blockierung des BMP-Signals für die Ciliarvorläuferzellen, resultierte im vollständigen Verlust differenzierter Ciliarneuronen. Dieser Befund deutet sehr stark darauf hin, daß die Ciliarvorläufer auf die Anwesenheit eines BMP-Signals angewiesen sind. An der Stelle, an der sich normalerweise das Ciliarganglion bilden würde, fand sich ein Aggregat *Sox10*-positiver Zellen, was zeigt, daß die Wanderung der Neuralleistenzellen und die Ausbildung der primären Ganglienanlagen nicht beeinflusst ist.

Die Implantation Noggin-produzierender CHO-Zellen beeinflusste nicht nur die Differenzierung der Ciliarvorläufer, sondern ebenfalls die Entwicklung des Auges. Kontrollembryos, die nur CHO-Zellen erhielten, wiesen normal große Augen und normal differenzierte Ciliarganglien auf. Die für die Entwicklung des Ciliarganglions wichtigen Signale könnten also auch aus dem Auge kommen. In der Retina des Auges werden beispielsweise FGFs und BMPs exprimiert (Vogel-Höpker *et al.*, 2000; Vogel-Höpker und Rohrer, 2002). Es wäre möglich, daß die Effekte auf die Entwicklung des Ciliarganglions indirekte Effekte sind, die dadurch entstehen, daß die Applikation von Noggin die Bildung von eigentlich signalgebenden Strukturen im Auge verhindert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Huhnembryonen am Embryonaltag 2, vor dem Beginn der Migration der Neuralleistenzellen (Hammond und Yntema, 1957; Noden 1975; Noden 1978a; Noden 1978b; Lee *et al.*, 2003), einseitig die Augenanlage entfernt. Das Auge in den so behandelten Tieren fehlte vollständig. Dennoch zeigte das Ciliarganglion keine Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und dem Expressionsmuster der untersuchten Gene. Frühere Untersuchungen zeigten bereits die morphologisch korrekte Bildung eines Ciliarganglions nach Entfernung der Augenanlage und die Unabhängigkeit der frühen Differenzierung des Ciliarganglions von peripheren Zielgebieten (Landmesser und Pilar, 1974; Lee *et al.*, 2001).

Die Entwicklung des Ciliarganglions sowie die Entwicklung des Auges hängen also von BMP-Signalen ab. In den *BMP7*-Mutanten ist tatsächlich auch die Entwicklung des Auges beeinflusst (Luo *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995). Die Entwicklung des Ciliarganglions wurde in diesen Tieren nicht analysiert. Noggin interferiert mit unterschiedlichen BMPs (zusammengefaßt bei Balemans und Van Hul, 2002), so daß über die exakte Identität des für die Entwicklung des Ciliarganglions relevanten BMPs keine definitive Aussage gemacht werden kann. BMP5 und BMP7 werden im retroorbitalen Mesenchym redundant exprimiert (Solloway und Robertson, 1999; diese Arbeit) und die Doppelmutante in der Maus zeigt einen deutlich stärkeren Phänotyp als die Einzelmutanten (Solloway und Robertson, 1999), so daß BMP5 und BMP7 in der Entwicklung des Ciliarganglions beteiligt sein könnten. Zudem sind auch Activin-Rezeptoren im cranialen Mesenchym exprimiert (Fuhrmann *et al.*, 2000). Activine sind ebenfalls Mitglieder der TGF β -Superfamilie. Da Noggin jedoch spezifisch BMPs inhibiert (Balemans und Van Hul, 2002) zeigen die Nogginexperimente, daß Activine für die Bildung und Differenzierung des Ciliarganglions nicht ausreichend sind.

4.2.2 BMPs induzieren die Entwicklung des Ciliarganglienphänotyps

Die Idee, daß BMPs eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Differenzierung des Ciliarganglions spielen, wird durch Überexpressionsexperimente unterstützt. Retrovirale Überexpression von BMP4 im cranialen Mesenchym einschließlich des Ciliarganglions führte zu vergrößerten Ciliarganglien. Die Vergrößerung entstand durch die ektopische Differenzierung von Neuralleisten-Vorläuferzellen im okulomotorischen Nerv und in den Ciliarnerven. Experimente mit BMP-Überexpression in den sympathischen Ganglien und im Brachialnerv führten zur Expression von *Phox2b* und von noradrenergen Genen, also insgesamt einem sympathischen Phänotyp, in den ektopisch generierten Neuronen (Reissmann *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 2000; Ernsberger *et al.*, 2000a; Ernsberger, 2000b). Die Zellen, die durch BMP4 im Ciliarganglion und den angrenzenden Nerven induziert wurden, zeigten interessanterweise eher einen cholinergen als einen noradrenergen Phänotyp. Es wurden insgesamt mehr Zellen gebildet, das Verhältnis an cholinergen bzw. noradrenergen Zellen gleicht jedoch dem in den nicht infizierten kontralateralen Ganglien. Während also im Rumpf durch Expression von BMP4 vergrößerte sympathische Ganglien und ektopische Zellen in den Brachialnerven mit sympathischem Phänotyp gebildet werden, entstehen in der Umgebung des Ciliarganglions nach BMP4-Expression Zellen mit parasymphatischen Eigenschaften.

4.3 Unterschiedliche Kontrolle der Expression noradrenerger Gene in Ciliarganglien und sympathischen Ganglien

4.3.1 Die Rolle von *Cash1* und *Phox2a/b*

Das BMP-Signal führt in sympathischen Ganglien und parasympathischen Ciliar-Vorläuferzellen zu unterschiedlichen Differenzierungsvorgängen: einerseits zu permanenter noradrenerger Differenzierung in den sympathischen Ganglien, andererseits zu transienter noradrenerger Differenzierung im parasympathischen Ciliarganglion. *Mash1/Cash1* und *Phox2a/b* zeigen in beiden Systemen das gleiche Expressionsmuster. Sowohl *Mash1/Cash1* wie auch *Phox2a/b* sind in die noradrenerge Differenzierung der sympathischen Ganglien involviert. Es liegt nahe, daß sowohl *Mash1/Cash1* wie auch *Phox2a/b* auch in der initialen noradrenergen Differenzierung der Ciliarganglien beteiligt sind. Die Expression von *TH* und *DBH* in den Ciliarganglien wurde zwar in den *Mash1*- bzw. *Phox2*-Nullmutanten nicht analysiert, die Entwicklung cranialer parasympathischer Ganglien, einschließlich des Ciliarganglions, sowie die *DBH*-Expression des cranialen parasympathischen Sphenopalatinum ist jedoch von der Expression von *Mash1* abhängig (Hirsch *et al.*, 1998). In den *Phox2a*- und *Phox2b*-Nullmutanten fehlen die cranialen parasympathischen Ganglien (Morin *et al.*, 1997; Pattyn *et al.*, 1999). Während in den sympathischen Ganglien jedoch kurz nach *Phox2*-Expression in allen *Phox2*-positiven Zellen die Expression von *TH* und *DBH* induziert wird, sind im Ciliarganglion zu allen untersuchten Stadien nur Teilpopulationen der *Phox2*-positiven Zellen *TH*-/*DBH*-positiv. Die *Phox2a*-/*b*-Expression in Ciliarganglien und sympathischen Ganglien ist nicht offensichtlich unterschiedlich, jedoch ist durch *in situ*-Hybridisierung keine exakte Quantifizierung des Expressionsniveaus eines zu untersuchenden Gens möglich, so daß also eine unterschiedlich starke Expression von *Phox2*-Transkriptionsfaktoren in sympathischen und Ciliarganglien generell möglich wäre.

An Stadium 24 HH konnten Zellen gezeigt werden, die *TH* und *VACHT* coexprimieren, was dafür spricht, daß Ciliarneuronen transient noradrenerge Gene exprimieren, bevor sie den cholinergen Phänotyp ausbilden. Daß nur relativ wenige klar doppelt gefärbte Zellen gezeigt werden konnten ist zu erwarten, wenn die noradrenerge und cholinerge Genexpression nur während einer kurzen Zeitspanne überlappt. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß der Rückgang an noradrenergen Zellen z. T. auf Zelltod zurückzuführen ist (Lee *et al.*, 2001). Dieser Möglichkeit steht jedoch entgegen, daß Zellen vorhanden sind, die sich in der Umdifferenzierung von noradrenergem zu cholinergem Phänotyp befinden.

Die Ähnlichkeit im Expressionsmuster von *Cash1* und *Phox2*-Faktoren in sympathischen und parasymphatischen Ganglien läßt darauf schließen, daß noch weitere, differentiell exprimierte Faktoren in der noradrenergen Differenzierung von Bedeutung sind. Der differentiell exprimierte bHLH-Transkriptionsfaktor *dHand* könnte ein solcher Faktor sein.

