

Transkriptionelle Kontrolle der Differenzierung sympathischer Nervenzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Dipl. Biol. Matthias Stanke

Frankfurt am Main, 08/2002

(DF 1)

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

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

Dekan:
Gutachter:

Prof. Dr. Streit
Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn
Prof. Dr. H. Rohrer

Datum der Disputation:

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht oder sind in Vorbereitung:

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

Howard, M. J., **Stanke**, M., Schneider, C., Wu, X. und Rohrer, H. (2000). The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification. *Dev.* 127 (18), 4073-81.

Stanke, M. und Rohrer, H. (2002). Autonomic neuron generation from peripheral nerve precursor cells involve a network of crossregulating transcription factors.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ASH	Achaete-scute Homolog(e)
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bn	Brachialnerv
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Cash	Chicken achaete-scute homologue
cDNA	komplementäre DNA
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
dA	dorsale Aorta
DBH	Dopamin-beta-Hydroxylase
dHand	<u>d</u> eciduum, <u>h</u> ear <u>t</u> , <u>a</u> utonomic nervous system, <u>n</u> eural crest <u>d</u> erivatives
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpp	decapentaplegic
E	Embryonaltag
EE	Embryoextrakt
eHand	<u>e</u> xtraembryonic membranes, <u>h</u> ear <u>t</u> , <u>a</u> utonomic nervous system, <u>n</u> eural crest <u>d</u> erivatives
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothicyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
HH	Hamilton/Hamburger
HS	Pferdeserum
HWG	Hinterwurzelganglion
IPTG	Isopropyl-b-Thiogalactosid
kb	Kilo-Basenpaare
kD	Kilo-Dalton
Mash	Mammalian achaete-scute homologue
NBT	Nitroblautraxolium
NC	Notochord
NF	Neurofilament
NR	Neuralrohr
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Phox2	paired like homoedomain containing protein
PNS	Peripheres Nervensystem
RT	Reverse Transkriptase
SG	Sympathisches Ganglion
TH	Tyrosinhydroxylase
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute

VAChT	Vesikulärer Acetylcholintransporter
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung	10
1.1. Transkriptionelle Regulation der Organogenese von Metazoen	10
1.2. Der Sympathikus als Modellsystem zum Studium neuronaler Organisation	10
1.3. Die Herkunft sympathischer Nervenzellen	12
1.4. Noradrenerge und panneuronale Markergene zeigen die terminale Differenzierung sympathischer Neurone an	13
1.5. BMP-Signale initiieren die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren	15
1.6. Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die an der Weiterleitung des induktiven BMP-Signals beteiligt sind	16
-Cash-1/Mash-1	16
-Phox2a und Phox2b	17
-dHand	17
1.7. Transkriptionsfaktoren, die an der Differenzierung sympathischer Nervenzelle beteiligt sind, müssen durch BMP reguliert werden.	18
1.8. Replikationskompetente Viren erlauben die Untersuchung von Transkriptionsfaktoren in transgenen Huhn-Chimären	19
1.9. Ist die Aktivität der Phox2-, Mash-1/Cash-1- und dHand-Transkriptionsfaktoren ausreichend, in vivo die Bildung des sympathischen Phänotyps zu induzieren?	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Herstellernachweise	21
2.1.2. Lösungen	22
Lösungen für die Zellbiologie	22
Lösungen für die Molekularbiologie	22
Lösungen für die Immunocytochemie	22
Lösungen für in-situ-Hybridisierungen	22
2.1.3. Medien	23
Medien für die Zellkultur	23
Medien für die Bakterienkultur	23
2.1.4. Immunologische Reagentien	23
Antikörper	23
2.1.5. Faktoren	24
2.1.6. DNS	24
virale Konstrukte	24
Plasmide für Sondensynthesen	24
Oligonukleotide	24
2.1.7. Organismen	24

2.2. Methoden	25
2.2.1. Zellkultur	25
Präparation und Kultivierung primärer Fibroblasten	
Passagieren und Kultivierung von Huhn-Fibroblasten	25
Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	26
Transfektion von Fibroblasten	26
2.2.1.2. RCAS-Virus	26
Viruskonzentrierung	26
Bestimmung des Virustiters	27
2.2.2. Kultivierung und Präparation von Hinterwurzelganglien	27
Vorbehandlung der Kulturschalen	27
Präparation und Kulturbedingungen	27
2.2.3. Implantation von Fibroblastenaggregaten	27
2.2.4. Präparation und Fixierung von Embryonen	28
2.2.5. Anfertigen von Gefrierschnitten	28
2.2.6. Antikörperfärbungen	28
Immunhistochemische Färbung auf Gewebeschnitten	28
Immuncytochemische Färbungen auf Kulturen	29
2.2.7. In-situ-Hybridisierung	29
In-situ-Hybridisierung auf Gewebeschnitten	29
Doppel-in-situ-Hybridisierung	30
In-situ-Hybridisierung auf kultivierten Zellen	30
2.2.8. Molekularbiologische Methoden	31
Vermehrung von Plamid-DNS	31
Präparation von Plasmid-DNS	31
DNS-Sequenzierung	31
Restriktionsspaltung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNS	31
Herstellung von RNS-Hybridisierungssonden durch in vitro-Transkription	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Überexpression von Transkriptionsfaktoren	33
3.1.1. Phox2a	33
Phox2-Transkriptionsfaktoren sind ausreichend, in Neuralleistenzellkulturen die Expression noradrenerger Markergene auszulösen.	33
Phox2-Transkriptionsfaktoren sind ausreichend, um in vivo die ektopische Expression von TH auszulösen.	35
Undifferenzierte Vorläuferzellen im peripheren Nervensystem werden durch Phox2-Faktoren zur Differenzierung gebracht.	35

Durch die Überexpression von Phox2 werden noradrenerge und panneuronale Markergene induziert	36
Die Überexpression von Phox2a und Phox2b in vivo führt zur ektopischen Differenzierung sympathischer Nervenzellen.	37
3.1.2. Phox2b	39
3.1.3. dHand und eHand	40
dHand ist früh in den sympathischen Ganglien exprimiert	40
eHand wird erst spät in den sympathischen Ganglien exprimiert	41
in vivo-Überexpression von dHand ist ausreichend, noradrenerge und neuronal Zellen zu induzieren	42
Die dHand-induzierten ektopischen Zellen im Brachialnerv exprimieren beide Phox2-Transkriptionsfaktoren	43
3.1.4. Mash-1	44
Mash-1 ist ein starker Regulator neuronaler Gene	44
Mash-1 überexprimierende Embryonen zeigen ektopische noradrenerge Differenzierung	45
Mash-1 rekrutiert die Transkriptionsfaktoren Phox2b, dHand und Phox2a	46
3.2. BMP induziert die Expression der Transkriptionsfaktoren Phox2b und dHand in Zellen des Brachialnervs.	47
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4. Diskussion	49
4.1.1. Die Überexpression von Transkriptionsfaktoren führt zur ektopischen neuronalen Differenzierung	49
4.1.2. Unterschiede zu anderen autonomen peripheren Phänotypen	50
4.1.3. Identität der reagierenden Zellen	51
4.1.4. Differentielle Antwort auf die Überexpression von Transkriptionsfaktoren in neuralen und nichtneuralen Geweben	52
4.2. Weitere Regulationswege noradrenerger Gene	54
Der CAMP-PKA-Signalweg	56
Sauerstoffkonzentrationsabhängige Regulation	56
Der MAPK-Signalweg	56
Mögliche Überschneidungen der Signalwege	57
4.3. Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren	57
4.4. Cash-1/Mash-1 in der neuronalen Differenzierung	58
4.5. Die Beziehung zwischen ASH-Faktoren und BMP	59
4.6. Notch/Delta-Signale in der Sympathogenese	59
4.7. Mögliche Aufgaben von eHand in der sympathischen Differenzierung	60
4.8. Ausblicke	61
5. Literaturliste	62

Zusammenfassung der Arbeit

Die verschiedenen Typen von Nervenzellen sind durch die differentielle Expression terminaler Differenzierungsgene charakterisiert. Dies sind z.B. Gene, deren Produkte die Synthese und den Transport der verwendeten Neurotransmitter gewährleisten. Die Expression dieser Gene wird während der Entwicklung durch spezifisch exprimierte Transkriptionsfaktoren reguliert. In der Entwicklung sympathischer Nervenzellen sind Mitglieder aus der Familie der basic Helix-Loop-Helix-(bHLH)-Transkriptionsfaktoren und der paired-Homöodomänen-Faktoren identifiziert worden, deren Expression in Vorläuferzellen aus der Neuralleiste durch das Signalmolekül BMP4 induziert wird und die an der Regulation des sympathischen Phänotyps beteiligt sind. Nullmutanten des bHLH-Faktors Mash1 und des Homöodomänen-Faktors Phox2b zeigen eine stark gestörte Entwicklung der sympathischer Nervenzellen. Weitere bHLH-Faktoren, dHand und eHand, vermögen in vitro die Expression noradrenerger Differenzierungsgene in Neuralleistenzellkulturen zu induzieren. Ob diese Faktoren in vivo eine Rolle in der entwicklungsabhängigen sympathischen Differenzierung spielen, kann im Mausmodell nicht untersucht werden, da die Nullmutanten noch vor der Sympathogenese sterben.

Das Huhnembryo bietet das ideale Modellsystem, die Rolle von Transkriptionsfaktoren in vivo zu untersuchen und durch Kopplung embryologisch-experimenteller und molekularer Verfahren die Faktoren gezielt in bestimmten Geweben zu exprimieren.

In dieser Arbeit werden Experimente dargestellt, welche die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren genauer definieren. Durch die viral induzierte Expression von Phox2a und Phox2b im Huhnembryo wird gezeigt, dass die Expression dieser Faktoren ausreicht, in multipotenten Vorläuferzellen des Brachialnervs und des Hinterwurzelganglions die Differenzierung sympathischer Nervenzellen zu induzieren. Dieser Phänotyp umfasst neben der Expression typisch noradrenerger und panneuronaler Gene ebenfalls die Expression der Transkriptionsfaktoren Phox2a und -b, dHand und Cash1.

Es wird gezeigt, dass dHand im Laufe der sympathischen Entwicklung noch vor den noradrenergen und panneuronalen Differenzierungsgenen exprimiert wird. Auch dHand ist in der Lage, nach viraler Misexpression in multipotenten Vorläuferzellen des Embryos Differenzierung zu sympathischen Nervenzellen auszulösen.

Weiter wird gezeigt, dass die Überexpression von BMP4 im Huhnembryo dazu führt, dass undifferenzierte Vorläuferzellen im Brachialnerv zu sympathischen Nervenzellen differenzieren.

Mash1 vermag nach Überexpression die Expression neuronaler Gene im Brachialnerv und umliegenden Mesoderm zu induzieren. Die Bildung sympathischer Nervenzellen im Bereich des Brachialnervs wird ebenfalls induziert. Diese exprimieren wiederum neben den noradrenergen und panneuronalen Genen auch die Transkriptionsfaktoren Phox2a/b und dHand.

Die Ergebnisse zeigen überzeugend das Vermögen der Transkriptionsfaktoren Phox2a/b, dHand und Mash1 den komplexen sympathischen Phänotyp in multipotenten Vorläuferzellen aus der Neuralleiste zu induzieren.

Besonders wichtig sind hierbei die Ergebnisse nach dHand-Überexpression. Hiermit wird erstmals gezeigt, dass dieser bHLH-Transkriptionsfaktor in vivo eine hervorragende Rolle innerhalb der Regulation noradrenerger und neuronaler Gene einnimmt.

Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass während der Normalentwicklung in Vorläuferzellen des peripheren Nervensystems die Expression einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren induziert wird. Deren Mitglieder werden in einer festgelegten zeitlichen und epistatischen Reihung exprimiert. Jeder Einzelne dieser Transkriptionsfaktoren ist ausreichend, in Vorläuferzellen die Entstehung sympathischer Nervenzellen auszulösen. Dabei wird die Expression der anderen Mitglieder dieser Gruppe induziert. Es handelt sich also nicht um eine lineare Kaskade von Transkriptionsfaktoren, sondern um ein Netzwerk von Faktoren, die ihre Expression gegenseitig regulieren und vermutlich gemeinsam die Expression terminaler Differenzierungsgene steuern.

1. Einleitung

1.1. Transkriptionelle Regulation der Organogenese von Metazoen

Die Entwicklung vielzelliger Organismen ist ein Schritt in der Evolutionsgeschichte, der eine Vielzahl struktureller und funktioneller Neuerungen erfordert. Die Anzahl von Genen, welche an der Regulation der Transkription beteiligt sind, weist mit dem Schritt zur Multizellularität eine deutliche Erhöhung auf (*Escherichia coli*: 319; *Homo Sapiens*: 1850; Perez-Rueda und Collado-Vides 2000, Venter et al. 2001). Die Bedeutung der Regulierung von Genaktivität durch Transkriptionsfaktoren lässt sich auch daran ermesen, dass vier der 20 häufigsten Sequenzmotive im Genom von *C.elegans* Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998).

Der Schritt zum mehrzelligen Lebewesen bringt nicht nur eine erhöhte Anforderung an intrazellulärer Regulation mit sich. Das Zusammenwirken verschiedener arbeitsteiliger Zelltypen in einem Organ macht ein flexibel gestaltbares Signalisationsvermögen zwischen Zellen nötig. Zellen müssen in der Lage sein, zu unterschiedlichen Zeitpunkten in ihrer Entwicklung unterschiedlich auf dieselben Signale zu antworten (Davidson 1991). Die Entwicklung differenzierter Zelltypen aus multi- oder pluripotenten Stammzellen oder Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung verdeutlicht diese Anforderungen. In diesem Prozess muss es gelingen, nur aufgrund der Rezeption räumlich und zeitlich aufgelöster Signale eine differentielle Expression zelltypspezifischer Gene auszulösen.