4.3.2 Die Rolle von *dHand* in der noradrenergen Genexpression

Der selektive Rückgang der *TH/DBH*-Expression im Ciliarganglion im Vergleich zu den sympathischen Ganglien könnte auch dadurch zu erklären sein, daß im Ciliarganglion ein Faktor vorhanden ist, der noradrenerge Genexpression reprimiert oder ein Faktor fehlt, der die Expression noradrenerger Gene aktiviert oder erhält. Ein Transkriptionsfaktor, der in die noradrenerge Differenzierung involviert ist und der selektiv in den sympathischen Ganglien exprimiert wird, ist der bHLH-Transkriptionsfaktor *dHand*. In den sympathischen Ganglien wird *dHand* unter der Kontrolle von BMPs exprimiert. Die Expression erfolgt in Abhängigkeit von *Phox2b* (Howard *et al.*, 2000). Die Überexpression von *dHand* führt *in vitro* und *in vivo* zur Expression noradrenerger Gene (Howard *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000). Um die Rolle von *dHand* in der Differenzierung noradrenerger Neuronen im autonomen Nervensystem näher zu charakterisieren, wurde die Zebrafisch-Nullmutante "Hands off"/*han*^{s6} (Yelon *et al.*, 2000) untersucht. In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Wirkung der *dHand*-Überexpression im Ciliarganglion untersucht

Die Expression noradrenerger Gene in sympathischen Neuronen ist *dHand*-abhängig - Analyse der "Hands off"/*han*^{s6}-Mutante

Die Entwicklung der sympathischen Ganglien beginnt im Zebrafisch am zweiten Tag der Embryonalentwicklung. Zunächst bilden sich die rostral auf Höhe der ersten Somiten liegenden oberen Cervikalganglien, ab dem fünften Tag bilden sich die Ganglien der sympathischen Kette (An *et al.*, 2002). Während die *dHand*-Nullmutante in der Maus aufgrund eines Herzphänotyps zu früh stirbt, um die Entwicklung der sympathischen Ganglien zu untersuchen (Srivastava *et al.*, 1997; Yamagishi *et al.*, 1999), stellt der Zebrafisch ein Modellsystem dar, in dem die sympathische Entwicklung anhand der oberen Cervikalganglien untersucht werden kann. Dies liegt daran, daß Fischembryonen auch bei geringer Herztätigkeit länger überleben als Mausembryonen. Die Zellen exprimieren in der Normalentwicklung *Phox2a* und *Phox2b* sowie die noradrenergen Gene *TH* und *DBH* bereits

am Tag 2 (Guo *et al.*, 1999; An *et al.*, 2002). Im Huhn beginnt die *dHand*-Expression nach *Phox2b* aber vor *Phox2a* (Howard *et al.*, 2000; Tsarovina *et al.*, 2004). In der "Hands off"-Mutante ist die Expression der noradrenergen Gene *TH* und *DBH* massiv reduziert, so daß sie beinahe vollständig fehlt. Im Gegensatz zum Ciliarganglion des Huhns, in dem in der Wildtypsituation ohne *dHand* eine transiente Expression von *TH* und *DBH* erfolgt, werden diese Gene im oberen Cervikalganglion in der *han^{s6}*-Zebrafischmutante von Anfang an so gut wie nicht exprimiert. Die Frage, ob die in wenigen Zellen zu beobachtende *TH/DBH*-Expression einen transienten Phänotyp widerspiegelt oder ob es sich um ein von der Situation im Ciliarganglion verschiedenes Phänomen handelt, in dem die noradrenerge Differenzierung von vornherein fehlt, wurde nicht abschließend geklärt. Die Expression von *Phox2b* zeigt an, daß die Zellen vorhanden sind, aber nicht noradrenerg differenzieren. Die Expression von *Phox2a* ist z. T. beeinträchtigt. Im Ciliarganglion des Huhns hingegen kann im Vergleich zu den sympathischen Ganglien keine differentielle, also möglicherweise von *dHand* abhängige, Kontrolle von *Phox2a* oder *Phox2b* festgestellt werden. Das Expressionsmuster von *Phox2a/b* in der Zebrafischmutante spricht dafür, daß *dHand* innerhalb der von BMPs gesteuerten Signaltransduktionskaskade wirkt, deren einzelne Faktoren sich gegenseitig regulieren können (Morin *et al.*, 1997; Stanke *et al.*, 1999; Pattyn *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001; Tsarovina *et al.*, 2004). *dHand* ist somit essentiell für die Differenzierung noradrenerger sympathischer Neuronen.

dHand reicht aus, die Zahl noradrenerger Neuronen im Ciliarganglion zu erhöhen

Das Auftreten einer erhöhten Anzahl noradrenerger Neuronen nach *dHand*-Überexpression ist ein weiteres starkes Indiz für eine wesentliche Rolle von *dHand* in der noradrenergen Differenzierung peripherer Neuronen.

Eine Möglichkeit wäre, daß *dHand* eine späte Rolle in der durch BMP induzierten Signalkaskade einnimmt. *dHand* könnte in diesem Szenario unabhängig von vorgeschalteten Transkriptionsfaktoren wie *Mash1/Cash1* oder *Phox2a/b* funktionieren. In *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, daß *dHand* in der Lage ist, an die DNA zu binden und Transkription von *DBH*-Promotorkonstrukten zu induzieren. Darüber hinaus wurde für die N-terminale Domäne von *dHand* eine transkriptionsaktivierende Funktion gezeigt (Dai *et al.*, 2002a; McFadden *et al.*, 2002). Andererseits induziert *dHand*-Expression die Expression von *Phox2a/b* (Howard *et al.*, 2000), und könnte somit also auch gemeinsam mit den *Phox2*-Faktoren wirken. Hierfür spricht, daß nach *dHand*-Überexpression die zusätzlichen noradrenergen Neuronen beinahe ausschließlich im Ciliarganglion auftreten, also in Zellen,

die während ihrer Normalentwicklung auch *Phox2a* und *Phox2b* exprimieren. Weiterhin enthält der *DBH*-Promotor mehrere Homöodomänen-Bindestellen und ein E-Box-Motiv, an die *Phox2a/b* und *dHand* binden können. Sowohl *Phox2a/b* als auch *dHand* sind in der Lage, die Transkription von *DBH*-Promotorkonstrukten zu induzieren, und diese Expression kann in Abhängigkeit von cAMP noch gesteigert werden. *Phox2a* und *dHand* wirken synergistisch an *DBH*-Promotorkonstrukten. Beide Proteine sind in der Lage, mit CBP/p300 zu interagieren und einen Transkriptionskomplex höherer Ordnung zu bilden (Xu *et al.*, 2003; Rychlik *et al.*, 2003). Die Anwesenheit von *dHand* erhöht die DNA-Bindung von *Phox2a*, ob die beiden Proteine direkt oder indirekt miteinander interagieren ist jedoch unklar (Xu *et al.*, 2003; Rychlik *et al.*, 2003).

Die synergistische Wirkung von *dHand* ist interessanterweise unabhängig von der Bindung an die DNA. Die Synergie von *Phox2a* und *dHand* ist von den Homöodomänenbindestellen abhängig, die E-box im Promotor kann dagegen mutiert werden (Xu *et al.*, 2003; Rychlik *et al.*, 2003). Transgene Mäuse, in denen verschiedene Deletionsmutanten von *dHand* exprimiert wurden, zeigten Phänotypen in der Extremitätenentwicklung. Dabei war entscheidend, daß die HLH-Domäne, welche Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, vorhanden ist. Die Existenz der basic-Domäne, welche die DNA-Bindung vermittelt, hatte dagegen keinen Einfluß darauf, ob ein Extremitätenphänotyp auftrat (McFadden *et al.*, 2002). Die Wichtigkeit von Protein-Protein-Interaktionen deutet darauf hin, daß die Funktion von *dHand* durch weitere Proteine reguliert werden kann. Es ist also ein Szenario vorstellbar, in dem überexprimiertes *dHand* in Ciliarvorläufern in der Lage ist, mit bereits vorhandenen *Phox2*-Transkriptionsfaktoren gemeinsam noradrenerge Genexpression zu induzieren und/oder zu erhalten. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß *dHand* in der Lage ist, die Expression von *Phox2a/b* zu induzieren (Howard *et al.*, 2000), so daß es auch möglich wäre, daß durch *dHand*-Überexpression die Menge an *Phox2*-Transkriptionsfaktoren erhöht wird, wodurch die noradrenerge Genexpression noch zusätzlich stimuliert werden könnte.

4.3.3 Entstehung unterschiedlicher neuronaler Subtypen im autonomen Nervensystem: extrinsische Faktoren und intrinsische Signaltransduktion

Die ektopische Expression von BMP4 induziert zusätzliche Ciliarneuronen, ohne den relativen Anteil noradrenerger Zellen zu erhöhen

Die differentielle Expression von *dHand* in sympathischen und Ciliarganglien und die Bedeutung von *dHand* für die noradrenerge Differenzierung wirft die Frage nach der Rolle

von BMPs in der Differenzierung der Ciliarneuronen auf. Welche Rolle spielen BMPs in der Entwicklung unterschiedlicher autonomer Subtypen? Im Neuralrohr werden in Abhängigkeit eines BMP-Konzentrationsgradienten unterschiedliche Typen von dorsalen Interneuronen gebildet (Lee und Jessell, 1999; Timmer *et al.*, 2002). Im Hinterhirn wurde gezeigt, daß die Bildung der noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus direkt oder indirekt von der durch BMPs vermittelten dorsoventralen Musterbildung im Rhombomer 1 abhängt (Vogel-Höpker und Rohrer, 2002). In Kulturen von Neuralleistenstammzellen wurde beobachtet, daß in Abhängigkeit von der BMP2-Konzentration *in vitro* bei niedrigen Konzentrationen vorwiegend VAcHT-positive Neuronen gebildet wurden, während bei höheren Konzentrationen TH-positive Neuronen auftraten. Deshalb wurde vorgeschlagen, daß die Bildung sympathischer noradrenerger bzw. parasympathischer cholinergischer Neuronen *in vivo* durch unterschiedliche BMP-Levels entschieden werden könnte (White *et al.*, 2001).