1.2. Der Sympathikus als Modellsystem zum Studium neuronaler Organisation

Ein hervorstechendes Beispiel eines komplexen Organsystems ist das Nervensystem der Vertebraten. Kein anderes Organsystem (ausgenommen das "Organ" Immunsystem) weist eine solche Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen auf; nirgendwo anders ist ein solcher Grad von Vernetzung und Wechselwirkung zwischen Zellen erreicht worden. Die Entstehung dieses komplexen Systems, die Neurogenese, ist ein vielschichtiger Prozess, der auf einer engen transkriptionellen Kontrolle der beteiligten Zellen beruht (Bang und Goulding 1996).

Wie kann die Entwicklung eines so komplexen Systems untersucht werden? Die Beschränkung auf bestimmte einfach aufgebaute Bereiche des Nervensystems erleichtert die Analyse und das Verständnis der Entstehung von Nervenzellen. Ein einfach aufgebautes Teilsystem ist das periphere Nervensystem (PNS). Es wird gebildet aus der Gesamtheit aller nicht im Zentralnervensystem (ZNS) gelegenen Gliazellen und Nervenzellen. Dies sind sensorische Nervenzellen, enterische Nervenzellen, die Zellen der zwei Bereiche des autonomen Nervensystems, Sympathikus und Parasympathikus, sowie gliale Satelliten- und Schwannzellen (Le Douarin und Smith 1988).

Gut beschrieben und Gegenstand klassischer neuroentwicklungsbiologischer Arbeiten ist das sympathische Nervensystem (Landis 1988, LeDouarin und Kalcheim 1999, Abb. 1). Der

Sympathikus umfasst die prävertebralen und paravertebralen Ganglien im Rumpfbereich von Vertebraten. In den segmental organisierten Ganglien (auch Grenzstrangganglien genannt) liegen die postganglionären sympathischen Neurone und gliale Satellitenzellen. Die sympathischen Nervenzellen werden innerviert von präganglionären Motoneuronen der Tertiären Säule aus dem Rumpfbereich des Rückenmarks (Forehand et al. 1997). Über die nichtmyelinisierten sympathischen Efferenzen wird die Aktivität einer Vielzahl homöostatischer Funktionen gesteuert; als sicher bekannteste die Modulation von Anstrengungs- und Erregungszuständen, die z. B. Veränderungen physiologischer Parameter wie Herzschlagfrequenz, Durchblutung und Aktivität innerer Organe, der Haut und der Muskulatur mit sich bringen (Jänig und Bräunig 1996). Sympathische Endigungen bilden keine klassischen Synapsen, sondern Varikositäten; perlschnurartige axonale Auftreibungen, aus denen die Neurotransmitter Noradrenalin (im Falle

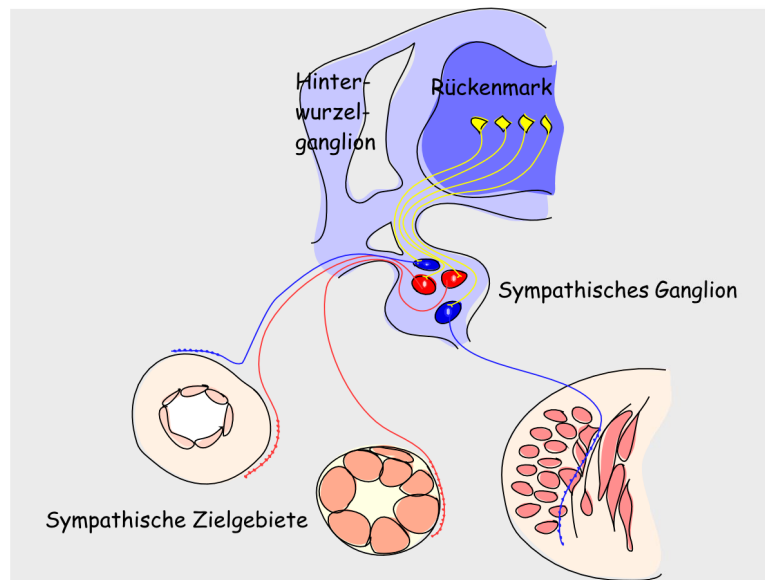


Abb. 1.1: Aufbau des sympathischen Nervensystems. Die im sympathischen Ganglion gelegenen Nervenzellen werden innerviert von präganglionären Neuronen aus dem Rückenmark. Cholinerge sympathische Nervenzellen (rot) innervieren im Säuger die Schweißdrüsen (Mitte unten) und Blutgefäße (unten links). Noradrenerge sympathische Nervenzellen innervieren ebenfalls Blutgefäße und Organe des Verdauungstraktes.

noradrenerger sympathischer Neurone) oder Acetylcholin (im Falle cholinerg sympathischer Neurone) sezerniert werden. Noradrenerge und cholinerge sympathische Fasern innervieren mit wenigen Ausnahmen dieselben Zielgebiete. Im Huhn sind die Arteria ischiadica, die Arteria metatarsalis communis dorsalis sowie Blutgefäße der Haut und der Skelettmuskulatur als Zielgebiet cholinerg sympathischer Innervation beschrieben (Zechbauer 1995, Ernsberger und Rohrer 1999). Durch ihren Transmittergebrauch sind die sympathischen Nervenzellen von anderen neuronalen Zellen des muren peripheren Nervensystems unterscheidbar: sensorische Nervenzellen gebrauchen kein Noradrenalin; enterische Nervenzellen sind serotonerg, cholinerg, nitroerg oder GABAerg (Gershon 1997) und parasympathische Nervenzellen sind rein cholinerg.

Die muren sympathischen Nervenzellen zeichnen sich ausserdem durch den Einsatz einer Vielfalt von Kotransmittern aus, wie etwa Adenosinriphosphat (ATP, Kennedy 1993) oder den Neuropeptiden Neuropeptid Y (NPY), Calcitonin gene related peptide (CGRP), Somatostatin (SOM) und dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP, nur cholinerge Neurone, Gibbins 1995, Landis 1988).

1.3. Die Herkunft sympathischer Nervenzellen

Die peripheren Nervenzellen und die nichtneuronalen myelinisierenden Schwannzellen des PNS entstammen multipotenten Vorläuferzellen aus der Neuralleiste oder den epibranchialen Plakoden (Le Douarin und Kalheim 1999, Baker und Bronner-Fraser 2001). Die Neuralleiste ist eine transiente Struktur in der Wirbeltierentwicklung. Sie wird gebildet durch Zellen des dorsalen Neuralrohrs, die nach der Schließung des Neuralrohrs in der Spätphase der Neurulation aus dem epithelialen Verband delaminieren. Die Zellen wandeln sich hierbei in einer epithelial-mesenchymalen Transition in wanderungsfähige Zellen um (Duband et al. 1995, Christiansen et al. 2000, Nieto 2001). Die Zellen, die an diesem Vorgang beteiligt sind, sind auf molekularer Ebene von den im Neuralrohr verbleibenden Zellen durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmoleküle unterscheidbar. So exprimieren Neuralleistenzellen schon innerhalb des dorsalen Neuralrohres die Transkriptionsfaktoren FoxD3 aus der Forkhead-Klasse (Kos et al. 2001), den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Slug (Nieto et al. 1994) sowie den Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Sox10 (Cheng et al. 2000, Britsch et al., 2001) und verschiedene Cadherine und NCAM (Pla et al. 2001, Akitaya und Bronner-Fraser 1992).

Im Rumpfbereich erfahren die neurogenen Neuralleistenzellen nach ihrer Delamination abhängig vom Ort ihrer Entstehung und vom Zeitpunkt der Auswanderung ein unterschiedliches Schicksal. Spät auswandernde Zellen schlagen überwiegend einen lateralen subepidermalen Wanderweg ein und differenzieren zu Pigmentzellen der Haut (Artinger und Bronner-Fraser 1992). Neuralleistenzellen im posterioren rhombenzephalischen und anterioren cervikalen sowie im lumbosakralen Bereich wandern nach ventral zu den Anlagen des Vorder- und Enddarmes. Sie besiedeln den gesamten Darmtrakt und differenzieren zu enterischen Neuronen (Young und Newgreen 2001, Burns und LeDouarin 2001). Die sympathischen Vorläuferzellen entlang des gesamten Rumpfbereichs wandern ebenso wie die Vorläufer der chromaffinen Zellen der Nebenniere im Übergang zwischen Nacken- und Brustbereich nach ventral zur dorsalen Aorta (Le Douarin und Kalheim 1999). Die sympathischen Vorläuferzellen wandern segmental organisiert zwischen Neuralrohr und Somiten oder durch den rostralen Teil der Somiten und weiter am Notochord vorbei (Krull 2001). Die Wanderung der Neuralleistenzellen wird vermutlich durch Signale der Umgebung gesteuert (Perris und Perrissinotte 2000). Es gibt Hinweise, dass die wandernden Zellen hier schon Signale erkennen, die sie kompetent für die spätere sympathische Differenzierung werden lassen (Stern et al. 1991). Während die Vorläufer der chromaffinen

Zellen der Nebenniere noch weiter zu den Anlagen der Nebenniere wandern, stoppt die Wanderung der Sympathikusvorläufer dorsolateral von und in engem Kontakt zur dorsalen Aorta (Yip 1986, Le Douarin und Kalcheim 1999). Hier wird der Differenzierungsprozess ausgelöst, innerhalb dessen sich ein Teil dieser Zellen zu Nervenzellen des sympathischen Nervensystems ent-

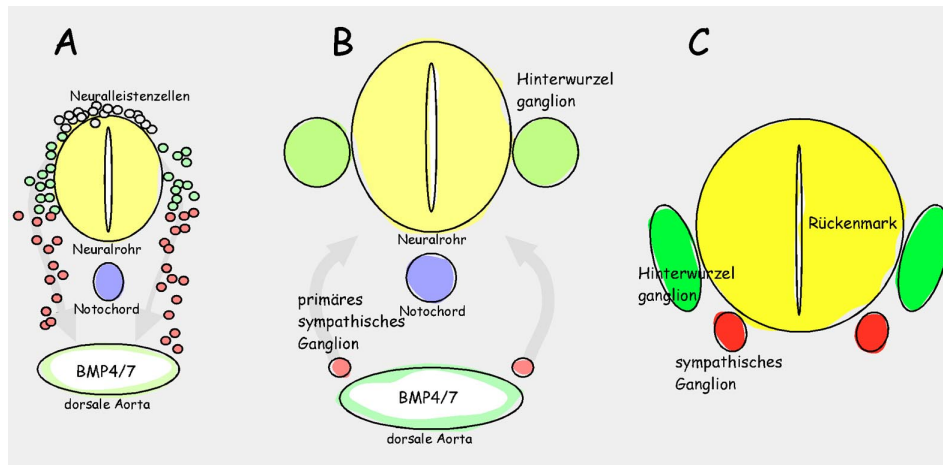


Abb. 1.2: Entwicklung des sympathischen Ganglions. Neuralleistenzellen aus der dorsalen Neuralrohr wandern nach ventral (A) zur dorsalen Aorta. Dort binden die Zellen BMP4 und-7 und differenzieren zu sympathischen Nervenzellen. Später wandern die Zellen der primären sympathischen Ganglien nach dorsal (B). Ventrolateral des Rückenmarks nehmen sie die endgültige Position der sekundären paravertebralen Ganglien ein (C).

wickelt (Abb. 1.2). Der Zeitverlauf dieser Differenzierung ist in verschiedenen Vogelarten detailliert herausgearbeitet worden. Die ersten Neuralleistenzellen, die die dorsale Aorta erreichen, sind im Rumpf auf der Höhe der Flügelanlage am zweiten Tag der Entwicklung im Hamilton-Hamburger-Stadium 15 nachgewiesen worden. Bereits wenige Stunden später, im späten HH-Stadium 18, weisen die ersten dieser Zellen noradrenerge Eigenschaften auf (Lallier und Bronner-Fraser 1988, Ernsberger et al. 1995, Groves et al. 1995, Ernsberger et al. 2000, McPherson et al 2000, Ernsberger et al. 2001).

1.4. Noradrenerge und panneuronale Markergene zeigen die terminale Differenzierung sympathischer Neurone an.

Die terminale Differenzierung sympathischer Nervenzellen wird schliesslich durch die Expression der noradrenergen phänotypischen Markergene TH (Tyrosin-Hydroxylase) und DBH (Dopamin-beta-Hydroxylase) angezeigt (Landis 1988). Beide Gene kodieren für Enzyme aus dem Biosyntheseweg von Noradrenalin. TH hydroxyliert Tyrosin zu Dihydroxy-Phenylalanin (DOPA). Dies ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Syntheseweg. DOPA

zierenden Zellen macht es zu einem geeigneten Indikator für früheste neuronale Spezifizierung (Groves et al. 1995, Ernsberger et al. 1995). NF160 (Neurofilament, Molekulargewicht 160 kDalton), ein anderes neuronales Markermolekül, ist ein Mitglied aus der Familie spezifisch neuronal exprimierter Intermediärfilamente.