Es wäre denkbar, daß in autonomen Neuronen so lange *TH/DBH* exprimiert wird, wie in ihrer Umgebung hohe Konzentrationen von BMPs exprimiert werden. Das Expressionsniveau von *BMP5* und *-7* in der Umgebung der Ciliarganglien nimmt zwischen Stadium 18 HH und 20 HH ab. Dagegen bleibt die *BMP4*-Expression in den sympathischen Ganglien bis mindestens Stadium 26 erhalten (McPherson *et al.*, 2000; Patzke *et al.*, 2001). Weiterhin gehören *BMP4* einerseits und *BMP5* und *-7* andererseits in unterschiedliche BMP-Subgruppen und die Wirkung von *BMP4* ist deutlich stärker als die von *BMP7* (Reissmann *et al.*, 1996). Es könnte somit eine Korrelation zwischen der *BMP*-Expression und *TH/DBH*-Expression bestehen. Gegen eine BMP-konzentrationsabhängige Differenzierung in cholinerge parasympathische oder noradrenerge sympathische autonome Neuronen spricht jedoch, daß die craniale *BMP4*-Überexpression vorwiegend cholinerge Neuronen, d. h. also den Ciliarphänotyp induziert. Im Rumpf hingegen führt die Expression von *BMP4* zur Induktion von vorwiegend noradrenergen Zellen, die also den sympathischen Phänotyp widerspiegeln (Ernsberger *et al.*, 2000a; Ernsberger 2000b). Es könnte zwar sein, daß in cranialer Umgebung aufgrund differentieller Expression von BMP-Inhibitoren das Expressionsniveau nicht so stark erhöht ist, wie es für die Expression von *TH/DBH* notwendig ist und wie es in der sympathischen Umgebung erreicht wird. Eine Reihe von Argumenten spricht jedoch gegen diese Vorstellung. i) Wenn man der Hypothese folgt, daß für die Expression von *TH/DBH* ein hoher BMP-Level erreicht sein muß, dann würde die Anwesenheit von einigen noradrenergen Zellen in der Ciliarentwicklung dafür sprechen, daß dieser Level in der Umgebung des Ciliarganglions erreicht wurde. ii) Sowohl in der Umgebung der sympathischen Ganglien im Rumpf als auch in der cranialen Umgebung der parasympathischen Ciliarganglien werden

durch BMP4-Überexpression ektopische Neuronen generiert. Dies zeigt, daß in beiden Fällen eine signifikante Erhöhung des BMP-Levels gegenüber der Normalsituation erreicht wird. iii) Die Relation von noradrenergen zu cholinergen Zellen ist nach BMP-Expression in den Ciliarganglien nicht verschoben. *In vitro* wird in Neuralleistenstammzellen abhängig von der BMP2-Konzentration entweder ein cholinerges Phänotyp bei niedriger Konzentration oder ein noradrenerger Phänotyp bei hoher Konzentration generiert (White *et al.*, 2001). *In vivo* wird jedoch weder eine Zunahme von noradrenergen noch eine Abnahme von cholinergen Neuronen beobachtet (diese Arbeit), so daß also die Entscheidung zwischen noradrenergen versus cholinergen Zellen nicht durch den BMP-Level getroffen zu werden scheint.

Wirkungsmechanismen von dHand in der Kontrolle noradrenerger Differenzierung

Während die BMP5- und BMP7-Expression während der Wildtypentwicklung nicht ausreicht, um in Ciliarvorläufern *dHand*-Expression zu induzieren, finden sich nach BMP4-Expression ektopische *dHand*-positive Neuronen. Obwohl jedoch durch *dHand*-Überexpression im Ciliarganglion die Zahl *TH*-/*DBH*-positiver Neuronen erhöht wird, reicht erstaunlicherweise die durch BMP4 in den ektopischen Neuronen induzierte Expression von *dHand* nicht aus, den relativen Anteil *TH*-/*DBH*-positiver Neuronen zu erhöhen. Es wurde gezeigt, daß *dHand* gemeinsam mit *Phox2a* am *DBH*-Promotor wirken kann. Die synergistische Wirkung erfordert dabei die DNA-Bindung von *Phox2a*, ist jedoch unabhängig von der DNA-Bindung von *dHand*. *dHand* scheint also die Bindung von *Phox2a* an die DNA oder die transkriptionsaktivierende Wirkung von *Phox2a* zu erhöhen (Dai und Cserjesi., 2002a; Dai *et al.*, 2002b; Xu *et al.*, 2003; Rychlik *et al.*, 2003).

Es liegt nahe, daß *dHand* gemeinsam mit *Phox2*-Transkriptionsfaktoren und evtl. anderen Coregulatoren für die Expression noradrenerger Gene verantwortlich ist. In diesem Fall müßte ein Schwellenwert von *dHand* überschritten werden, um mit *Phox2* synergistisch zu interagieren. Neuere Arbeiten zeigen eine komplexe Regulation der *dHand*-Wirkung. *Hand*-Proteine können durch PKA/PKC vermittelte Phosphorylierung reguliert werden, wodurch sich die Dimerisierungseigenschaften verändern. Durch Interaktion mit JAB1 oder Akt1 können die DNA-Bindung und die transkriptionsaktivierende Wirkung von *dHand* erhöht bzw. verringert werden (Firulli *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist *dHand* in der Lage, mit ubiquitär exprimierten Klasse-A-bHLH-Proteinen, dem E-Protein E12, und mit gewebsspezifisch exprimierten Klasse-B-bHLH-Proteinen, z.B. *eHand*, zu dimerisieren. *In vitro* ist z. B. die DNA-Bindung und transkriptionsaktivierende Wirkung

u.a. von der Interaktion mit E12 abhängig (Firulli *et al.*, 2000; Dai und Cserjesi, 2002a; McFadden *et al.*, 2002). Diese Regulation könnte zwischen sympathischen und parasymphatischen Vorläuferzellen unterschiedlich geregelt sein, z. B. durch differentielle Expression unterschiedlicher Coregulatoren. Die initiale Phox2-Expression könnte ausreichend sein, um *TH-/DBH*-Expression zu induzieren, während für den Erhalt der *TH-/DBH*-Expression stärkere Phox2-Wirkung und damit die synergistische Funktion von dHand nötig wäre. Während durch RCAS-Überexpression ein dHand-Level erreicht worden sein könnte, der ausreicht, um gemeinsam mit Phox2 die *TH-/DBH*-Expression zu erhalten, könnte der durch BMP4-Überexpression induzierte dHand-Level unterhalb eines Schwellenwerts geblieben sein. Für einen Schwellenwert würde ebenfalls sprechen, daß auch durch dHand-Überexpression stets nur in einem Teil der Gesamtzellzahl *TH-/DBH*-Expression erhalten wurde.

Präspezifizierung von cranialen Ciliarvorläuferzellen und sympathischen Vorläuferzellen aus dem Rumpf ?

Die Vorstellung unterschiedlicher Regulation der dHand-Wirkung würde frühe Unterschiede zwischen cranialen Ciliarvorläuferzellen und sympathischen Vorläuferzellen aus dem Rumpf implizieren.

Worin könnten diese Unterschiede zwischen sympathischen und Ciliarvorläuferzellen begründet sein? Es könnte sein, daß hier unterschiedliche anterioposteriore Positionswerte widerspiegelt sind (Jessell und Lumsden, 1998; Rubinstein und Shimamura, 1998). Die Vorläufer von Ciliarganglien und sympathischen Ganglien entstammen unterschiedlichen axialen Levels im Embryo (Le Douarin und Kalcheim, 1999). Abzhanov *et al.* (2003) zeigten Unterschiede im Entwicklungspotential cranialer Neuralleistenzellen oder Neuralleistenzellen aus dem Rumpf. Diese Unterschiede können zumindest zum Teil durch differentielle Expression von Hox-Genen erklärt werden. So findet z.B. eine Umwandlung der Neuralleistenzellen des zweiten Branchialbogens zu Zellen mit dem Phänotyp des ersten Bogens statt, wenn *Hoxa2* ausgeschaltet wird (Abzhanov *et al.*, 2003; Rijli *et al.*, 1993; Grammatopoulos *et al.*, 2000). Eine weitere Möglichkeit läge in der unterschiedlichen Expression von Proteinen, welche mit Transkriptionsfaktoren interagieren und deren Aktivität modulieren. So ist z.B. das Repressor-Protein Id2 in der cranialen aber nicht in der Rumpf-Neuralfalte exprimiert und ist in migrierenden cranialen Neuralleistenzellen nachzuweisen (Martinsen und Bronner-Fraser, 1998). Id-Proteine sind in der Lage, E-Proteine zu binden und

könnten mit dHand z.B. um die Bindung des E-Proteins E12 konkurrieren (Benezra *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1991; Jögi *et al.*, 2002). E12 kann mit dHand interagieren und erhöht dessen DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität *in vitro* (Dai und Cserjesi, 2002a; McFadden *et al.*, 2002). Dies könnte von Bedeutung sein, wenn für die synergistische Wirkung von dHand und Phox2-Transkriptionsfaktoren die Interaktion mit E12 erforderlich ist, oder wenn neben einer möglichen synergistischen Interaktion zwischen dHand und Phox2 weitere transkriptionelle Aktivität von dHand vonnöten ist.

Untersuchungen des dHand-Promotors in der Maus zeigten die Existenz von Enhancer-Elementen, die für verschiedene Gewebe spezifisch sind. So gibt es einen endothelin-1-abhängiges Promotor-Element, das für die dHand-Expression in den Branchialbögen notwendig ist. Die dHand exprimierenden Zellen exprimieren den Endothelin-Rezeptor A (EdnrA), die Zellen des umgebenden Ektoderms produzieren den Liganden endothelin -1 (ET-1). Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Dlx6 bindet ET-1-abhängig an Homöodomänenbindestellen im dHand-Promotor (Thomas *et al.*, 1998; Clouthier *et al.*, 2000; Charité *et al.*, 2001; Yanagisawa *et al.*, 2003). Ein zweites gewebespezifisches Element kontrolliert die dHand-Expression im rechten Ventrikel in der Herzanlage in Abhängigkeit von Gata-Transkriptionsfaktoren. Da die Expression von Gata-Faktoren nicht auf einen Ventrikel beschränkt ist, muß von weiteren positiven oder negativen Coregulatoren ausgegangen werden (McFadden *et al.*, 2000). Ein ähnliches Szenario wäre für die differentielle Expression von dHand im autonomen Nervensystem denkbar. Regulatorische Elemente im dHand-Promotor könnten die unterschiedliche Reaktion auf BMP4-Expression in unterschiedlicher Umgebung erklären. Weitere Analysen des dHand-Promotors werden Aufschluß darüber geben, ob solche für die sympathischen oder parasymphatischen Ganglien spezifische Elemente existieren.

Lokale Signale in der Umgebung der sich bildenden Ganglien üben ebenfalls wesentliche Einflüsse auf die Differenzierung der Neuralleistenzellen aus. Heterotop Transplantationsexperimente zeigten, daß das Entwicklungspotential der Neuralleistenzellen unterschiedlicher axialer Levels in weiten Teilen äquivalent ist (Le Douarin *et al.*, 1974; Le Douarin *et al.*, 1975; Le Douarin und Kalcheim, 1999; Le Douarin und Dupin, 2003). Autonome Vorläuferzellen sind am Embryonaltag 4.5 und später im Ciliarganglion vorhanden und können, wenn sie heterotop transplantiert werden, zu noradrenergen Neuronen differenzieren (Le Douarin *et al.*, 1978; Dupin, 1984; Lee *et al.*, 2001). Dies scheint im Gegensatz dazu zu stehen, daß es nicht möglich ist, durch BMP4-Überexpression präferentiell noradrenerge Differenzierung auszulösen. Auf der anderen Seite ist das noradrenerge

Entwicklungspotential während der Normalentwicklung unterdrückt, möglicherweise durch lokale Signale, und kommt nur zum Vorschein, wenn die Ganglien dissoziiert und rücktransplantiert werden (Le Douarin *et al.*, 1978; Dupin, 1984; Schweizer *et al.*, 1983). Lokale Signale in der cranialen Umgebung könnten also die parasymphatische Identität in den Anlagen des Ciliarganglions definieren. Interessanterweise können nicht nur undifferenzierte Vorläuferzellen aus dem Ciliarganglion den noradrenergen Phänotyp erlangen, wenn sie in den Rumpf transplantiert werden und zur dorsalen Aorta wandern, sondern auch differenzierte Ciliarneuronen (Coulombe und Bronner-Fraser, 1986). Noradrenerge Differenzierung immaturer Ciliarneuronen findet jedoch nicht statt, nachdem sie in das craniale Mesenchym implantiert werden (Sechrist *et al.*, 1998), wodurch die These gestützt wird, daß Signale aus dem cranialen Mesenchym in der Umgebung des Ciliarganglions eine vollständige noradrenerge Differenzierung verhindern.

4.3.4 Regulation noradrenerger Gene im Ciliarganglion in späten Entwicklungsphasen

Der Grund für den Erhalt einer geringen Anzahl noradrenerger, *TH/DBH*-positiver Zellen im Ciliarganglion in der Abwesenheit von *dHand* ist unklar. Eine Kompensation der *dHand*-Wirkung durch den nahe verwandten Faktor *eHand* (Srivastava *et al.*, 1995; Hollenberg *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1999) scheidet aus, da *eHand* ebenfalls nicht in den Ciliarganglien exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Es könnte sein, daß in einigen Zellen die Wirkung von *Phox2a/b* alleine ausreicht, um noradrenerge Differenzierung zu erhalten, und daß diese Wirkung nur für einen begrenzten Zeitraum benötigt wird. Für dopaminerge Neuronen z.B. im sensorischen Ganglion Petrosus gibt es Hinweise auf eine frühe, transiente *TH*-Expression, gefolgt von einer späten, permanenten *TH*-Expression. Diese späte Expression hängt von Signalen aus dem Zielgebiet (Katz und Erb, 1990) und/oder elektrischer Aktivität ab (Brosenisch und Katz, 2001). Ein ähnliches Szenario könnte in den parasymphatischen Ciliarganglien für die frühe und späte Expression von *TH* und *DBH* verantwortlich sein (Hirsch *et al.*, 1998; Landis *et al.*, 1987; Leblanc und Landis, 1989). Es konnte z. B. gezeigt werden, daß die Zahl *TH*-positiver, Neuropeptid-Y-positiver Zellen in Ciliarganglien erhöht werden kann, indem die sympathische Innervation des gemeinsamen Zielgebiets, der Iris, durch Behandlung mit 6-Hydroxydopamin zerstört wurde (Tyrrell *et al.*, 1992). Faktoren, die vom Zielgebiet sezerniert werden und die das Überleben und die Differenzierung der ins Zielgebiet projizierenden Neuronen beeinflussen, werden nun von Ciliarneuronen aufgenommen, die daraufhin noradrenerg differenzieren. Da im Ciliarganglion des Huhns nur

eine sehr geringe Zahl noradrenerger Zellen erhalten bleibt, wurde dieser Frage in der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen.

4.4 Andere parasympathische Ganglien - Expression von *dHand* und transiente noradrenerge Expression

dHand wird im parasympathischen Ciliarganglion nicht exprimiert, und das Fehlen der *dHand*-Expression korreliert mit der nur transienten Expression von noradrenergen Genen in den Ciliarneuronen. Wie sieht nun die Situation in anderen parasympathischen Ganglien aus? Im parasympathischen Ganglion Sphenopalatinum und im Ganglion Submandibulare ist *dHand*-Expression nachzuweisen (eigene Beobachtungen; Dai *et al.*, 2004). In diesen Ganglien findet sich ebenfalls massive *TH/DBH*-Expression (Leblanc und Landis, 1988; Tsarovina *et al.*, 2004). Die Expression von *dHand* und *TH/DBH* würde also auch in diesen Ganglien korrelieren.

4.5 Cholinerge Differenzierung autonomer Neuronen

Während sich diese Arbeit mit Signalen und Kontrollmechanismen der noradrenergen Differenzierung im Ciliarganglion im Vergleich mit den sympathischen Ganglien beschäftigt, sind die Signale und Transkriptionsfaktoren, welche die frühe, zielgebietsunabhängige cholinerge Differenzierung steuern, nicht bekannt (zusammengefaßt bei Ernsberger und Rohrer, 1999). Kandidaten für cholinerge Differenzierungssignale sind die Liganden für den c-ret-Rezeptor, da c-ret selektiv in cholinergen sympathischen Neuronen (Ernsberger *et al.*, 2000a) und Ciliarneuronen (Hashino *et al.*, 2001) exprimiert ist und da c-ret-Liganden in der Lage sind, *in vitro* cholinerge Marker zu induzieren (Brodski *et al.*, 2002). Neuropoietische Cytokine, die durch gp130/LIFR β -Rezeptorkomplexe wirken, sind im Huhn in der Kontrolle des Neuropeptids VIP, jedoch nicht in die Expression von ChAT und VAcHT involviert (Geissen *et al.*, 1998; Duong *et al.*, 2002).

4.6 Ausblick

Die Analyse der Entwicklung des parasympathischen Ciliarganglions zeigte, daß BMPs und nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren wesentliche Anteile an der generischen und subtypspezifischen Differenzierung auch parasympathischer autonomer Neuronen haben. Die Entwicklung der Ciliarneuronen ist BMP-abhängig, und die differentielle Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors *dHand* steht mit der nur transienten noradrenergen Genexpression in Verbindung. Der Level der *dHand*-Expression könnte für die Aufrechterhaltung noradrenerger Genexpression entscheidend sein. Es wird somit interessant sein, die Auswirkung unterschiedlicher *dHand*-Konzentrationen auf die noradrenerge Differenzierung zu testen. Eine Möglichkeit, unterschiedliche Konzentrationen zu erzeugen, könnte darin liegen, induzierbare Expressions-Konstrukte zu verwenden. Ein vielfach verwendetes Prinzip besteht darin, Chimären aus Transkriptionsfaktoren und dem Oestrogenrezeptor herzustellen, die durch Zugabe von Liganden des Oestrogenrezeptors in den Zellkern verlagert werden. Auf diese Weise könnte auch ein induzierbares *dHand*-Fusionsprotein hergestellt werden (Heyworth *et al.*, 1999).

Während die Mehrzahl der *dHand*-exprimierenden Zellen in den sympathischen Ganglien den noradrenergen Phänotyp entwickelt, reicht die *dHand*-Überexpression in den Ciliarganglien nur dazu aus, in einem Teil der Zellen *TH/DBH* zu induzieren. Neben nicht vollständiger Infektion könnte die differentielle Expression von regulatorischen Proteinen ein Grund dafür sein, welche die *dHand*-Wirkung positiv oder negativ beeinflussen. Die vergleichende Analyse von cDNA aus sympathischen oder Ciliarganglien könnte differentiell exprimierte Kandidatengene ergeben, deren Funktion dann weiter untersucht werden kann.

Die Funktion von *dHand* im sympathischen Ganglion im Huhn könnte im Erhalt noradrenerger Genexpression liegen. Die Analyse der Zebrafischmutante konnte nicht abschließend klären, ob die Funktion von *dHand* in der initialen Differenzierung oder im Erhalt des noradrenergen Phänotyps liegt, oder ob die Funktion innerhalb verschiedener Wirbeltierklassen differiert. Die Generation von konditionellen *dHand*-Mutanten oder die Anwendung von RNAi in den sympathischen Ganglien im Huhn wird ermöglichen, *dHand* zu unterschiedlichen Zeitpunkten gezielt auszuschalten, was dazu beitragen wird, die Funktion von *dHand* während unterschiedlicher Entwicklungsphasen besser zu verstehen.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf Unterschiede in den Vorläuferzellen schon sehr früh in der Entwicklung hin. Es wäre somit hochinteressant, diese Vorläuferzellen isolieren und charakterisieren zu können.

5 Zusammenfassung

Die frühe Entwicklung und Differenzierung der sympathischen Ganglien wird durch ein Netzwerk von proneuralen (*Mash1/Cash1*) und autonomen (*Phox2a/b*, *dHand*) Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Diese Transkriptionsfaktoren induzieren direkt oder indirekt die Expression neuronaler (*SCG10*) und subtypspezifischer noradrenerger (*TH*, *DBH*) oder cholinergischer (*ChAT*, *VACHT*) Gene. Die Analyse der frühen Genexpression im Ciliarganglion zeigte ein bemerkenswert ähnliches zeitliches Expressionsschema. Zwei bedeutende Unterschiede sind einerseits die nur transiente Expression noradrenerger Gene und andererseits die Abwesenheit des bHLH-Transkriptionsfaktors *dHand*, der selektiv in den sympathischen Ganglien exprimiert ist.