1.5. BMP-Signale initiieren die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren

Die Differenzierung der sympathischen Vorläuferzellen wird durch BMPs (bone morphogenetic proteins) ausgelöst (Varley et al. 1995, Varley und Maxwell 1996, Shah et al. 1996, Reissmann et al. 1996). BMPs sind lösliche und sezernierte Signalmoleküle, die in vielfältigen Prozessen der Embryonalentwicklung beteiligt sind. BMP 4 und BMP 7 werden im Huhn an dem Ort synthetisiert, an dem Zellen der Neuralleiste beginnen, noradrenerge und neuronale Eigenschaften herauszubilden (Reissmann et al. 1996). Das Gewebe, welches diese induzierenden Moleküle synthetisiert, ist die dorsale Aorta, die sich in diesem Entwicklungsstadium ventral des Notochords entlang der Längsachse durch den Embryo zieht. Wird die Wirkung der BMPs durch deren spezifischen Antagonisten Noggin *in vivo* gehemmt, so werden die neuronalen Vorläuferzellen apoptotisch und es bilden sich keine sympathischen Nervenzellen aus (Schneider et al. 1999). Umgekehrt können im Zellkulturmodell die dorsale Aorta, aktivierte BMP-Rezeptoren oder BMPs die Entwicklung des sympathischen Phänotyps aus multipotenten Neuralleistenzellen hervorrufen (Varley et al. 1995, Varley und Maxwell 1996, Shah et al. 1996, Reissmann et al. 1996, Varley et al. 1998); ein Effekt, der wiederum durch Zugabe von Noggin blockierbar ist (Schneider et al. 1999). Die Gesamtheit dieser Befunde bestätigt eindrucksvoll die Beteiligung von BMPs bei der Ausbildung des sympathischen Phänotyps im Hühnchenembryo.

Wie stellt sich die Verknüpfung des induzierenden BMP-Signals mit der Aktivierung der phänotypischen neuronalen und noradrenergen Markergene dar? Der Mechanismus der BMP-Signalrezeption ist in Grundzügen bekannt: BMPs binden als Dimere an den BMP-Rezeptor II; sowohl eine Bindung von Homo- als auch Heterodimeren ist ausreichend zur Rezeptoraktivierung. Der Ligand-Rezeptorkomplex assoziiert mit dem BMP-Rezeptor I und im intrazellulären Teil der assoziierten Rezeptorkomplex-Untereinheiten findet eine Aktivierung der signalübertragenden Domänen durch die Übertragung von Phosphatgruppen auf Serin/Threonin-Seitenkettenreste statt. Die aktivierten Domänen phosphorylieren intrazellulär lokalisierte SMAD-Proteine, welche daraufhin dimerisieren und in den Zellkern wandern, wo sie an die Promotorregionen ihrer Zielgene oder an Faktoren des Transkriptionskomplexes binden (Massague 1998, 2000). Dieses allgemeine Schema wurde in verschiedenen Modellsystemen untersucht und trifft vermutlich auch für die BMP-induzierte Differenzierung sympathischer Nervenzellen zu. Neuere Daten aus Kulturversuchen mit Neuralleistenzellen aus der Wachtel demonstrieren, dass in diesem System BMP4 die Translokation von Smad1 in den Zellkern reguliert (Wu et al. 2001).

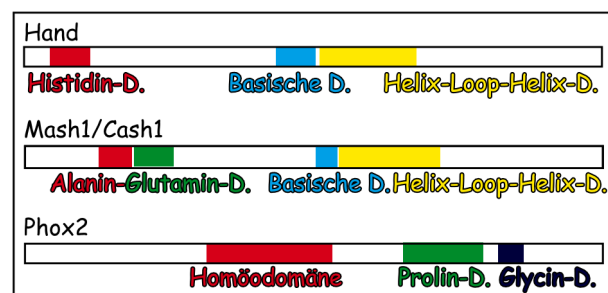
1.6. Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die an der Weiterleitung des induktiven BMP-Signals beteiligt sind

Auf der Suche nach Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch BMPs reguliert wird und die an der sympathischen Differenzierung beteiligt sind, lassen sich mehrere Kandidaten identifizieren:

Cash-1/Mash-1

Die proneuralen basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren des achaete scute-Komplexes achate, scute und lethal of scute (achaete scute Homologe: ASH) wurden als wichtige Regulatoren neural differenzierender Zellen in *D. melanogaster* identifiziert (Ghysen und Richelle 1979). Proneurale bHLH-Faktoren sind früheste Determinatoren neuronaler Differenzierung und wirken über ihre bHLH-Domäne (Hinz et al 1994, Ma et al 1996, Lee et al. 1997). Ihre Expression im Neuroektoderm steuert die Entscheidung zwischen ektodermalem und neuralen Schicksal von neuroektodermalen Vorläufern (Ruiz-Gomez und Ghysen 1993, Skeath und Carroll 1994). Zudem unterteilen verschiedene bHLH-Faktoren neuronale Vorläuferzellen in verschiedene Entwicklungslinien (Anderson 1999, Guillemot 1999). Die proneurale Aktivität von ASH-Faktoren ist über entwicklungsgeschichtlich weit entfernte Arten konserviert (Ferreiro et al. 1994). So ist z.B. das Hydra-Homolog in der Lage, neurale Differenzierung in *C. elegans* zu determinieren (Gren et al 1995). In Säugern besitzen ASH-Faktoren noch eine zusätzliche Rolle: Ihre Expression reguliert die subtypspezifische Differenzierung von Nervenzellen. So wird z.B. in der Entwicklung des Vorderhirns die Unterscheidung zwischen ventralen und dorsalen Phänotypen durch die Wirkung von Mash-1 bzw. Neurogeninen gesteuert (Ma et al. 1997, Fode et al. 2000). Im PNS determinieren die Neurogenine die Entwicklung sensorischer Neurone und Mash-1 die Entwicklung autonomer Strukturen (Sommer et al. 1996, Hirsch et al. 1998, Lo et al 1998, Ma et al. 1996, 1998, 1999, Perez et al. 1999). ASH-Faktoren werden in sympathischen Vorläuferzellen von Huhn, Wachtel und Maus früh exprimiert (Ernsberger et al. 1995, McPherson et al. 2000, Groves et al. 1995). Die Überexpression von Mash-1 ist ausreichend, in klonalen Neuralleistenkulturen der Maus initiale Schritte der noradrenergen Differenzierung auszulösen (Lo et al. 1998). Die Eliminierung der Mash-1-Funktion in Knockout-Mäusen führt zum Verlust der Expression des Transkriptionsfaktors Phox2a (siehe unten) in den frühen sym-

Abb. 1.4: Schematischer Aufbau der Transkriptionsfaktoren e/dHand, Mash1/Cash1 und Phox2a/b. Die Hand-Faktoren besitzen eine Histidinreiche Domäne N-terminal zur basic Helix-Loop-Helix-Domäne. Mash1/Cash1 besitzen eine Alanin/Glutaminreiche Domäne und Phox2-Faktoren weisen einen Prolin- und einen Glycinreichen Abschnitt in ihrer Aktivator-domäne auf. D = Domäne



pathischen Vorläuferzellen und verhindert die noradrenerge Differenzierung. Darüberhinaus kommt es zum Verlust einer Teilpopulation des enterischen Nervensystems (Blaugrund et al. 1996, Hirsch et al. 1998). Im Huhnembryo ist die Aufrechterhaltung der Expression des Huhn-homologes Cash-1 in den sympathischen Vorläuferzellen abhängig von BMP-Signalen (Schneider et al. 1999). Die genaue Rolle von Mash-1 für die Entwicklung des sympathischen Nervensystems ist noch unklar. Zwar ist die Bildung der sympathischen Nervenzellen in der Mash-1-Mutante beeinträchtigt (Hirsch et al. 1998); es ist jedoch offen, ob Mash-1/Cash-1 ausreichend ist, in vivo eine vollständige sympathische Differenzierung auszulösen.

Phox2a und Phox2b

Die beiden paralogen Transkriptionsfaktoren Phox2a und Phox2b enthalten eine Domäne, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu dem *Drosophila*-Transkriptionsfaktor *paired* zu der Bezeichnung *paired-domain containing homeodomain protein 2* geführt hat. Ihre DNA-Homöobox-Bindedomänen sind identisch (Pattyn et al. 1999). Homologe Faktoren sind auch in Nichtvertebraten wie z.B. *C. elegans* vorhanden (Pujol et al. 2000). Die Expression der Phox2-Faktoren in Vertebraten ist beschränkt auf die meisten der zentralen und alle peripheren Anteile des autonomen Nervensystems und seiner ZNS-Regulationszentren (Tiveron et al. 1996, Pattyn et al. 1997). Der Knockout von Phox2b weist Defekte in zentralnervösen noradrenergen Zentren auf und zeigt die Bedeutung für die Entwicklung sympathischer Nervenzellen: in homozygoten Mutanten unterbleibt die terminale Differenzierung sympathischer Vorläuferzellen (Morin et al. 1997, Pattyn et al. 1999, 2000a). In vitro-Studien zeigten die direkte Bindung beider Faktoren an die Promotorregionen der noradrenergen Gene *TH* und *DBH* (Swanson et al. 1997, Kim et al. 1998, Yang et al. 1998, Kim et al. 1999, Yokoyama et al. 1999, Adachi et al. 2000). Diese Bindung ist ausreichend, um in geeigneten Zelllinien die Aktivierung von Reporter genen auszulösen. Ihre direkte oder indirekte Beteiligung an der sympathischen Differenzierung wird durch den Beginn der Expression nahegelegt, der sich im frühen HH-Stadium 18 zeitlich zwischen die BMP-Expression und die Aktivierung der noradrenergen Gene festlegen lässt (Ernsberger et al. 1995, siehe Ergebnisse). Darüberhinaus gibt es Befunde aus Noggin-behandelten Hühnchenembryonen, in denen gezeigt wird, dass durch die Blockierung der BMP-Wirkung nicht nur ein Verlust der Expression der noradrenergen und neuronalen Markergene, sondern sogar schon der Verlust der zeitlich früher eingeordneten Phox2-Expression zu beobachten ist (Schneider et al. 1999). Es ist nicht klar, ob die Expression der beiden Phox2-Faktoren ausreichend ist, sympathische Differenzierung auszulösen.

dHand

Aus in vitro-Experimenten mit Neuralleistenkulturen der Wachtel stammt der Befund, dass die Überexpression der beiden orthologen Vertreter der Familie der basic-Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren dHand (deciduum, hearth, autonomic nervous system, neural crest derived)

und eHand (extraembryonic membranes, heart, autonomic nervous system, neural crest derived) zu einer Erhöhung des Anteils catecholaminerger Zellen führt (Howard et al. 1999). Ein zusätzliches Indiz für eine mögliche Beteiligung der Hand-Faktoren an der BMP-induzierten sympathischen Differenzierung ist die Tatsache, dass in Neuralleistkulturen, in denen als Antwort auf BMP-Gabe der Anteil TH-positiver Zellen erhöht wird, ebenfalls ein deutlicher Anstieg der dHand-Expression gezeigt werden kann (Howard et al. 2000). Nicht zuletzt zeigen Expressionsstudien in der Maus in den sympathischen Ganglien eine frühe Expression von dHand und eHand (Hollenberg et al. 1995, Cserjesi et al. 1995). dHand ist jedoch ausser in den sympathischen Ganglien noch in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (Srivastava et al. 1995, Srivastava et al. 1997), darunter in den mesodermalen Anteilen des Herzens. Die Eliminierung von dHand führt zum embryonalen Tod der Mutanten; die Herzventrikelbildung und die Bildung der Aortenbögen ist schwer beeinträchtigt; darüberhinaus ist die Bildung extraembryonaler Gefässe defekt (Srivastava et al. 1997). Die Defekte in der Blutgefässbildung ergeben sich wahrscheinlich durch eine Störung der VEGF/Semaphorin-Signalübermittlung (Yamagishi et al. 2000). Der frühe Tod der Knockout-Tiere an E10 verhindert die Untersuchung der sympathischen Differenzierung. So ist nicht bekannt, ob dHand notwendig oder ausreichend für die sympathische Differenzierung ist.

1.7. Transkriptionsfaktoren, die an der Differenzierung sympathischer Nervenzellen beteiligt sind, müssen durch BMP reguliert werden.

Transkriptionsfaktoren, die an der BMP-abhängigen sympathischen Differenzierung beteiligt sind, sollten bestimmte Eigenschaften aufweisen.

i) Ihre Expression sollte notwendig sein für die Differenzierung sympathischer Nervenzellen: Die Eliminierung des Faktors z.B. in transgenen Mauslinien hat einen nachweisbaren negativen Effekt auf den Prozess der sympathischen Differenzierung. Dies kann zur Folge haben, dass betroffene Zellen nicht mehr differenzieren oder nur einen Teilaspekt ihres Differenzierungsprogramms durchlaufen. Solch eine direkte Abhängigkeit ist für die Faktoren Phox2b und Mash1 gezeigt worden (Sommer et al. 1995, Pattyn et al. 1999); für dHand fehlen aufgrund der frühen Letalität der Mutation die entsprechenden Daten.

ii) Ihre Expression sollte ausreichend sein für die Differenzierung sympathischer Nervenzellen: Die Über- oder Misexpression in Teilen des Nervensystems, die diesen Faktor in der ungestörten Entwicklung nicht exprimieren, führt dazu, dass das Schicksal dieser Zellen beeinflusst wird und es zur teilweisen oder vollständigen sympathischen Differenzierung in ektopischen Regionen im Embryo kommt. Hierzu fehlen experimentelle Daten vollständig.

iii) Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren muss in der Entwicklungslinie der sympathischen Vorläuferzellen unter der Kontrolle von BMP stehen. Dies bedeutet, dass die Blockierung des BMP-Signals zu einem Ausfall der Expression führt, bzw. die ektopische BMP-Gabe zu einer ektopischen Expression der Faktoren führen kann. Hierzu hat die Säugerogenetik bislang

keine Daten liefern können, da BMPs in vielen Prozessen der Entwicklung wichtige Rollen einnehmen und ihr Funktionsverlust in frühen Stadien letal wirkt (Winnier et al. 1995) oder funktionell durch koexprimierte Homologe kompensiert wird (Dudley und Robertson 1997). Um die Expression von BMP4 und BMP7 in den Zellen der dorsalen Aorta auszuschalten, wären konditionelle Doppelknockouts erforderlich.