Das Netzwerk der Transkriptionsfaktoren in den sympathischen Ganglien ist abhängig von einem BMP-Signal aus der dorsalen Aorta. BMPs sind notwendig und ausreichend für die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren und damit für die Bildung der sympathischen Ganglien. Diese Arbeit zeigt, daß BMPs auch für die Entwicklung des Ciliarganglions notwendig und ausreichend sind. Fehlen BMPs, differenzieren die Vorläuferzellen nicht, wird BMP4 überexprimiert, differenzieren sie, anders als sympathische Vorläuferzellen im Brachialnerv, zu Zellen mit parasymphathischem Phänotyp.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine Präspezifizierung von Ciliarvorläuferzellen und sympathischen Vorläuferzellen hin. Der bHLH-Transkriptionsfaktor *dHand* ist differentiell in sympathischen Vorläuferzellen exprimiert. Seine Expression ist notwendig für die noradrenerge Differenzierung, und die Überexpression im Ciliarganglion reicht aus, um in den Ciliarneuronen die Expression von *TH/DBH* zu erhalten. Verschiedene Arbeiten schlagen als möglichen Wirkmechanismus eine synergistische Interaktion von *dHand* und *Phox2*-Transkriptionsfaktoren vor. Ektopische BMP4-Expression induziert in einem Teil der generierten Neuronen die Expression von *dHand*. Interessanterweise reicht diese, durch BMP4 induzierte, *dHand*-Expression nicht aus, den relativen Anteil noradrenerger Neuronen innerhalb der ektopischen und der Ciliarneuronen zu erhöhen. Diese scheinbare Diskrepanz kann erklärt werden, wenn man annimmt, daß ein bestimmter Schwellenwert in der *dHand*-Funktion erreicht werden muß. Dieser Schwellenwert könnte durch unterschiedliche *dHand*-Expression, induziert durch BMPs, durch posttranskriptionelle Kontrolle der *dHand*-Funktion,

oder durch unterschiedliche Expression von Cofaktoren in unterschiedlich präspezifizierten Vorläuferzellen reguliert werden. In Zellen, in denen die Konzentration an aktivem dHand einen gewissen Schwellenwert übersteigt, würde dann gemeinsam mit Phox2a/b die noradrenerge Genexpression induziert oder erhalten werden.

6 Literatur

Abzhanov A., Tzahor E., Lassar A. B., Tabin C. J. (2003): Dissimilar regulation of cell differentiation in mesencephalic (cranial) and sacral (trunk) neural crest cells in vitro. *Development* 130, 4567-4579

An M., Luo R., Henion P. D. (2002): Differentiation and maturation of zebrafish dorsal root and sympathetic ganglion neurons. *J Comp Neurol* 446, 267-275

Artinger K. B., Bronner-Fraser M. (1992): Partial restriction in the developmental potential of late emigrating avian neural crest cells. *Developmental Biology* 149, 149-157

Baetge G., Pintar J. E., Gershon M. D. (1990): Transiently catecholaminergic (TC) cells in the bowel of the fetal rat: precursors of noncatecholaminergic enteric neurons. *Developmental Biology* 141, 353-380

Balemans W., Van Hul W. (2002): Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Developmental Biology* 250, 231-250

Barald K. (1988a): Monoclonal antibodies made to chick mesencephalic neural crest cells and to ciliary ganglion neurons identify a common antigen on the neurons and a neural crest subpopulation. *J Neurosci Res* 21, 107-118

Barald K. (1988b): Antigen recognized by monoclonal antibodies to mesencephalic neural crest and to ciliary ganglion neurons is involved in the high affinity choline uptake mechanism in these cells. *J Neurosci Res* 21, 119-134

Barald K. (1989): Culture conditions affect the cholinergic development of an isolated subpopulation of chick mesencephalic neural crest cells. *Developmental Biology* 135, 349-366

Baroffio A., Dupin E., Le Douarin N. M. (1988): Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. *PNAS* 85, 5325-5329

Bellairs R., Osmond M. (1998): The Atlas of Chick Development. London: Academic Press
ISBN 0-12-084790-6

Benezra R., Davis R. L., Lockshorn D., Turner D. L., Weintraub H. (1990): The Protein Id: A negative Regulator of Helix-Loop-Helix DNA Binding Proteins. *Cell* 61,49-59

Brodski S., Schaubmar A., Dechant G. (2002): Opposing functions of GDNF and NGF in the development of cholinergic and noradrenergic sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 19, 528-538

Bronner-Fraser M., Fraser S. E. (1988): Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335, 161-164

Brosenitsch T. A., Katz D. M. (2001): Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-Type calcium channels. *J Neurosci* 21, 2571-2579

Brunet J.-F., Pattyn A. (2002): *Phox2* genes - from patterning to connectivity. *Current Opinion in Genetics & Development* 12, 435-440

Charité J., McFadden D. G., Olson E. N. (2000): The bHLH transcription factor dHAND controls *Sonic hedgehog* expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 127, 2461-2470

Charité J., McFadden D. G., Merlo G., Levi G., Clouthier D. E., Yanagisawa M., Richardson J. A., Olson E. N. (2001): Role of *Dlx6* in regulation of an endothelin-1-dependent, dHAND branchial arch enhancer. *Genes Dev* 15, 3039-3049

Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K. E., Corden J. L., Westphal H., Beachy P. A. (1996): Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature* 383, 407-413

Clouthier D. E., Williams S. C., Yanagisawa H., Wieduwilt M., Richardson J. A., Yanagisawa M. (2000): Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Developmental Biology* 217, 10-24

Cohen A. M. (1972): Factors directing the expression of sympathetic nerve traits in cells of neural crest origin. *J Exp Zool* 179, 167-182

Coulombe J. N., Bronner-Fraser M. E. (1986): Cholinergic neurons acquire adrenergic neurotransmitters when transplanted into an embryo. *Nature* 324, 569-572

Crossley P. H., Minowada G., MacArthur C. A., Martin G. R. (1996a): Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84, 127-136

Crossley P. H., Martinez S., Martin G. R. (1996b): Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380, 66-68

Cserjesi P., Brown D., Lyons G. E., Olson E. N. (1995): Expression of the Novel Basic Helix-Loop-Helix Gene *eHAND* in Neural Crest Derivatives and Extraembryonic Membranes during Mouse Development. *Developmental Biology* 170, 664-678

Dai Y.-S., Cserjesi P. (2002a): The Basic Helix-Loop-Helix Factor, HAND2, Functions as a Transcriptional Activator by Binding to E-boxes as a Heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry* 277(15), 12604-12612

Dai Y.-S., Cserjesi P., Markham B. E., Molkentin J. D. (2002b): The Transcription Factors GATA4 and dHAND Physically Interact to Synergistically Activate Cardiac Gene Expression through a p300-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 277(27), 24390-24398

Dai Y.-S., Hao J., Bonin C., Morikawa Y., Cserjesi P. (2004): JAB1 enhances HAND2 transcriptional activity by regulating HAND2 DNA binding. *J neurosci Res* 76, 613-622

Debby-Brafman A., Burstyn-Cohen T., Klar A., Kalcheim C. (1999): F-spondin, Expressed in Somite Regions Avoided by Neural Crest Cells, Mediates Inhibition of Distinct Somite Domains to Neural Crest Migration. *Neuron* 22, 475-488

Dudley A. T., Lyons K. M., Robertson E. J. (1995): A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9, 2795-2807

Dudley A. T., Robertson E. J. (1997): Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in *BMP7* deficient embryos. *Dev Dyn* 208, 349-362

Duong C. V., Geissen M., Rohrer H. (2002): The developmental expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) in cholinergic sympathetic neurons depends on cytokines signaling through LIFR β -containing receptors. *Development* 129, 1387-1396

Duprez D., Bell E. J., Richardson M. K., Archer C. W., Wolpert L., Brickell P. M., Francis-West P. H. (1996): Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev* 57, 145-157

Dupin E. (1984): Cell division in the ciliary ganglion of quail embryos in situ and after back-transplantation into the neural crest migration pathways of chick embryos. *Developmental Biology* 105, 288-299

Durbec P., Larsson-Blomberg L. B., Schuchardt A., Constantini F., Pachnis V. (1996b): Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122, 349-358

Ebendahl T., Bengtsson H., Söderström S. (1998): Bone Morphogenetic Proteins and Their Receptors: Potential Functions in the Brain. *J Neurosci Res* 51, 139-146

Eisen J. S., Weston J. A. (1993): Development of the neural crest in the zebrafish. *Developmental Biology* 159, 50-59

Erickson C. A., Loring J. F., Lester S. M. (1989): Migratory pathways of HNK-1-immunoreactive neural crest cells in the rat embryo. *Developmental Biology* 134, 112-118

Erickson C. A., Duong T. D., Tosney K. W. (1992): Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural rest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. *Developmental Biology* 151, 251-272

Erickson J. D., Varoqui H., Schäfer M. K.-H., Modi W., Diebler M.-F., Weihe E., Rand J., Eiden L. E., Bonner T. I., Usdin T. B. (1994): Functional Identification of a Vesicular Acetylcholine Transporter and its Expression from a "Cholinergic" Gene Locus. *J Biol Chem* 269, 21929-21932

Ernsberger U., Patzke H., Tissier-Seta J. P., Reh T., Goridis C., Rohrer H. (1995): The expression of tyrosine hydroxylase and the transcription factors cPhox2 and Cash-1: evidence for distinct inductive steps in the differentiation of chick sympathetic precursor cells. *Mech Dev* 52, 125-136

Ernsberger U., Patzke H., Rohrer H. (1997): The developmental expression of choline acetyltransferase (ChAT) and the neuropeptide VIP in chick sympathetic neurons: evidence for different regulatory events in cholinergic differentiation. *Mech Dev* 68, 115-126

Ernsberger U., Rohrer H. (1999): Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Cell Tissue Res.* 297, 339-361

Ernsberger U., Reissmann E. Mason I., Rohrer H. (2000a): The expression of dopamine β -hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and phox2 transcription factors in sympathetic neurons: evidence for common regulation during noradrenergic induction and diverging regulation later in development. *Mech Dev* 92, 169-177

Ernsberger U. (2000b): Evidence for an evolutionary conserved role of bone morphogenetic protein growth factors and Phox2 transcription factors during noradrenergic differentiation of sympathetic neurons. *Eur. J. Biochem.* 267, 6976-6981

Ferreiro B., Skoglund P., Bailey A., Dorsky R., Harris W. A. (1993): XASH1, a *Xenopus* homolog of achaete-scute: a proneural gene in anterior regions of the vertebrate CNS. *Mech Dev* 40, 25-36

Firulli B. A., Hadzic D. B., McDaid J. R., Firulli A. B. (2000): The Basic Helix-Loop-Helix Transcription factors dHAND and eHAND Exhibit Dimerization Characteristics That Suggest Complex Regulation of Function. *J Biol Chem* 275(43), 33567-33573

Firulli B. A., Howard M. J., McDaid J. R., McIlreavey L., Dionne K. M., Centonze V. E., Cserjesi P., Virshup D. M., Firulli A. B. (2003): PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol. Cell* 12, 1225-1237

Frank E., Sanes J. R. (1991): Lineage of neurons and glia in chick dorsal root ganglia: analysis in vivo with a recombinant retrovirus. *Development* 111, 895-908

Fraser S. E., Bronner-Fraser M. (1991): Migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo are multipotent. *Development* 112, 913-920

Fuhrmann S., Levine E. M., Reh T. A. (2000): Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* 127, 4599-4609

Gehring W. J., Müller M., Affolter M., Percival-Smith A., Billeter M., Qian Y. Q., Otting G., Wuthrich K. (1990): The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet* 6, 323-329

Geissen M., Heller S., Pennica D., Ernsberger U., Rohrer H. (1998): The specification of sympathetic neurotransmitter phenotype depends on gp130 cytokine receptor signaling. *Development* 125, 4791-4801

Goridis C., Rohrer H. (2002): Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nature Reviews* 3, 531-541

Grammatopoulos G. A., Bell E., Toole L., Lumsden A., Tucker A. (2000): Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Development* 127, 5355-5365

Groves A. K., George K. M., Tissier-Seta J.-P., Engel J. D., Brunet J.-F., Anderson D. J. (1995): Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons. *Development* 121, 887-901

Grzanna R., Coyle J. T. (1978): Dopamine- β -hydroxylase in rat submandibular ganglion cells which lack norepinephrine. *Brain Res* 1151, 206-214

Guillemot F., Joyner A. L. (1993): Dynamic expression of the murine achaete-scute homologue *mash-1* in the developing nervous system. *Mech Dev* 42, 171-185

Guillemot F., Lo L.-C., Johnson J. E., Auerbach A., Anderson D. J., Joyner A. L. (1993): Mammalian *achaete-scute* Homolog 1 Is Required for the Early Development of Olfactory and Autonomic Neurons. *Cell* 75, 463-476

Guo S., Brush J., Teraoka H., Goddard A., Wilson S. W., Mullins M. C., Rosenthal A. (1999): Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein *soulless/Phox2a*. *Neuron* 24, 555-566

Hamburger V., Hamilton H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88, 49-91; Nachdruck 1992: *Dev Dyn* 195, 231-272

Hammond W. S., Yntema C. L. (1958): Origin of ciliary ganglia in the chick. *J. Comp. Neurol.* 110, 367-389

Hashino E., Shero M., Junghans D., Rohrer H., Milbrandt J., Johnson E. M. Jr. (2001): GDNF and neurturin are target-derived factors essential for cranial parasympathetic neuron development. *Development* 128, 3773-3782

Hemmati-Brivanlou A., Melton D. (1997): Vertebrate neural induction. *Annu Rev Neurosci* 20, 43-60

Henion P. D., Weston J. A. (1997): Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124, 4351-4359

Heyworth C., Gale K., Dexter M., May G., Enver T. (1999): A GATA-2/estrogen receptor chimera functions as a ligand-dependent negative regulator of self-renewal. *Genes Dev* 13, 1847-1860.

Hirsch M. R., Tiveron M. C., Guillemot F., Brunet F.-J., Golidis C. (1998): Control of noradrenergic differentiation and *Phox2a* expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* 125, 599-608

Hogan B. L. M. (1996): Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics & Development* 6, 432-438

Höltke H. J., Ankenbauer W., Muhlegger K., Rein R., Sagner G., Seibl R., Walter T. (1995): The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 41, 883-905

Hollenberg S. M., Sternglanz R., Cheng P. F., Weintraub H. (1995): Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol* 15, 3813-3822

Homburger S. A., Fekete D. M. (1996): High Efficiency Gene Transfer Into the Embryonic Chicken CNS Using B-Subgroup Retroviruses. *Dev Dyn* 206, 112-120

Hong S. J., Kim C.-H., Kim K.-S. (2001): Structural and functional characterization of the 5' upstream promoter of the human *Phox2a* gene: possible direct transactivation by the transcription factor Phox2b. *Journal of Neurochemistry* 79, 1225-1236

Howard M. J., Bronner-Fraser M. (1985): The influence of neural tube-derived factors on differentiation of neural crest cells in vitro. I. Histochemical study on the appearance of adrenergic cells. *J Neuroscience* 5, 3302-3309

Howard M. J., Bronner-Fraser M. (1986): Neural tube-derived factors influence differentiation of neural crest cells in vitro: effects on activity of neurotransmitter biosynthetic enzymes. *Developmental Biology* 117, 45-54

Howard M., Foster D. N., Cserjesi P. (1999): Expression of *HAND* Gene Products May Be Sufficient for the Differentiation of Avian Neural Crest-Derived Cells into Catecholaminergic Neurons in Culture. *Developmental Biology* 215, 62-77

Howard M. J., Stanke M., Schneider C., Wu X., Rohrer H. (2000): The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification. *Development* 127, 4073-4081

Iacovitti L., Joh T.H., Albert V. R., Park D. H., Reis D. J., Teitelman G. (1985): Partial expression of catecholaminergic traits in cholinergic chick ciliary ganglia: studies *in vivo* and *in vitro*. *Developmental Biology* 110, 402-412

Ito K., Sieber-Blum M. (1991): In vitro clonal analysis of quail cardiac neural crest development. *Developmental Biology* 148, 95-106

Jacobson A. G., Miyamoto D. M., Mai S. H. (1979): Rathke's pouch morphogenesis in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 207, 351-366

Jan Y. N., Jan L. Y. (1993): HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75, 827-830

Jessell, T. M., Lumsden A. (1998): Inductive signals and the assignment of cell fate in the spinal cord and hindbrain. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development* (ed. W. M. Cowan), pp 290-333. Oxford: Oxford University Press

Jögi A., Persson P., Grynfeld A., Pählman S., Axelson H. (2002): Modulation of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Complex Formation by Id Proteins during Neuronal Differentiation. *J Biol Chem* 277, 9118-9126

Johnson J. E., Birren S. J., Anderson D. J. (1990): Two rat homologues of *Drosophila achaete-scute* specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346, 858-861

Johnson J. E., Birren S. J., Saito T., Anderson D. J. (1992): DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. PNAS. 89, 3596-3600

Jonakait G. M., Wolf J., Cochard P., Glodstein M., Black I. B. (1979): Selective loss of noradrenergic phenotypic characters in neuroblasts of the rat embryo. PNAS 76, 4683-4686

Jones C. M., Armes N., Smith J. C. (1996): Signalling by TGF-beta family members: short-range effects of Xnr-2 and BMP-4 contrast with the long-range effects of activin. Curr Biol 6, 1468-1475

Kapur R. P., Hoyle G. W., Mercer E. H., Brinster R. L., Palmiter R. D. (1991): Some neuronal cell populations express human dopamine- β -hydroxylase-lacZ transgenes transiently during embryonic development. Neuron 7, 717-727

Katz D. M., Erb M. J. (1990): Developmental regulation of tyrosine hydroxylase expression in primary sensory neurons of the rat. Developmental Biology 137, 233-242

Kim H.S., Seo H., Yang C., Brunet J.-F., Kim K.-S. (1998): Noradrenergic-specific transcription of the dopamine- β -hydroxylase gene requires synergy of multiple *cis*-acting elements including at least two Phox2a-binding sites. J. Neuroscience 18, 8247-8260

King J. A., Marker P. C., Seung K. J., Kingsley D. M. (1994): BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in *short ear* mice. Developmental Biology 166, 112-122

Kingsley D. M., Bland A. E., Grubber J. M., Marker P. C., Russell L. B., Copeland N. G., Jenkins N. A. (1992): The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. Cell 71, 399-410

Kirby M. L. (1989): Plasticity and predetermination of mesencephalic and trunk neural crest transplanted into the region off the cardiac neural crest. Developmental Biology 134, 402-412

Klooster J., Beckers H. J., Vrensen G. F., van der Want J. J. (1993): The peripheral and central projections of the Edinger-Westphal nucleus in the rat. A light and electron microscopic tracing study. *Brain Res* 632(1-2), 260-273

Kuhlbrodt K., Herbarth B., Sock E., Hermans-Borgmeyer I., Wegner M. (1998): Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neuroscience* 18, 237-250

La Bonne C., Bronner-Fraser M. (1998): Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J Neurobiology* 36, 175-189

Lamb T. M., Knecht A. K., Smith W. C., Stachel S. E., Economides A. N., Stahl N., Yancopoulos G. D., Harland R. M. (1993): Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 262, 713-718

Landis S. C., Jackson P. C., Fredien J. R., Thibault J. (1987): Catecholaminergic properties of cholinergic neurons and synapses in adult rat ciliary ganglion. *J. Neuroscience* 7, 3574-3587

Landmesser L., Pilar G. (1972): The onset and development of transmission in the chick ciliary ganglion. *J Physiol.* 222, 691-713

Landmesser L., Pilar G. (1974): Synapse formation during embryogenesis on ganglion cells lacking a periphery. *J. Physiol.* 247, 715-736

Laughon A. (1991): DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* 30, 11357-11367

Leblanc G. C., Landis S. C. (1988): Target specificity of neuropeptide Y-immunoreactive cranial parasympathetic neurons. *J Neurosci* 8, 146-155

Leblanc G. C., Landis S. C. (1989): Differentiation of noradrenergic traits in the principal neurons and small intensely fluorescent cells of the parasympathetic sphenopalatine ganglion of the rat. *Developmental Biology* 131, 44-59

Le Douarin N. M., Teillet M.-A. (1973): The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30, 31-48

Le Douarin N. M., Teillet M.-A. (1974): Experimental Analysis of the Migration and Differentiation of Neuroblasts of the Autonomic Nervous System and of Neuroectodermal Mesenchymal Derivatives, using a Biological Cell Marking Technique. *Developmental Biology* 41, 162-184

Le Douarin N. M., Renaud D., Teillet M.-A., Le Douarin G. H. (1975): Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after heterotopic transplantations. *PNAS* 72, 728-732

Le Douarin N. M., Teillet M.-A., Ziller C., Smith J. (1978): Adrenergic differentiation of cells of the cholinergic ciliary and Remak ganglia in avian embryo after in vivo transplantation. *PNAS* 75, 2030-2034

Le Douarin N. M., Kalcheim C. (1999): *The Neural Crest. Developmental and Cell Biology Series 36.* Cambridge University Press, Cambridge, 2nd ed.