1.8. Replikationskompetente Viren erlauben die Untersuchung von Transkriptionsfaktoren in transgenen Huhn-Chimären

Im Gegensatz zu Säugetieren hat es bislang noch keinen erfolgreichen Versuch gegeben, durch den Eingriff in die Keimbahn von Vögeln Nullmutanten zu erzeugen. Dieser Nachteil wird teilweise ausgeglichen durch ein einfaches Expressionssystem, das auf der Überexpression eines Transgenes durch replikationskompetente vogelspezifische Viren beruht. Der meistverwendete Vektor ist der auf dem Schmidt-Ruppin A-Stamm (SR-A) des Rous-Sarcoma-Virus basierende Retrovirus RCAS-BP (Replication-competent, ALV LTR (Avian Leucosis virus-Long terminal repeat), Splice acceptor, Bryan High Titer Polymerase). In diesem Typ wird die Promotorregion der ALV-LTR verwendet, das über starke Enhancer-Elemente und alternative Splice-

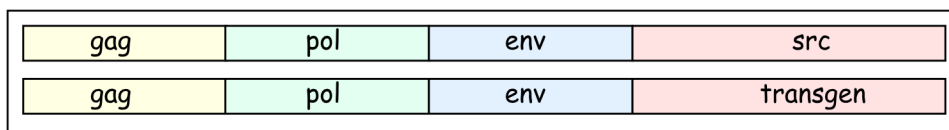


Abb. 1.5: Aufbau des RCAS-Genoms. Unter den viruseigenen Genen, die unter der Kontrolle des ALV-LTR-Promotors stehen, sind die Strukturproteine des Viruskerns (gag), enzymatische Proteine (pol) und die Proteine der Virushülle (env). Das src-Onkogen ist in dieser Variante durch ein erwünschtes Transgen ersetzt.

Mechanismen die hohe Expression eines experimentellen Genes gewährleistet (Federspiel und Hughes 1997). Mit der Subtyp-B-Variante dieses Vektors lässt sich im Hühnchen eine starke Infektion neuronaler Gewebe erreichen (Homburger und Fekete 1996). Zahlreiche Beispiele belegen eine effiziente virale Expression von Transgenen im PNS von Huhnembryonen (Reissmann et al. 1996, Geissen et al. 1998, Perez et al. 1999, Ernsberger et al. 2000).

1.9. Ist die Aktivität der Phox2-, Mash-1/Cash-1- und dHand-Transkriptionsfaktoren ausreichend, in vivo die Bildung des sympathischen Phänotyps zu induzieren?

Es ist nicht klar, ob die Aktivität von Phox2-, Cash-1/ Mash-1- und dHand-Transkriptionsfaktoren ausreichend ist, um die Differenzierung von Neuralleistenzellen und nicht differenzierten Vorläuferzellen zu sympathischen Nervenzellen auszulösen. Die Zielsetzung der Arbeit war, die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren durch den kombinierten Einsatz von molekularbiologischen Methoden und Techniken der klassischen experimentellen Embryologie aufzuklären.

i. Dazu sollte die frühe Expression dieser Transkriptionsfaktoren im sympathischen Nervensystem untersucht werden.

ii. Die Transkriptionsfaktoren sollten durch das RCAS-System im Huhnembryo überexprimiert werden. Effekte auf die Differenzierung sollten untersucht und dokumentiert werden.

iii. Es sollte untersucht werden, ob BMP4 ausreicht, die Expression der Transkriptionsfaktoren zu induzieren. Auch dies sollte durch virale Überexpression erreicht werden.

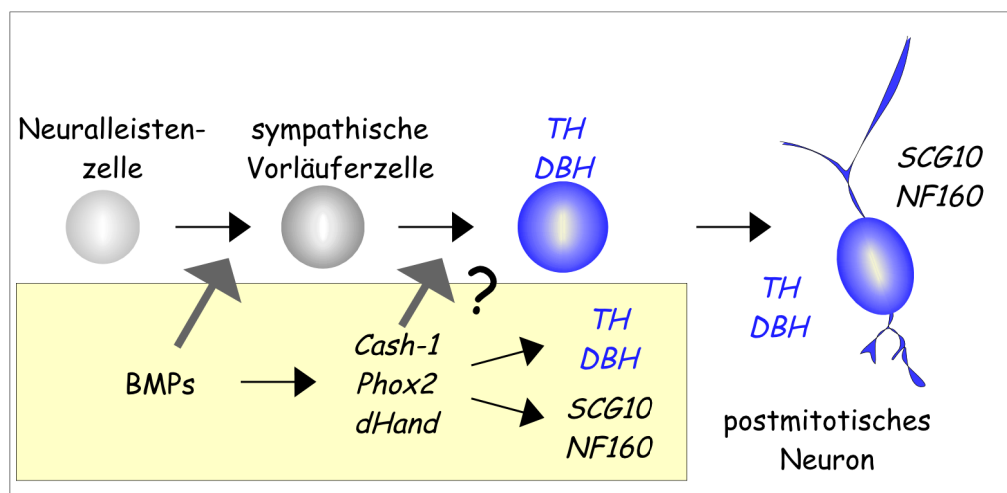


Abb. 1.6: Zielsetzung der Arbeit. Innerhalb des BMP-abhängigen Induktionsprozesses, an dessen Ende die Expression von terminalen Differenzierungsgenen steht, soll die Rolle der Transkriptionsfaktoren Mash1/Cash1, Phox2a/b und dHand untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Herstellernachweise

Collaborative Biomedical Products, Becton Dickinson GmbH: Nu-Serum Culture Supplement
Costar, Cambridge, Massachusetts: Gewebekulturflaschen T75 (75cm² Kulturfläche)

DIFCO, Detroit, Michigan: Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton, Bacto-Agar

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

Life Technologies, Gibco BRL, Eggenstein: Agarose, Glutamin, Penicillin-Streptomycin-Lösung (5000 U/5000 µg/ml), Trypsin-EDTA-Lösung, fötales Kälberserum, Hühnerserum, Pan-
kreatin, DMEM, Ham's F12/14, Natrium-Pyruvat 100mM, Taq DNS Polymerase, 10x Taq
DNS Polymerase Puffer

Menzel, Deutschland: SuperFrostPlus Objektträger

Merck, Darmstadt: Bromphenolblau, Natriumacetat, Eisessig, H₂O₂, Methanol, Chloroform,
MgCl₂, CaCl₂·2 H₂O, NaCl, NaHCO₃, MgSO₄·7H₂O, Tween20, Natriumcitrat, Na₂HPO₄,
NaH₂PO₄, Glucose, Saccharose, KCr(SO₄)·12 H₂O, Kaisers Glycerin Gelatine, KCl,
KH₂HPO₄, Aceton, LiCl

Messer Griesheim: CO₂, N₂

Sakura, Zoeterwoude, Niederlande: Tissue-Tek

Nunc, Wiesbaden: 35mm Gewebekulturschalen aus Polystyrol (9,62 cm²Kulturfläche)

Qiagen, Hilden: Plasmid Kits (Midi, Mini), Gel Extraction Kit, PCR Purification Kit

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

Roche Diagnostics, Mannheim: Ampicillin, DNS Längenstandard, DIG-Nukleinsäure-
Detektions-Kit, DIG-RNS-Labeling Kit, Fast-Red Tabletten, Fluorescein-RNS-Labeling-Kit,
Pferdeserum, Proteinase K, Restriktionsendonucleasen mit den zugehörigen Puffern, RNSse-
Inhibitor,

Roth, Karlsruhe: Triton-X-100, Phenol, Glycerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Schleicher&Schuell, Dassel: Faltenfilter, Filterhalter (0,45 µm Weißbrand),

Serva, Heidelberg: Paraformaldehyd, Silicon, SDS, Lysozym

Sigma, Deisenhofen: Ethidiumbromid (EtBr), Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA),

Isopro-panol, Gelatine, EDTA, DMSO, Levamisol, Isoamylalkohol, Mineralöl, Hefe RNS,
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat)

Stratagene, La Jolla, Californien: XL-1 blue (elektrokompetente Zellen), DNS Polymerase I
(Klenow Fragment)

Worthington, Freehold, Ohio: Trypsin

2.1.2. Lösungen

Sämtliche Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben, in zweifach deionisiertem Wasser (MilliQ-Filtersystem der Firma Millipore) angesetzt.

Lösungen für die Zellbiologie

Embryoextrakt: zehn Tage alte Hühnerembryonen werden nach Dekapitation und Entfernen der Augen homogenisiert. Das Homogenat wird mit dem gleichen Volumen DMEM mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin gemischt. Die Lösung wird unter leichtem Schütteln 30 min bei RT inkubiert und dann 20 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wird aliquotiert (4,5 ml) und bei -20°C gelagert.

10x PBS: 1,3 M NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, 26 mM KCl, pH 7,3

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

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)

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, 5,6 mM Glucose, pH 7,3

4% Paraformaldehyd: Paraformaldehyd im Wasserbad bei 50°C in Phosphatpuffer 1 M, pH 7,4 lösen (in Abständen aufschütteln), bei -20°C lagern.

Lösungen für in-situ-Hybridisierungen

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

0,5 M EDTA: 186,12 g Ethylendiamin-tetraacetat in H₂O lösen, pH 8,0 mit NaOH-Plätzchen (ca. 23g) und 1 M NaOH einstellen, mit H₂O auf 1000 ml auffüllen

Hybridisierungspuffer: 1 ml 10 x Salz, 5 ml Formamid, 1 ml Hefe RNS (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: 0,4614 g Tris (pH 7,5), 3,24 g NaCl, 0,234 g NaH₂PO₄ x H₂O, 0,213 g Na₂HPO₄, 3 ml 0,5M EDTA, ad 30ml mit H₂O, autoklavieren

50 x Denhardts: 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) PVP, bei -20°C lagern

Waschlösung: 1 x SSC, 50% (v/v) Formamid, 0,1% (v/v) Tween20

Maleinsäurepuffer: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH7,5, autoklavieren (MAB), vor Gebrauch 0,1% (v/v) Tween20 zugeben (MABT)

AP-Puffer: 20 ml 1 M Tris (pH 9,5), 10 ml 1 M MgCl₂, 4 ml 5 M NaCl, 200 µl Tween20, 48 mg Levamisol, ad 200 ml mit H₂O

NaP-Puffer: 0,1 M/15% Saccharose: 15g Saccharose in 100 ml 0,1M NaP-Puffer lösen, sterilfiltrieren

2.1.3. Medien

Medien für die Zellkultur

DF1-Fibroblastenlinie: DMEM, 10% fötales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin

Hinterwurzelganglienkultur: F14-Medium, 10% (v/v) Pferdeserum, 5% (v/v) fötales Kälberserum

Die verwendeten Seren wurden vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

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; etwa 20 ml pro Kulturschale ausgießen. Platten nach dem Giessen bei 4°C lagern.

LB-Ampicillin-Platten: Vor dem Giessen der Platten LB-Agar auf 50°C abkühlen und Ampicillin zugeben (20 g/ml)

2.1.4. Immunologische Reagentien

Antikörper

anti-Tyrosinhydroxylase: Maus monoklonal (Rohrer et al., 1986); Kaninchen polyklonal (Reichardt)

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

anti-c-myc (Maus monoklonal, Roche Pharmaceuticals, Mannheim)

anti-mPhox2a (Kaninchen polyklonal, C. Goridis)

anti-mPhox2b (Kaninchen polyklonal, C. Goridis)

anti-Hu (Maus monoklonal, J. Weston)

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-konjugiert-anti-Maus IgG aus Ziege und

Alexa 569-konjugiert-anti Kaninchen aus Ziege, Molecular Probes, Leiden, Niederlande.

2.1.5. Faktoren

BMP4, BMP5: rekombinant human, Genetics Institute, USA

mBMP7: recombinant mouse, Genetics Institute, USA

2.1.6. DNS

virale Konstrukte

mPhox2a-RCAS(B), C. Goridis, D. Junghans, M. Geissen

mPhox2b-RCAS(B), C. Goridis, D. Junghans, M. Geissen

Mash-1-RCAS(B), D. J. Anderson, Pasadena, USA

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

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

Plasmide für Sondensynthesen

Cash-1: 1,9 kb cDNS Fragment in pBluescript/SK, (T. Reh, Washington, USA)

cChAT: 2,8 kb Fragment in pBluescript/SK (T. Jessell, New York, USA)

cDBH: 480 bp Fragment in pBluescript/SK (U. Ernsberger)

cPhox2a: 346 bp cDNS Fragment in pBluescript/SK (Ernsberger et al., 1995)

cPhox2b: 374 bp PCR-Fragment in pBluescript/KS (C.Goridis, Marseille, FR)

c-ret: 400 bp Fragment in pBluescript/SK (I. Mason)

cVACHT: 800 pb Fragment in pBluescript/SK (selbst)

cTH: 1,8 kb cDNS Fragment pBluescript/SK (U. Ernsberger)

cNF160: ca. 1 kb Fragment in pBluescript/SK (Gundelfinger, Marburg)

Reverse Transkriptase: 405 bp Fragment aus RCAS in pBluescript/SK (S. Heller)

cSCG10: 890 bp cDNS Fragment in pGEM-3Z (T. Jeffrey)

Oligonukleotide

Sequenzierprimer

T3: AATTAACCCTCACTAAAGGG

T7: GTAATACGACTCACTATAGGGC

RCAS sense: GTGAAATACGCTTTTGTCTGTGTG

RCAS antisense: ACAACCGAAGCCCCGCTTTTCGCC

2.1.7. Organismen

Zur Herstellung primärer Neuralleistenkulturen werden zwei Tage alte Wachtelembryonen (*Coturnix coturnix*) verwendet. Zur retroviralen Infektion von Embryonen und für die Präparation primärer Fibroblasten werden virusfreie Embryonen des Haushuhns (*Gallus domesticus*) verwendet. Zur Herstellung von Embryoextrakt und für die Expressionsanalysen werden herkömmliche Hühnereier verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Fibroblastenkulturen

Primäre CEF (chicken embryo fibroblasts) aus den Extremitätenanlagen zehn Tage alter virusfreier Hühnerembryonen dienen als Wirtszellen für den RCAS-Virus.

Präparation und Kultivierung primärer Fibroblasten

Die den Embryonen entnommenen Extremitäten werden in PBS-Glucose (1mg/ml) gesammelt, in PBS mit zwei feinen Pinzetten zerkleinert und anschließend 2 x mit PBS gewaschen. Das Gewebe wird zentrifugiert (930rpm, 10min, RT) um den Überstand zu entfernen. Es wird 20 min bei 37°C in 0.1%iger Trypsinlösung unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wird mit serumhaltigem Medium inkl. 1% DNase und 10% Trypsininhibitor abgestoppt. Das Gewebe mit einer silikonisierten Pipette bis zur Einzelzellsuspension trituriert und verbleibende Gewebereste werden durch ein Nylonnetz (50 µm Porengröße) gefiltert. Die Zellen werden in einer Dichte von 6×10^5 Zellen/ml in serumhaltigem IMDM in eine 75cm² große Zellkulturflasche (Costar) in 20ml Volumen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt werden, um tote Zellen zu entfernen. Sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen bilden, werden sie in geringerer Dichte auf neue Zellkulturflaschen verteilt (siehe Abschnitt Passagieren). Die Zellen werden in einer Dichte von 6×10^5 Zellen/ml ausplattiert und weiterkultiviert. Die anfängliche Mischung verschiedener Zellarten ändert sich nach etwa einer Woche zu einer reinen Fibroblastenkultur. Überschüssige Zellen können für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Passagieren und Kultivierung von Huhn-Fibroblasten

Sobald die Fibroblasten einen konfluenten Zellrasen bilden, werden sie zur weiteren Kultivierung passagiert, d.h. in geringerer Dichte in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazu wird das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Angabe bezieht sich auf eine 75 cm² Flasche). Die Ablösung der Zellen vom Untergrund wird am Mikroskop kontrolliert. Sobald sich die Zellen abgelöst haben, wird die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Fibroblastenmedium abgestoppt. Ein Teil der Zellsuspension wird in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche mit 12 ml serumhaltigem Fibroblasten-Medium überführt, so dass schließlich eine Zelldichte von 6×10^5 Zellen/ml vorliegt.

Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur Vorratshaltung von Fibroblasten besteht die Möglichkeit, die Zellen in flüssigem Stickstoff zu konservieren. Dazu werden die Zellen einer konfluenten Kultur trypsinisiert (s.o.) in 10 ml Medium bei RT, 150 g, 10 min sedimentiert. Das Medium wird vorsichtig abgenommen und die Zellen in kaltem Fibroblastenmedium mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert; für eine 75 cm² Zellkulturflasche (5x10⁶ Zellen) werden 5 ml verwendet. Die Suspension wird sofort in Kryoröhrchen aliquotiert und in einer Einfrierbox (Qualifreeze), welche ein definiertes Abkühlen (1°C/min) der Zellen ermöglicht, über Nacht bei -70°C gelagert. Die Zellen werden zuletzt in flüssigen Stickstoff überführt.

Gefrorene Zellen werden durch vorsichtiges Spülen mit Medium aufgetaut. Die suspendierten Zellen werden in einer 6 cm Schale rekultiviert.

Transfektion von Fibroblasten

Superfect (Qiagen): Die Transfektion wird nach Vorschrift des Herstellers vorgenommen. Das Verfahren nutzt die Möglichkeit, DNA mit Reagenzien zu komplexieren, die dem Gesamtkomplex eine positive Ladung verleihen. Dieser bindet über unspezifische elektrische Anziehungskräfte an Membranrezeptoren und wird internalisiert.

2.2.1.2. RCAS-Virus

Viruskonzentrierung

Zur Gewinnung einer konzentrierten Virussuspension wird eine infizierte Fibroblastenkultur (136 cm²-Flasche) mit 12 ml Fibroblastenmedium/10% (v/v) Serumersatzlösung (Nu-Serum V) inkubiert. Das Medium wird täglich gewechselt und gesammelt. Hierzu wird das Medium sterilfiltriert, in N₂ liq. eingefroren und bei -70°C gelagert. Das Medium von 5 Kulturtagen wird ultrazentrifugiert. Die Viruspartikel werden durch Zentrifugation bei 4°C und 68,000 g sedimentiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen und das Pellet durch 1 h Schütteln auf Eis in dem Restvolumen von etwa 100 µl resuspendiert. Die Viruslösung wird aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Bestimmung des Virustiters

Um die Konzentration der Viren in Lösung zu bestimmen, wird eine Verdünnungsreihe der Lösung (10⁻² - 10⁻⁷) erstellt. Fibroblasten werden in einer 35 mm Zellkulturschale mit 4 Kulturarealen in einer Dichte von 5000 Zellen/Areal ausplattiert und mit den verschiedenen Virusverdünnungsstufen infiziert. Der Nachweis der Infektion erfolgt am nächsten Tag immunhistochemisch über den Nachweis des viralen gag-Proteins. Die Anzahl gag-positiver Zellen entspricht dem Produkt aus Titer und Verdünnung.

2.2.2. Kultivierung und Präparierung von Hinterwurzelganglien

Vorbehandlung der Kulturschalen

Zur Herstellung sensorischer Primärkulturen werden 35-mm-Kulturschalen mit vier Arealen (Durchmesser pro Areal, 6 mm) vorbereitet. Die Areale werden mit 150 µl Poly-DL-Ornithin (50% w/v in Boratpuffer) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Dann werden die Schalen zweimal mit Wasser gewaschen und schließlich bei RT getrocknet. Die so vorbereiteten Areale werden 2 h mit 80 µl Laminin (10 µg/ml PBS) beschichtet. Die Schalen werden zweimal mit PBS gewaschen. Das F14-Medium wird unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen in die Schalen gegeben.

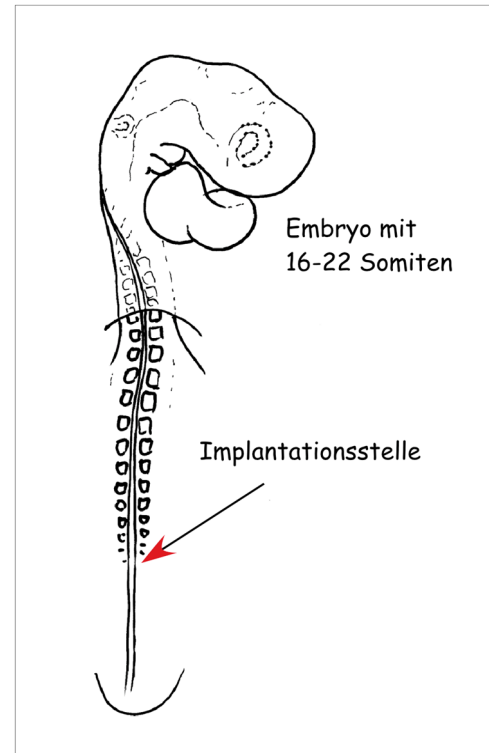
Präparation und Kulturbedingungen

Zur Gewinnung von Hinterwurzelganglien werden 5 Tage alte Hühnerembryonen verwendet. Die präparierten Ganglien werden PBS/Glucose (1 mg/ml) gesammelt. Das Gewebe wird mit einer silikonisierten Pasteurpipette in ein steriles Röhrchen überführt, mit PBS/Glucose gewaschen und in 1 ml PBS/Glucose gesammelt. Durch Zugabe von 100 µl Trypsinlösung werden die Ganglien unter Schwenken im Wasserbad bei 37°C innerhalb von 4-5 min dissoziiert. Das Trypsin wird durch Zugabe von 100 µl Sojabohntrypsininhibitor, 20 µl DNaseI (2 mg/ml) und 1 ml Medium beendet. Die Ganglien werden in Medium gewaschen und anschließend durch mehrmaliges Auf- und Absaugen in einer silikonisierten Pasteurpipette trituriert. Die Zellen werden in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/35mm Schale in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml Medium mit 20 ng NGF auf Laminin-beschichteten Schalen ausplattiert. Die Kulturen werden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.3. Implantation von Fibroblastenaggregaten

Für die Implantationen werden SPAFAS-Eier in einem Brutschrank bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % zwei Tage inkubiert. Die verwendeten Embryonen besitzen zum Zeitpunkt der Implantation 16-22 Somiten. Um die Dotter der Eier abzusenken, werden mit einer sterilen Spritze 4 ml Eiweiß aus dem Ei abgesaugt. Das Ei wird mit Klebeband (Scotch 3M) abgeklebt und mit einer Schere kreisförmig geöffnet. Durch Injektion von Tusche unter die Keimscheibe wird der Embryo sichtbar. Nach Öffnen der Vitrinmembran über dem Implantationsgebiet werden ein oder zwei Aggregate auf Höhe des zuletzt gebildeten Somiten zwischen Somit und Neuralrohr gesteckt. 200 µl einer Antibiotika-Lösung (10% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung in PBS) werden über den Embryo gegeben, das Ei mit Klebeband verschlossen und im Brutschrank bis zur Fixierung weiter bebrütet.

Abb. 2.1: Schema des Implantationsortes im Embryo: die beiden Fibroblastenaggregate werden in der Höhe des zuletzt gebildeten Somiten zwischen Somiten und dem Neuralrohr plaziert.



2.2.4. Präparation und Fixierung von Embryonen

Die Embryonen werden aus dem Ei entnommen, in PBS gespült, das Entwicklungsstadium nach Hamburger und Hamilton (1951) bestimmt und je nach Grösse für ca. 2-6 Stunden oder über Nacht bei 4°C mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in NaP-Puffer fixiert. Der Wasseranteil in den Embryonen wird vor dem Einbetten durch Inkubation in 15% (w/v) Saccharose in NaP-Puffer über Nacht bei 4°C reduziert. Das Einbetten der Embryonen in TissueTek erfolgt auf Trockeneis. Die Embryonen werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 oder -70°C gelagert.

2.2.5. Anfertigen von Gefrierschnitten

Die in TissueTek eingebetteten Embryonen werden mit einem Kryostat (Jung Frigocut 2800E, Leica) bei ca. -13-16°C geschnitten. Die 12-16 µm dicken Schnitte werden auf die unbeschichteten Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel) aufgenommen, eine Stunde bei 37°C getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.6. Antikörperfärbungen

Immunhistochemische Färbung auf Gewebeschnitten

Die auf Raumtemperatur angeglichenen Gewebeschnitte werden zunächst mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrundet, um ein Abfließen der Färbelösung vom Objektträger zu verhindern. Das Gewebe wird mit 300 µl einer Lösung aus 10% (v/v) Eselserum in PBS/0,1% Triton X-100 eine Stunde rehydriert. Der erste Antikörper wird in derselben Lösung in einer feuchten

Kammer inkubiert. Am nächsten Tag werden die Schnitte 2 x je 1 h mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Zweitantikörper, der eine Fluoreszenz-Farbstoffmarkierung besitzt. Der Antikörper wurde in PBS/10% Serum/0,1 % Triton X-100 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Abschließend werden die Schnitte 3 x je 10 min in PBS gewaschen und in etwa 50 µl 50% (v/v) Glycerin/PBS eingedeckelt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss).

Immuncytochemische Färbungen auf Kulturen

Die Zellen werden in 35 mm-4-well-Kulturschalen kultiviert. Das in der Schale befindliche Medium wird abgesaugt und die Zellen zweimal mit KRH gewaschen. Die Zellen werden mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur 15 min fixiert. Nach Waschen in PBS werden die Zellen 15 min in PBT1 permeabilisiert. Der erste Antikörper wird in PBT1/10% Eseserum verdünnt und 30 min inkubiert. Die Kulturen werden 3 x je 5 min. in PBS gewaschen und 5 min. in PBT2 äquilibriert. Der Zweitantikörper wird in PBT2/10% Eseserum verdünnt und 30 min. inkubiert. Die Zellen werden 3 x je 10 min. in PBS gewaschen, in etwa 40 µl 50% (v/v) Glycerin in PBS eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.7. In-situ-Hybridisierung

Zum Nachweis der Expression verschiedener Gene in kultivierten Zellen und in Gewebeschnitten wird endogene RNS in situ markiert und angefärbt. Dabei hybridisiert eine genspezifische Gegenstrang-RNS-Sonde an die endogene RNS. Die Sonde wird durch spezifische Alkalische-Phosphatase-gekoppelte Antikörper detektiert. Die alkalische Phosphatase schliesslich setzt in einer Farbreaktion ein Substrat in ein lichtmikroskopisch detektierbares Produkt um. Durch Doppel-in-situ-Hybridisierung kann die Transkription von zwei Genen nachgewiesen werden. Dazu werden zwei verschiedene, unterschiedlich markierte Sonden verwendet. Das zu untersuchende Gewebe wird mit beiden Sonden gleichzeitig hybridisiert. Die Sonden werden in zwei aufeinander folgenden Farbreaktionen nachgewiesen.