Le Douarin N. M., Dupin E. (2003): Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 13, 529-536

Lee J. E., Hollenberg S. M., Snider L., Turner D. L., Lipnick N., Weintraub H. (1995): Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844

Lee K. J., Jessell T. M. (1999): The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22, 261-294

Lee S.-K., Pfaff S. L. (2001): Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nature neuroscience supplement* 4, 1183-1191

Lee V. M., Smiley G. G., Nishi R. (2001): Cell death and neuronal replacement during formation of the avian ciliary ganglion. *Developmental Biology* 233, 437-448

Lee V. M., Sechrist J. W., Luetolf S., Bronner-Fraser M. (2003): Both neural crest and placode contribute to the ciliary ganglion and oculomotor nerve. *Developmental Biology* 263, 176-290

Liem K. F. Jr., Tremml G., Roelink H., Jessell T. M. (1995): Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979

Liem K. F. Jr., Tremml G., Jessell T. M. (1997): A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127-138

Lim K. C., Lakshmanan G., Crawford S. E., Gu Y., Grosveld F., Engel J. D. (2000): Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nature Genetics* 25, 209-212

Lips K. S., Pfeil U., Haberberger R. V., Kummer W. (2002): localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit. *Cell Tissue Res* 307, 275-280

Lo L. C., Johnson J. E., Wuenschell C. W., Saito T., Anderson D. J. (1991): Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* 5, 1524-1537

Lo L., Tiveron M.-C., Anderson D. J. (1998): *MASH1* activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* 125, 609-620

Lo L., Morin X., Brunet J.-F., Anderson D. J. (1999): Specification of Neurotransmitter Identity by Phox2 Proteins in Neural Crest Stem Cells. *Neuron* 22, 693-705

Luo G., Hofmann C., Bronckers A. L. J. J., Sohocki M., Bradley A., Karsenty G. (1995): BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9, 2808-2820

Lyons K. M., Hogan B. L., Robertson E. J. (1995): Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev* 50, 71-83

Mallet J., Houhou L., Pajak F., Oda Y., Cervini R., Benjanin S., Berrard S. (1998): The cholinergic locus: ChAT and VAcHT genes. *J Physiol Paris* 92, 145-147

Martinsen B. J., Bronner-Fraser M. (1998): Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* 281, 988-991

Marusich M. F., Pourmehr K., Weston J. A. (1986): A monoclonal antibody (SN1) identifies a subpopulation of avian sensory neurons whose distribution is correlated with axial level. *Developmental Biology* 118, 494-504

Marusich M. F., Weston J. A. (1992): Identification of early neurogenic cells in the neural crest lineage. *Developmental Biology* 149, 295-306

Marwitt R., Pilar G., Weakly J. N. (1971): Characterization of two ganglion cell populations in avian ciliary ganglia. *Brain Res.* 25, 317-334

McFadden D. G., Charité J., Richardson J. A., Srivastava D., Firulli A. B., Olson E. N. (2000): A GATA-dependent right ventricular enhancer controls *dHAND* transcription in the developing heart. *Development* 127, 5331-5341

McFadden D. G., McAnally J., Richardson J. A., Charité J., Olson E. N. (2002): Misexpression of *dHAND* induces ectopic digits in the developing limb bud in the absence of direct DNA binding. *Development* 129, 3077-3088

McMahon A. P., Bradley A. (1990): The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-1085

McPherson C. E., Varley J. E., Maxwell G. D. (2000): Expression and Regulation of Type I BMP Receptors during Early Avian Sympathetic Ganglion Development. *Developmental Biology* 221, 220-232

Mehler M. F., Mabie P. C., Zhang D., Kessler J. A. (1997): Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 20, 309-317

Mercer E. H., Hoyle G. W., Kapur R. P., Brinster R. L., Palmiter R. D. (1991): The dopamine β -hydroxylase gene promoter directs expression of *E. coli lacZ* to sympathetic and other neurons in adult transgenic mice. *Neuron* 7, 703-716

Misawa H., Nakata K., Matsuura J., Nagao M., Okuda T., Haga T. (2001): distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 105, 87-98

Morin X., Cremer H., Hirsch M. R., Kapur R. P., Goridis C., Brunet J.-F. (1997): Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene *Phox2a*. *Neuron* 18, 411-423

Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.-H. (2001): Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Science* 114, 4359-4369

Murakami M., Kataoka K., Fukuhara S., Nakagawa O., Kurihara H. (2004): Akt-dependent phosphorylation negatively regulates the transcriptional activity of dHAND by inhibiting the DNA binding activity. *Eur J Biochem* 271, 3330-3339

Narayanan C. H., Narayanan Y. (1978b): On the origin of the ciliary ganglion in birds studied by the method of interspecific transplantation of embryonic brain regions between quail and chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 47, 137-148

Noden D. M. (1975): An Analysis of the Migratory Behavior of Avian Cephalic Neural Crest Cells. *Developmental Biology* 42, 106-130

Noden D. M. (1978a): The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissues. *Developmental Biology* 67, 296-312

Noden D. M. (1978b): The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. II. Neural tissues. *Developmental Biology* 67, 313-329

Norr S. C. (1973): In vitro analysis of sympathetic neuron differentiation from chick neural crest cells. *Developmental Biology* 34, 16-38

Ohkawara B., Iemura S.-I., ten Dijke P., Ueno N. (2002): Action Range of BMP Is Defined by Its N-Terminal Basic Amino Acid Core. *Curr Biol* 12, 205-209

Okuda T., Haga T., Kanai Y., Endou H., Ishihara T., Katsura I. (2000): Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature neuroscience* 3, 120-125

Okuda T., Haga T. (2003): High-Affinity Choline Transporter. *Neurochem Res.* 28, 483-488

Olson E. N., Klein W. H. (1994): bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* 8, 1-8

Overbeek P. (1997): Right and Left go dHAND and eHAND. *Nature genetics* 16, 119-121

Pattyn A., Morin X., Cremer H., Goridis C., Brunet J.-F. (1997): Expression and interactions of the two closely related homeobox genes *Phox2a* and *Phox2b* during neurogenesis. *Development* 124, 4065-4075

Pattyn A., Morin X., Cremer H., Goridis C., Brunet J.-F. (1999): The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399, 366-370

Pattyn A., Goridis C., Brunet J.-F. (2000): Specification of the Central Noradrenergic Phenotype by the Homeobox Gene *Phox2b*. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15, 235-243

Patzke H., Reissmann E., Stanke M., Bixby J. L., Ernsberger U. (2001): BMP growth factors and Phox2 transcription factors can induce synaptotagmin I and neurexin I during sympathetic neuron development. *Mech Dev* 108, 149-159

Raible D. W., Wood A., Hodsdon W., Henion P. D., Weston J. A., Eisen J. S. (1992): Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Dev Dyn.* 195, 29-42

Raible D. W., Eisen J. S. (1994): Restriction of neural crest cell fate in the trunk of the embryonic zebrafish. *Development* 120, 495-503

Raible D. W., Eisen J. S. (1996): Regulative interactions in zebrafish neural crest. *Development* 122, 501-507

Reiner A., Erichsen J. T., Cabot J. B., Evinger C., Fitzgerald M. E., Karten H. J. (1991): Neurotransmitter organization of the nucleus of Edinger-Westphal and its projection to the avian ciliary ganglion. *Vis Neurosci* 6(5), 451-472

Reissmann E., Ernsberger U., Francis-West P. H., Rueger D., Brickell P. M., Rohrer H. (1996): Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* 122, 2079-2088

Rijli F. M., Mark M., Lakkaraju S., Dietrich A., Dolle P., Chambon P. A. (1993): Homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell* 75, 1333-1349

Rubin E. (1985): Development of the rat superior cervical ganglion: ganglion cell maturation. *J. Neurosci.* 5, 673-684

Rubinstein J. L. R., Shimamura K. (1998): Regulation of patterning and differentiation in the developing forebrain. *Molecular and Cellular Approaches to Neuroal Development* (ed. W. M. Cowan), pp. 356-390. Oxford: Oxford University Press

Rychlik J. L., Gerbasi V., Lewis E. J. (2003): The interaction between dHAND and Arix at the dopamine beta-hydroxylase promoter region is independent of direct dHAND binding to DNA. *J Biol Chem* 278, 49652-49660

Schaeren-Wiemers N., Gerfin-Moser A. (1993): A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100, 431-440

Schneider C., Wicht H., Enderich J., Wegner M., Rohrer H. (1999): Bone Morphogenic Proteins Are Required In Vivo for the Generation of Sympathetic Neurons. *Neuron* 24, 861-870

Schweizer G., Ayer-Lelievre C., Le Douarin N. M. (1983): Restrictions of developmental capacities in the dorsal root ganglia in the course of development. *Cell Differ* 13, 191-200

Scott M. P., Tamkun J. W., Hartzell G. W. (1989): The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 989, 25-48

Sechrist J. W., Wolf J., Bronner-Fraser M. (1998): Age-dependent neurotransmitter plasticity of ciliary ganglion neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 12, 311-323

Selleck M. A., Garcia-Castro M. I., Artinger K. B., Bronner-Fraser M. (1998): Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm. *Development* 125, 4919-4930

Seo H., Hong S. J., Guo S., Kim H.-S., Kim C.-H., Hwang D.-Y., Isacson O., Rosenthal A., Kim K.-S. (2002): A direct role of the homeodomain proteins Phox2a/2b in noradrenaline neurotransmitter identity determination. *Journal of Neurochemistry* 80, 905-916

Serbedzija G. N., Bronner-Fraser M., Fraser S. E. (1989): A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* 106, 809-816

Serbedzija G. N., Fraser S. E., Bronner-Fraser M. (1990): Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Development* 108, 605-612

Shah N. M., Groves A. K., Anderson D. J. (1996): Alternative Neural Crest Cell Fates Are Instructively Promoted by TGF β Superfamily Members. *Cell* 85, 331-343