In-situ-Hybridisierung auf Gewebeschnitten

Hybridisierungsschritt: Die Gewebeschnitte werden auf Raumtemperatur angeglichen. Die Sonde wird währenddessen in Hybridisierungspuffer (v/v) 1:500 verdünnt und 10 min bei 70°C denaturiert. Auf jeden Objektträger werden 120 µl Sondenlösung gegeben, mit einem sterilen Deckglas abgedeckt und über Nacht in einer mit Waschpuffer benetzten Kammer bei 68°C inkubiert.

Antikörperschritt: Die Gewebeschnitte werden danach zunächst 2 x je eine Stunde bei 65°C in Waschpuffer und schließlich 2 x je eine Stunde in MABT (0,1% (v/v) Tween20 in

Maleinsäurepuffer) gewaschen. 120 µl der Antikörperlösung (Anti-DIG oder anti-Fluorescein, 1:5000 in MABT/20% (v/v) Hühnerserum) werden über Nacht inkubiert. Die Schnitte werden 2 x je eine Stunde in MABT gewaschen.

Farbreaktion: Die Gewebeschnitte werden 10 min mit 500 µl AP-Puffer äquilibriert. Die Farbreaktion wird nach Zugabe von 120 µl Substratlösung (10% (v/v) NBT/BCIP Stocklösung in AP-Puffer) pro Objektträger im Dunkeln in 1 bis 2 Tagen durchgeführt. Die Objektträger werden dabei mit Deckgläsern abgedeckt. Die Reaktion wird durch Waschen in PBS beendet und die Schnitte in vollentsalztem Wasser gewaschen. Die Schnitte werden getrocknet und schliesslich in Kaisers Glyceringelatine eingebettet.

Doppel-in-situ-Hybridisierung

Hybridisierung: Es werden zwei verschiedene, unterschiedlich markierte Hybridisierungssonden (DIG- und Fluorescein-markiert) in einem Volumen von 120 µl auf das Gewebe gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt über Nacht in einer feuchten Kammer bei 68° C.

Erster Antikörperschritt: Die zuerst nachzuweisende Sonde wird mit dem entsprechenden Antikörper markiert (wie oben).

Erste Farbreaktion: Die Gewebeschnitte werden 2 x je 1 Stunde in MABT gewaschen. Danach werden sie 10 min in 500 µl 0,1 M Tris-HCl/4% NaCl (pH 8,2) inkubiert. Eine Tablette Fast-Red (Roche Diagnostics, Mannheim) wird in 2 ml 0,1 M Tris-HCl/4% NaCl (pH 8,2) gelöst und sterilfiltriert. Diese Substratlösung (120 µl/Objektträger) wird auf die Gewebeschnitte gegeben, die Objektträger mit Deckgläsern abgedeckt und die Reaktion wird im Dunkeln etwa 1-2 Tage durchgeführt.

Deaktivierung der alkalischen Phosphatase und zweiter Antikörperschritt:

Die Gewebeschnitte werden 2 x je eine Stunde in MABT gewaschen. Um die Antikörper der ersten Reaktion zu deaktivieren, werden die Gewebeschnitte 10 min in 0,1 M Glycin (pH 1,8) inkubiert. Danach werden die Gewebeschnitte 2 x je 30 min in MABT gewaschen. Der weitere Verlauf wie oben, wobei ein Antikörper gemäss der zweiten markierten Sonde verwendet wird.

Zweite Farbreaktion und Eindeckeln der Schnitte: Die Farbreaktion unter Verwendung des NBT/BCIP-Substrats und das Waschen und Eindeckeln der Schnitte werden wie oben durchgeführt.

In-situ-Hybridisierung auf kultivierten Zellen

Die Zellen werden in 35 mm-4-well-Gewebekulturschalen kultiviert. Das Medium wird entfernt und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur 15 min fixiert. Nach Waschen mit PBS werden die Zellen mit 80 µl Sondenlösung bedeckt und in einer mit Waschpuffer benetzten Kammer

bei 68°C über Nacht inkubiert. Die weitere Behandlung entspricht der Hybridisierung auf Gewebeschnitten. Die gefärbten Zellen werden nach Beendigung der Farbreaktion in 50 % (v/v) Glycerin in PBS mit einem Deckglas eingebettet.

2.2.8. Molekularbiologische Methoden

Vermehrung von Plamid-DNS

Plamid-DNS wurde durch Elektroporation in E.coli-Zellen eingebracht und vermehrt. Die Bakterienzellen wurden einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, der Poren in der Zellmembran entstehen läßt, so dass die im elektrischen Feld beschleunigten DNS-Moleküle in das Zellinnere gelangen. In einer Transformation werden ca. 0,1-0,5 ng Plamid-DNS und 50 µl elektrokompente Zellen (XL1-Blue) eingesetzt. DNS und Bakterien werden gemischt, in eine gekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm, Biorad) gefüllt und einem elektrischen Impuls (5 ms) von 200 W, 25 mF und 2,5 kV (Feldstärke 12 kV/cm) ausgesetzt. Die transformierten E.coli-Zellen werden sofort in 500 µl LB-Medium aufgenommen, in ein steriles Röhrchen überführt und zur Expression der Plamid-vermittelten Resistenzgene für ca. 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wird auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne E. coli Kolonien werden schließlich in Flüssigkultur (LB-Medium, Antibiotikum) überimpft und über Nacht vermehrt.

Präparation von Plamid-DNS

Zur Reinigung von Plamid-DNS aus einer Bakterienkultur werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, lysiert und die freien Plasmide an einer Silikatsäule gebunden und isoliert. Es wurden Säulen und Puffer der Fa. Qiagen nach Herstellervorschrift verwendet. Die gereinigte DNS wird in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode unter Verwendung eines DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems). Als Sequenzierprimer werden, neben T3 und T7, PCR-Primer in einer Konzentration von 5 pmol/µl eingesetzt. Die Reaktion wird nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

Restriktionsspaltung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNS

Zur Linearisierung von Plamid-DNS oder Überprüfung von DNS-Sequenzen kann DNS durch Endonukleasen an definierten Stellen gespalten werden. Pro µg zu spaltender DNS werden 2-5 U Restriktionsenzym in dem vom Hersteller vorgeschriebenen Puffer für 2-5 Stunden bei 37°C zum Verdau eingesetzt. Um die Spaltung zu überprüfen, wird eine Probe des Spaltungsansatzes durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Reaktionsansatz wird mit

Ladepuffer versetzt und im Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung der Gele in Ethidiumbromidlösung (1 µg/µl, 15 min.) wird das Bandenmuster im UV-Durchlicht überprüft und dokumentiert. Die DNS wird, falls sie Verwendung in späteren in vitro Transkriptionen finden soll, über Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und alkoholisch in 1/10 Vol. 3M Na-Acetat und 2,5 Vol. (100%) Ethanol gefällt. Die DNS wird in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 10 µl Wasser aufgenommen. Die Konzentration der DNS wird photometrisch (Spektrophotometer DU640, Beckmann) bei 260 nm gemessen.

Herstellung von RNS-Hybridisierungssonden durch in vitro-Transkription

Die in den in-situ-Hybridisierungen verwendeten Sonden werden durch in vitro Transkription mit dem DIG- oder dem Fluorescein-RNS-Labeling-Kit hergestellt. Ein 20 µl in vitro-Transkriptionsansatz wird mit 1 µg linearisiertem Plasmid, 2 µl Nukleotidmix und 2 µl 0,1M DTT in 1 x in vitro Transkriptionspuffer durchgeführt. Durch Zusatz von 50 U RNase-Inhibitor wird Abbau der neu synthetisierten RNS verhindert. Der Start der Reaktion erfolgt in Abhängigkeit vom verwendeten Promotor durch Zugabe von 10-20 U T3- bzw. T7-RNA-Polymerase. Der Ansatz wird für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und mit Aqu. dest. auf 125 µl aufgefüllt. Die in vitro transkribierte RNS wird mit 10 µl 4 M LiCl und 100 µl Ethanol (100%) über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen in 70% (v/v) Ethanol wird die RNS-Sonde in 100 µl Aqu. bidest aufgenommen.

3. Ergebnisse

Für die Differenzierung sympathischer Nervenzellen ist die Aktivität der Transkriptionsfaktoren Mash-1 und Phox2b eine wesentliche Voraussetzung (Hirsch et al. 1998, Pattyn et al. 1999). In kultivierten Neuralleistenzellen kann durch die Expression von Phox2a und Mash-1 partiell differenzierte Nervenzellen induziert werden (Lo et al. 1998, 1999). Der bHLH-Faktor dHand ist in der Lage, in Neuralleisten-Zellkulturen die Entstehung catecholaminerger Nervenzellen auszulösen (Howard et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Faktoren auch *in vivo* in der Lage sind, die Differenzierung zu sympathischen Nervenzellen zu induzieren.

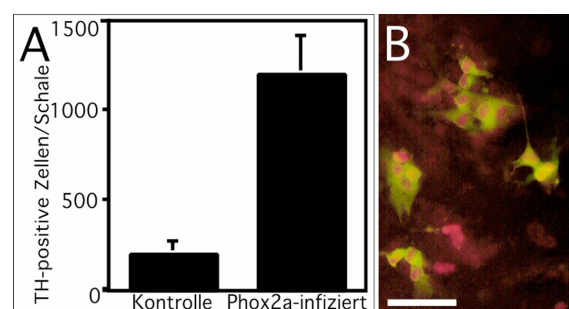
3.1. Überexpression von Transkriptionsfaktoren

3.1.1. Phox2a

Phox2-Transkriptionsfaktoren sind ausreichend, in Neuralleistenzellkulturen die Expression noradrenerger Markergene auszulösen.

Phox2b-Nullmutanten zeigten, dass die Differenzierung von sympathoadrenergen Vorläuferzellen zu sympathischen Nervenzellen direkt von Phox2b abhängig ist (Pattyn et al. 1999). Das Differenzierungspotential beider Phox2-Faktoren wurde auch in Kultursituationen untersucht. Hier führte die virusgesteuerte Überexpression von Phox2-Proteinen in klonalen Kulturen von Neuralleistenzellen der Maus zur Expression von TH. Hierzu war allerdings erforderlich, durch Forskolin-Gabe gleichzeitig den cAMP-Spiegel in den Zellen zu erhöhen (Lo et al. 1999). Außerdem wurde beobachtet, dass die regulatorische Aktivität von Phox2-Proteinen nicht ausreicht, um alle Aspekte sympathischer Differenzierung zu induzieren. Phox2a-induzierte Expression von DBH wurde nicht beobachtet und neuronale Differenzierung (NF160-Expression) wurde nicht ermöglicht. Um die *in vivo*-Rolle von Phox2-Faktoren charakterisieren zu können, sollten Phox2a und Phox2b im Huhnembryo überexprimiert werden. Da die Huhnhomologe nicht zur Verfügung standen, wurden Phox2a und Phox2b aus der Maus in RCAS(B)-Vektoren inkloniert. Um zu testen, ob die Maus-Homologe auch im Huhn wirksam sind, wurden Vorversuche in Neuralleistenkulturen der Wachtel durchgeführt. Es zeigte sich, dass in Phox2a/RCAS(B)-infizierten Kulturen der Anteil TH-immunreaktiver Zellen signifikant erhöht ist (Abb. 3.1). Um *in vivo* in das regulatorische Geschehen innerhalb der sympathoadrenergen Linie ein-

Abb. 3.1: Die Phox2a-Überexpression in Neuralleistenzellkulturen führt zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl TH-positiver Zellen. (A) Die Anzahl TH-positiver Zellen in Kontrollkulturen und in Phox2a/RCAS-infizierten Kulturen wurde quantifiziert. Die Daten zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus 4 Experimenten. (B) Doppel-Immunfärbung für TH (grün) und Phox2a (rot) in Phox2a/RCAS-infizierten Neuralleistenzellkulturen nach 5 Tagen Kulturdauer. Alle TH-immunreaktiven Zellen zeigen auch ein Phox2a-Signal. Abbildungsmaßstab: 50 µm.



zugreifen, wurde zunächst ein Verfahren zur lokalen Virusinfektion entwickelt. Embryonale Hühnerfibroblastenkulturen wurden mit Phox2a/RCAS(B)-DNS transduziert. Vollständig durchinfizierte Kulturen wurden herangezogen, um anschließend die Zellen in hängenden Tropfen zu kultivieren. In dieser Bedingung bilden die Zellen solide Aggregate. Diese Aggregate wurden in zwei Tage alte Hühnembryonen implantiert. Die Implantationsstelle lag auf der Höhe der zuletzt gebildeten Somiten von Embryonen mit 16-22 Somiten. Hier entwickelt sich die Flügelanlage und in dieser rostro-kaudalen Region ist das endogene Expressionsmuster differenzierender sympathischer Nervenzellen detailliert beschrieben (Ernsberger et al. 1995). Es wurden ein oder zwei Implantate seitlich des Neuralrohres auf einer Seite gesetzt (Reissmann et al. 1996). Die Eier wurden sechs weitere Tage bebrütet und dann fixiert. Von den implantierten Exemplaren sowie von Kontrolltieren, die mit dem RCAS(B)-Virus ohne Transgen infiziert wurden, wurden Kryoschnitte angefertigt und diese durch in situ-Hybridisierung untersucht.

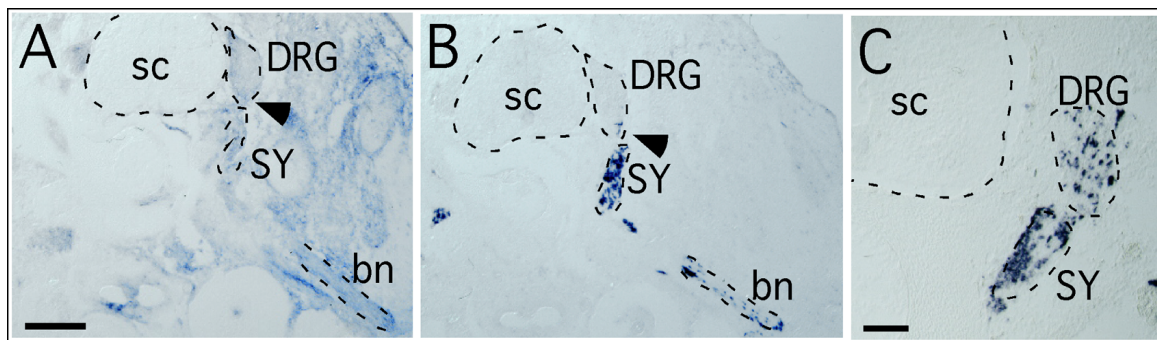


Abb. 3.2: Phox2a-überexprimierende Embryonen zeigen vergrößerte sympathische Ganglien und weisen ektopische TH-mRNA-exprimierende Zellen in den Hinterwurzelganglien und in peripheren Nerven auf. (A) In Embryonen, die an E2 infiziert wurden, zeigt sich an E8 eine starke Ausweitung der Infektion auf eine Vielzahl von Geweben auf der Seite der Implantation (rechts). Die blaue Färbung zeigt die virale reverse-Transkriptase-mRNS an. Infiziert werden unter anderem das Hinterwurzelganglion, das sympathische Ganglion, der Brachialnerv und umgebendes mesenchymales Gewebe. Die Pfeilspitze zeigt die Position ektopischer TH-positiver Zellen im Hinterwurzelganglion an (B). (B) In situ-Hybridisierung mit einer TH-mRNS-Sonde auf einem darauffolgenden Schnitt. Die Fläche des unterhalb des Neuralrohr gelegenen sympathischen Ganglions ist vergrößert. Im Hinterwurzelganglion ist eine kleine Anzahl TH-positiver Zellen zu sehen (Pfeilspitze). Im Brachialnerv erscheinen massiv TH-positive Zellen. (C) Eine stärkere Vergrößerung aus einer anderen Region des Embryos zeigt eine grosse Anzahl TH-positiver Zellen im Hinterwurzelganglion. Die Umrisse bezeichneter Strukturen wurden mit gestrichelten Linien verdeutlicht. Nr, Neuralrohr; SG, Sympathisches Ganglion; HWG, Hinterwurzelganglion; Bn, Brachialnerv. Maßstab 500 μm in (A) - (C).

Phox2-Transkriptionsfaktoren sind ausreichend, um in vivo die ektopische Expression von TH auszulösen.

Der Nachweis der mRNA des viral kodierten Gens reverse Transkriptase (rT) belegt eine nahezu komplette Infektion der Gewebe auf der Implantationsseite mit Ausnahme des Neuralrohrs und der Knochenstrukturen. Während die Infektion zunächst nur auf der Implantationsseite beobachtet werden kann, breitet sie sich sechs Tage nach der Implantation zunehmend auch kontralateral vor allem in mesenchymatischem Gewebe und Muskelgeweben aus (Abb. 3.2 A). Die Analyse der Expression noradrenerger Markergene zeigt eine Expression in vergrößert erscheinenden sympathischen Ganglien, in Zellen des Hinterwurzelganglions sowie in Zellen des Brachialnervs (Abb. 3.2 B). Die ektopische Expression von TH entlang der Spinalnerven konnte bis in die Flügelspitzen beobachtet werden. In Kontrollembryonen, welche den RCAS(B)-Virus ohne Transgen überexprimierten, liessen sich niemals ektopische TH-positive Zellen finden. Dies bedeutet, dass das ektopische Erscheinen des noradrenergen Markers an die Überexpression des Transkriptionsfaktors Phox2a geknüpft ist.

Undifferenzierte Vorläuferzellen im peripheren Nervensystem werden durch Phox2-Faktoren zur Differenzierung gebracht

Wie kommt es zur Entstehung der ektopischen TH-positiven Zellen? Werden sie de novo aus undifferenzierten Vorläuferzellen generiert oder kann der Phänotyp einfach dadurch erklärt werden, dass das Wanderungsverhalten sympathischer Nervenzellen durch die Phox2-Expression verändert wird? Ein Effekt auf die Zellwanderung erscheint möglich, da Phox2a an die Promotorregion des NCAM-Gens bindet (Valarche et al., 1993). NCAM ist an Zelladhäsionsvorgängen und morphogenetischen Prozessen beteiligt und kann auch das Wanderungsverhalten von Zellen beeinflussen (Goridis und Brunet, 1992). Es wurde deshalb überprüft, ob es möglich ist, durch Phox2a-Überexpression in peripheren Vorläuferzellen TH-positive Zellen ohne Beteiligung der sympathischen Ganglien zu generieren. Hierzu wurden die Hinterwurzelganglien von E5-Embryonen herauspräpariert und in Kultur genommen.

Unter den gewählten Kulturbedingungen, die eine sympathische Differenzierung von Neuralleistenzellen ermöglichen, tritt bei den sensorischen Zellen keine Expression von TH auf.

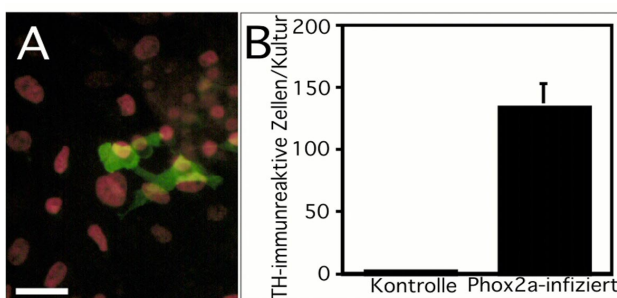


Abb. 3.3: Phox2a-Überexpression in Kulturen aus dissoziierten Hinterwurzelganglionzellen von E5. (A) Doppel-Immunfärbung für TH (grün) und Phox2a (rot) in sensorischen Kulturen nach 5 Tagen Kulturdauer. Das Phox2a-Signal ist beschränkt auf die Kerne infizierter Zellen. Von diesen koexpressieren einige TH. (B) Die Anzahl TH-positiver

Zellen in Kontrollkulturen und Phox2a-überexprimierenden Kulturen wurde ermittelt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Maßstab 25 μ m.

Nach viral induzierter Phox2a-Expression lässt sich jedoch ein starker Anstieg TH-immunreaktiver Zellen nachweisen (Abb. 3.3).

Dies ist ein direkter Nachweis der Fähigkeit von Phox2a, in Zellen ausserhalb der sympathoadrenergen Entwicklungslinie die Expression von TH zu induzieren.

Durch die Überexpression von Phox2 werden noradrenerge und panneuronale Markergene induziert

Phox2a reicht aus, die Expression von TH in undifferenzierten Zellen *in vitro* und *in vivo* auszulösen. Werden auch weitere noradrenerge und auch panneuronale Gene aktiviert? Eine Doppelimmunfärbung in den sensorischen Kulturen zeigt, dass die Phox2a-induzierten TH-positiven Zellen auch das Protein Hu synthetisieren (Abb. 3.4). Dieses ist ein RNS-bindendes Protein und wird nur in neuronalen Zellen exprimiert (Wakamatsu und Weston, 1997). Darüberhinaus weisen die infizierten Kulturen im Gegensatz zu Kontrollkulturen auch Zellen auf, die das DBH-Gen exprimieren (Abb.3.5). Die Anzahl DBH-positiver Zellen und TH-immunreaktiver Zellen nach Phox2a-Expression ist ähnlich hoch (Vgl. Abb. 3.3 und Abb. 3.5).

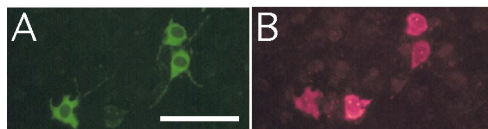


Abb. 3.4: Doppelfärbung für TH und das neuronale Protein Hu in Phox2a-überexprimierenden sensorischen Kulturen nach 5 Tagen Kulturdauer. (A) TH-positive Zellen (grün) in der Kultur. (B) Neuronale Zellen (rot) im selben Bildausschnitt. Die TH-positiven Zellen koexprimieren Hu. Maßstab 50 µm.

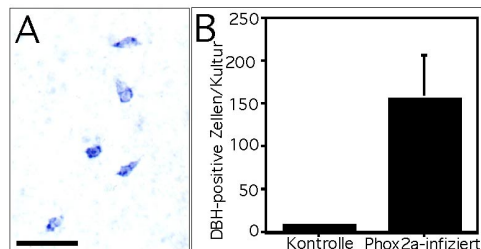


Abb. 3.5: *in situ*-Hybridisierung mit DBH-mRNS-Sonden in Phox2a-überexprimierenden sensorischen Kulturen zeigt einen Anstieg der Anzahl noradrenerger Zellen. (A) DBH-positive Zellen sind blau gefärbt. (B) Quantifizierung der Anzahl DBH-positiver Zellen in Kontrollkulturen und Phox2a/RCAS-infizierten Kulturen. Die Daten zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichung von 9 Plattierungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Masstab 50 µm.

Die Überexpression von Phox2a und Phox2b in vivo führt zur ektopischen Differenzierung sympathischer Nervenzellen.

Die positive Regulierung der adrenergen Markergene und des neuronalen Gens in den Kulturen des Hinterwurzelganglions weist auf ein überraschend grosses Regulationspotential von Phox2a hin. Der volle sympathische Phänotyp umfasst unter anderem die Expression des noradrenergen Gens DBH und natürlich der panneuronalen Gene SCG10 und NF160 (siehe Einleitung). Ist Phox2a ausreichend, um die Entstehung voll differenzierter sympathischer Nervenzellen auszulösen? Um diese Frage zu beantworten wurden die Phox2a-infizierten Embryonen im Bereich ihrer Brachialnerven genauer untersucht. Der Brachialnerv wurde gewählt, da sich in dieser Struktur in der Normalentwicklung keine Nervenzellen bilden. Abb. 3.6 zeigt Ausschnitte aus den Brachialnerven Phox2a/RCAS-infizierter Embryonen an E8. Zellen, die mRNA für TH, DBH und SCG10 aufweisen, liegen vereinzelt oder in kleineren Gruppen zusammengefasst im Gewebe des Brachialnervs vor. Mit einer Doppel-in situ Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die ektopisch auftretenden TH-positiven Zellen auch SCG10-positiv sind (Abb. 3.7). Durch die Überexpression des Phox2a-Transkriptionsfaktors wird somit in vivo ein differenzierter Phänotyp induziert, der nicht nur subtypspezifische noradrenerge Gene, sondern auch panneuronale Gene umfasst.

Sympathische Nervenzellen exprimieren die Rezeptortyrosinkinase c-ret (Pattyn et al. 1999, U. Ernsberger, persönliche Mitteilung). c-ret wird, ähnlich der Situation in den sympathischen Ganglien an E8, in den ektopischen Zellen nach Phox2a-Überexpression in schwacher Expression in wenigen Zellen gefunden (Abb. 3.8). Es war überraschend,

Abb. 3.6: Phox2a-Überexpression in Embryonen führt zur ektopischen Expression von noradrenergen und panneuronalen Markergenen in Zellen des Brachialnervs. In den Brachialnerven Phox2a-implantierter Embryonen werden zahlreiche ektopische Zellen detektiert, die mRNA für TH (A), DBH (B) und SCG10 (C) exprimieren. Zahlreiche gefärbte Zellen liegen gruppiert oder vereinzelt innerhalb des Nervengewebes (Umrisse mit gestrichelter Linie markiert). Maßstab 100 µm.