Sieber-Blum M., Cohen A. M. (1980): Clonal analysis of quail neural crest cells: they are pluripotent and differentiate in vitro in the absence of neoncrest cells. *Developmental Biology* 80, 96-106

Smith W. C., Harland R. M. (1992): Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70(5), 829-840

Solloway M. J., Robertson E. J. (1999): Early embryonic lethality in *BMP5;BMP7* double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* 126, 1753-1768

Srivastava D., Cserjesi P., Olson E. N. (1995): A Subclass of bHLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis. *Science* 270, 1995-1999

Srivastava D., Thomas T., Lin Q., Kirby M. L. Brown D., Olson E. N. (1997): Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nature genetics* 16, 154-160

Stanke M., Junghans D., Geissen M., Goridis C., Ernsberger U., Rohrer H (1999): The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons. *Development* 126, 4087-4094

Stein R., Mori N., Matthews K., Lo I. C., Anderson D. J. (1988): The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons. *Neuron* 1, 463-476

Stemple D. L., Anderson D. J. (1992): Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973-985

Stern C. D., Artinger K. B., Bronner-Fraser M. (1991): tissue interactions affecting the migration and differentiation of neural crest cells in the chick embryo. *Development* 113, 207-216

Sun X.-H., Copeland N. G., Jenkins N. A., Baltimore D. (1991): Id Proteins Id1 and Id2 Selectively Inhibit DNA Binding by One Class of Helix-Loop-Helix Proteins. *Mol and Cell Biol* 11, 5603-5611

Swanson D. J., Zellmer E., Lewis E. J. (1997): The homeodomain protein arix interacts synergistically with cyclic AMP to regulate expression of neurotransmitter biosynthetic genes. *J Biol Chem* 272, 27382-27392

Swanson D. J., Zellmer E., Lewis E. J. (1998): AP1 proteins mediate the cAMP response of the dopamine-beta-hydroxylase gene. *J Biol Chem* 273, 24065-24074

Swanson D. J., Adachi M., Lewis E. J. (2000): The homeodomain protein Arix promotes protein kinase A-dependent activation of the dopamine β -hydroxylase promoter through multiple elements and interaction with the coactivator cAMP-response element-binding protein-binding protein. *J Biol Chem* 275, 2911-2923

Teillet M. A., Le Douarin N. M. (1983): Consequences of neural tube and notochord excision on the development of the peripheral nervous system in the chick embryo. *Developmental Biology* 98, 192-211

Teillet M.-A., Cochard P, Le Douarin N. M. (1987):Formation off the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Developmental Biology* 120, 329-347

Teitelman G., Joh T. H., Grayson L., Park D. H., Reis D. J., Iacovitti L. (1985): Cholinergic neurons of the chick ciliary ganglia express adrenergic traits in vivo and in vitro. *J. Neuroscience* 5, 29-39

Timmer J. R., Wang C., 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

Tiveron M.-C., Hirsch M.-R., Brunet J.-F. (1996): The expression pattern of the transcription factor Phox2a delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. *J. Neuroscience* 16, 7649-7660

Thomas K. R., Capecchi M. R. (1990): Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346, 847-850

Thomas T., Kurihara H., Yamagishi H., Kurihara Y., Yazaki Y., Olson E. N., Srivastava D. (1998): A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and msx1 regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme. *Development* 125, 3005-3014

Trainor P. A., Krumlauf R. (2000): Plasticity in mouse neural crest cells reveals a new patterning role for cranial mesoderm. *Nature Cell Biol* 2, 96-102

Trainor P. A., Krumlauf R. (2001): Hox genes, neural crest cells and branchial arch patterning. *Curr Opin Cell Biol* 13, 698-705

Tsarovina K., Pattyn A., Stubbusch J., Müller F., Brunet J.-F., Rohrer H. (2004): Role of Gata2/3 transcription factors in noradrenergic differentiation. *Development*, 131, 4775-4786

Tyrrell S., Siegel R. E., Landis S. C. (1992): Tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y are increased in ciliary ganglia of sympathectomized rats. *Neuroscience* 47, 985-998

Valarché I., Tissier-Seta J.-P., Hirsch M.-R., Martinez S., Goridis C., Brunet J.-F. (1993): The mouse homeodomain protein Phox2 regulates *Ncam* promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* 119, 881-896

Varley J. E., Wehby R. G., Rueger D. C., Maxwell G. D. (1995): Number of adrenergic and islet-1 immunoreactive cells is increased in avian trunk neural crest cultures in the presence of human recombinant osteogenic protein-1. *Dev Dyn* 203, 434-447

Varley J. E., Maxwell G. D. (1996): BMP-2 and BMP-4, but not BMP-6, increase the number of adrenergic cells which develop in quail trunk neural crest cultures. *Exp. Neurol.* 140, 84-94

Vogel-Höpker A., Momose T., Rohrer H., Yasuda K., Ishihara L., Rapaport D. H. (2000): Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mech Dev* 94, 25-36

Vogel-Höpker A., Rohrer H. (2002): The development of noradrenergic locu coeruleus (LC) neurons depends on bone morphogenetic proteins (BMPs). *Development* 129, 983-991

Weintraub H., Genetta T., Kadesch T. (1994): Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements. *Genes Dev* 8, 2203-2211

White P., Morrison S. J., Orimoto K., Kubu C. J., Verdi J. M., Anderson D. J. (2001): Neural Crest Stem Cells Undergo Cell-Intrinsic Developmental Changes in Sensitivity to Instructive Differentiation Signals. *Neuron* 29, 57-71

Winnier G., Blessing M., Labosky P. A., Hogan B. L. (1995): Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9, 2105-2116

Wu X., Howard M. J. (2001): Two Signal Transduction Pathways Involved in the Catecholaminergic Differentiation of Avian Neural Crest-Derived Cells *In Vitro*. *Molecular and Cellular Neuroscience* 18, 394-406

Xu H., Firulli A. B., Zhang X., Howard M. J. (2003): HAND2 synergistically enhances transcription of dopamine- β -hydroxylase in the presence of Phox2a. *Developmental Biology* 262, 183-193

Yamagishi H., Garg V., Matsuoka R., Thomas T., Srivastava D. (1999): A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science* 283, 1158-1161

Yamagishi H., Olson E. N., Srivastava D. (2000): The basic helix-loop-helix transcription factor, *dHAND*, is required for vascular development. *J Clin Invest* 105(3), 261-70

Yanagisawa H., Clouthier D. E., Richardson J. A., Charité J., Olson E. N. (2003): Targeted deletion of a branchial arch-specific enhancer reveals a role of *dHAND* in craniofacial development. *Development* 130, 1069-1078

Yang C., Kim H.-S., Seo H., Kim C.-H., Brunet J.-F., Kim K.-S. (1998): Paired-Like Homeodomain Proteins, *Phox2a* and *Phox2b*, Are Responsible for Noradrenergic Cell-Specific Transcription of the Dopamine β -Hydroxylase Gene. *Journal of Neurochemistry*, 71-5, 1813-

Yelon D., Ticho B., Halpern M. E., Ruvinsky I., Ho R. K., Silver L. M., Stainier D. Y. (2000): The bHLH transcription factor *hand2* plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development* 127(12): 2573-2582

Zellmer E., Zhang Z., Greco D., Rhodes J, Cassel S., Lewis E. J. (1995): A homeodomain protein selectively expressed in noradrenergic tissue regulates transcription of neurotransmitter biosynthetic genes. *J. Neuroscience* 15, 8109-8120

Zhang H., Bradley A. (1996): Mice deficient for *BMP2* are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122, 2977-2986

Zhuang Y, Soriano P., Weintraub H. (1994): The helix-loop-helix gene *E2A* is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-884

Zimmerman L. B., De Jesús-Escobar J. M., Harland R. M. (1996): The Spemann organizer signal *noggin* binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606

Danksagung

Ich möchte mich zum Schluß bei denjenigen Menschen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben:

Bei Hermann Rohrer möchte ich mich dafür bedanken, daß ich die Arbeit bei ihm anfertigen konnte. Für ständigen Optimismus während der gesamten Zeit, für die Diskussionen und Ideen, die in meine Arbeit eingeflossen sind und dafür, daß er einfach ein großartiger Chef ist, vielen Dank, Hermann.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe, d. h. bei Markus, Carolin, Christina, Roland, Chi, Jutta, Maren, Astrid, Nina, Manuela, Matthias und Sabine möchte ich mich für die super angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Dafür, daß ich mich während meiner Doktorarbeit hier so wohl gefühlt habe. Für anregende Diskussionen. Für Kännchen, Kippchen, Kicker. Bei Sabine möchte ich mich besonders bedanken, für die Freundschaft und Hilfsbereitschaft.

Bei meinen Eltern und meinen Geschwistern möchte ich mich bedanken, hier besonders bei meinem Vater für 36 Jahre Unterstützung.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die jetzt hier anonym bleiben werden. Ohne Eure Erfahrung, Kraft und Hoffnung hätte ich niemals meine Doktorarbeit schreiben können.

Lebenslauf

Frank Müller

Geboren am 24. Mai 1968 in Stolzenau

von 1974-1978	Grundschule Hambühren
von 1978-1988	Hölty-Gymnasium in Celle
von 1988-1989	Albert-Schweitzer-Schule in Nienburg/Weser mit Abschluß Abitur
WS 1991/92-SS 1992	Studium Wirtschaftsingenieurwesen an der Universität- Gesamthochschule Paderborn
WS 1992/93-SS 2000	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe- Universität in Frankfurt am Main
SS 1994	Vordiplom
SS 1999	Diplomhauptprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik und organische Chemie
SS 1999-Mai 2000	Diplomarbeit an der TU Darmstadt in der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie bei Prof. Dr. T. W. Holstein
seit Mai 2000	angestellt als Doktorand am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in der Arbeitsgruppe Entwicklungs- neurobiologie bei Prof. Dr. H. Rohrer

Eidesstattliche Versicherung:

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über die

„Molekulare Kontrolle der Entwicklung des parasymphatischen Ciliarganglions“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben. Die Implantationen der RCAS-Virus-infizierten Zellaggregate wurden von Prof. Dr. H. Rohrer durchgeführt.

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)