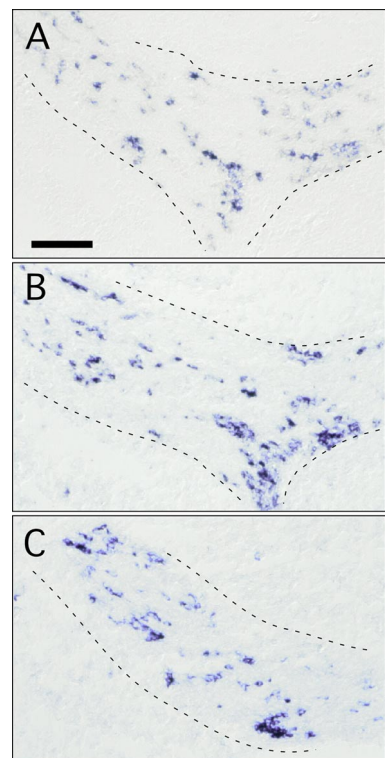
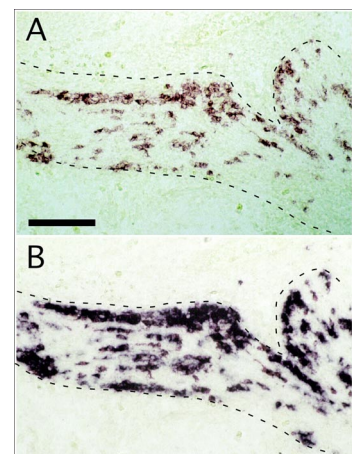


Abb. 3.7: Koexpression noradrenerger und neuronaler Gene nach Doppel-in situ Hybridisierung in Phox2a/RCAS-infizierten Embryonen. (A) Im Brachialnerv sind ektopische TH-positive Zellen (rot) zu sehen. (B) Dieselben Zellen sind durch den Nachweis von SCG10 blau gefärbt. Maßstab 250 µm.



schend, dass die Überexpression von Phox2a ausreicht, noradrenerge und panneuronale Gene sowie c-ret zur Expression zu bringen, da für Phox2a/b in Transaktivationsexperimenten ein Effekt bislang nur auf die Aktivierung von TH und DBH nachgewiesen wurde (Zellmer et al. 1995, Kim et al. 1998, Yang et al. 1998). Andererseits induziert Mash-1 in Neuralleistenkulturen der Maus die Expression neuronaler Gene (Lo et al. 1998) und Cash-1 ist früh in den sympathischen Vorläuferzellen exprimiert (Ernsberger et al. 1995). Es stellte sich somit die Frage, ob

Abb. 3.8: Phox2a-Überexpression in Embryonen führt zur ektopischen Expression von c-ret in Zellen des Brachialnervs. (A) Ein Kontrollembryo zeigt die endogene Expression von c-ret-mRNS im Hinterwurzelganglion und im sympathischen Ganglion. (B) In den Brachialnerven Phox2a/RCAS-infizierter Tiere ist c-ret ektopisch exprimiert. Die Expressionsstärke ist den sympathischen Zellen des Kontrollembryos vergleichbar. Die Umrisse des Hinterwurzelganglions, des sympathischen Ganglions und des Brachialnervs sind mit gestrichelten Linien verdeutlicht. HWG, Hinterwurzelganglion; SG, Sympathisches Ganglion. Maßstab 100 μ m.

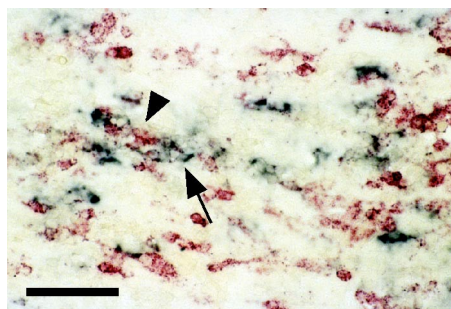
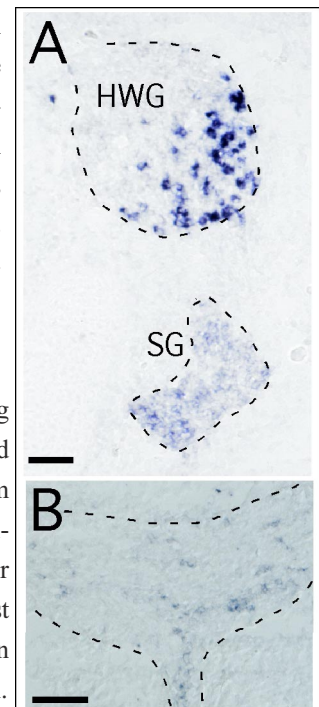
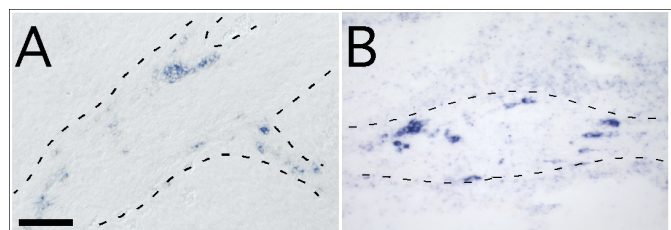


Abb. 3.9: Doppel-in situ-Hybridisierung mit Sonden für die mRNA von TH und Cash-1. Nach Phox2a-Überexpression im Embryo exprimieren Zellen im Brachialnerv ektopisch TH (rote Färbung). Der proneurale Transkriptionsfaktor Cash-1 ist in einer Subpopulation dieser Zellen koexprimiert (Purpur). Maßstab 125 μ m.

durch Phox2a auch die Expression von Cash-1 induziert wird. Tatsächlich beobachtet man die Expression von Cash-1 in den Brachialnerven von Phox2-implantierten Embryonen. Allerdings zeigt die Doppelfärbung von Cash-1 und TH, dass nicht alle Zellen sowohl TH als auch Cash-1 exprimieren (Abb. 3.9). Die Anzahl Cash-1-positiver Zellen (blau gefärbt) ist kleiner als die Anzahl TH-positiver Zellen (rot gefärbt). Die Untersuchung der Expression weiterer Transkriptionsfaktoren ergab, dass neben Cash-1 auch Phox2b sowie dHand in den Phox2a-induzierten ektopischen Populationen vorhanden sind (Abb. 3.10). Dies ist überraschend, da Phox2a im zeitlichen Verlauf der Normalentwicklung nach Cash-1, Phox2b und dHand (siehe unten) exprimiert wird. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Faktoren Cash-1, Phox2b, dHand und Phox2a gegenseitig ihre Expression stimulieren.

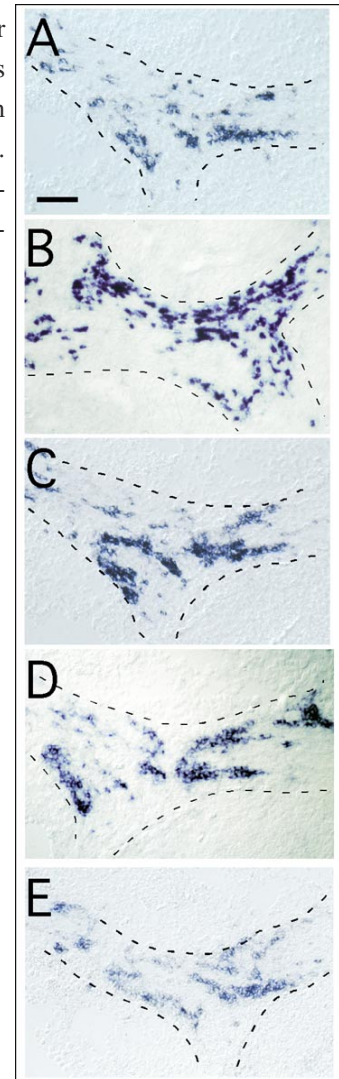
Abb. 3.10: Ektopische Expression von sympathischen Transkriptionsfaktoren in Phox2a/RCAS-infizierten Embryonen. Zellen innerhalb des Brachialnervs, die Phox2b-mRNS (A) und dHand-mRNS (B) exprimieren. Die Umrisse des Nerven sind mit gestrichelten Linien markiert. Maßstab 100 μ m.



3.1.2. Phox2b

Die Überexpression von Phox2b im Huhnembryo führte zu Ergebnissen, die denen der Phox2a-Überexpression glichen. Neben den Transkripten der terminalen Differenzierungsgene TH, DBH, SCG10 (Abb. 3.10, A-C) und NF160 (Daten nicht gezeigt) konnte in Zellen des Brachialnervs auch mRNA der sympathisch-spezifischen Transkriptionsfaktoren dHand und Phox2a nachgewiesen werden (Abb. 3.10, D und E).

Abb. 3.11: In situ-Hybridisierung mit einer Auswahl spezifisch sympathischer mRNS-Sonden in mPhox2b/RCAS-infizierten Embryonen. In Ausschnitten aus den Brachialnerven sind ektopisch Zellen erkennbar, die die sympathischen terminalen Differenzierungsgene TH (A), DBH (B) und SCG10 (C) exprimieren. Die Transkriptionsfaktoren dHand (D) und Phox2a (E) werden in diesen Embryonen ebenfalls ektopisch in Zellen des Brachialnervs exprimiert. Die Umrisse der Brachialnerven sind mit gestrichelten Linien umrandet. Maßstab 50 µm.



3.1.3. dHand und eHand

dHand ist früh in den sympathischen Ganglien exprimiert

Überexpressionsexperimente des bHLH-Faktors dHand in Neuralleistenkulturen der Wachtel hatten gezeigt, dass dHand die Anzahl TH-positiver Zellen signifikant erhöht (Howard et al. 1999). Um herauszufinden, ob dieser Faktors auch in vivo an der Entwicklung des sympathischen neuronalen Phänotyps beteiligt ist, wurde zunächst eine Expressionsanalyse in den sympathischen Ganglien durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass dHand sehr früh in den Vorläufern sympathischen Nervenzellen des Hühnchens exprimiert wird (Abb. 3.12). dHand-positive Zellen können in den primären sympathischen Ganglien auf der Höhe der Flügelanlagen erstmals in Embryonen mit 32/33 Somiten gefärbt werden (Tab. 3.1). Der Zeitpunkt der frühesten Expression, der mittels in situ-Hybridisierung ermittelt werden konnte, folgte direkt auf die erstmalige Expression von Phox2b. Die Expression von Phox2a wird wiederum erst nach dHand angeschaltet. Die Expressionsdaten aus mehreren Embryonen vom ausgehenden HH-Stadium 17 (29-30 Somiten) bis zum späten HH-Stadium 18 (35-36 Somiten) sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die frühe Expression von dHand noch vor dem Beginn der Expression sowohl neuronaler als auch noradrenerger Markergene lässt vermuten, dass dieser Faktor an beiden Regulationsprozessen beteiligt sein kann.

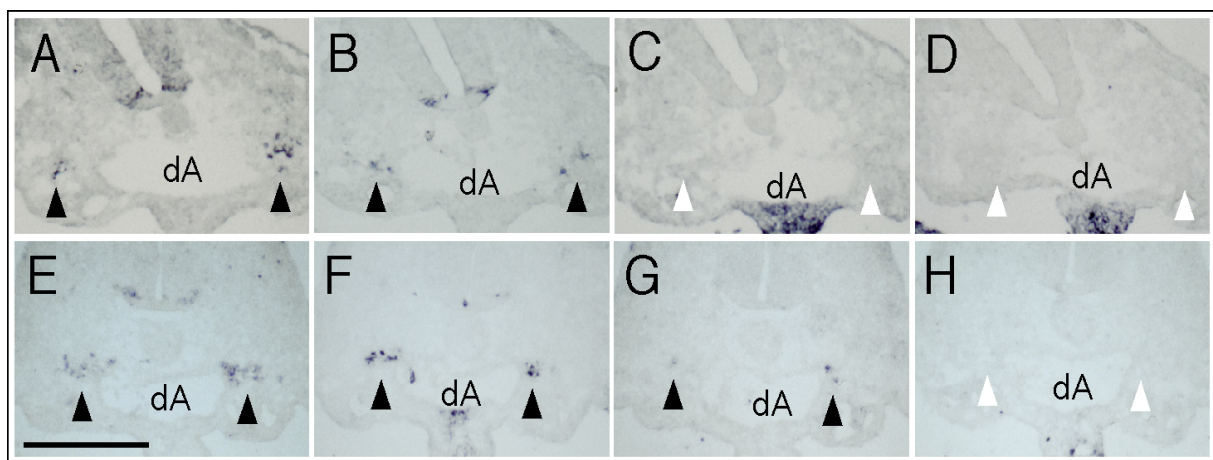


Abb. 3.12: Die Expression von dHand liegt zeitlich zwischen Phox2b und Phox2a. Querschnitte aus der Region der Flügelanlage von Hühnerembryonen im frühen (29 Somiten, A-D) und späten (36 Somiten, E-H) HH-Stadium 18. Im frühen HH-Stadium 18 können durch in situ-Hybridisierung die Zellen der primären sympathischen Ganglien (schwarze Pfeilspitzen) durch Cash-1- (A) und Phox2b-Expression (B) dargestellt werden. Die Folgeschnitte zeigen noch keine dHand- (C) oder eHand-Expression (D) (weisse Pfeilspitzen). Im späten Stadium 18 enthalten die primären sympathischen Ganglien Zellen, die Phox2b (E) und dHand (F) exprimieren (schwarze Pfeilspitzen). Wenige TH-positive Zellen sind erkennbar (G) (schwarze Pfeilspitzen). Im Folgeschnitt (H) ist diese Region (weisse Pfeilspitzen) noch frei von eHand-positiven Zellen. dA, dorsale Aorta. Maßstab 500 µm.

eHand wird erst spät in den sympathischen Ganglien exprimiert

Das dHand-Paralog eHand ist ebenfalls in der Lage, in Neuralleistkulturen die Ausbildung catecholaminerger Zellen zu erhöhen (Howard et al. 1999). Ob dieser Effekt eine Rolle eHands in der frühen Initiation sympathischer Nervenzellen in vivo widerspiegelt, war unklar. Die Untersuchung der entwicklungsabhängigen eHand-Expression in den sympathischen Ganglien sollte den zeitlichen Zusammenhang zur Expression der terminalen Differenzierungsgene aufklären. Es stellte sich heraus, dass eHand in den primären sympathischen Ganglien des Rumpfes erst nach der noradrenergen Differenzierungsphase exprimiert wird. Im späten HH-Stadium 18, in dem die Transkriptionsfaktoren Phox2b, dHand und Phox2a und auch die terminalen noradrenergen Differenzierungsgene TH und DBH schon exprimiert sind, ist in den Ganglien noch keine eHand-Expression nachzuweisen (Abb. 3.12). Da in diesen Embryonen eHand in den Flügelanlagen, in extraembryonalen Membranen und in den cervikalen sympathischen Ganglien detektiert wird, kann es sich nicht um ein Nachweisproblem handeln (Abb. 3.12). Bei E6 und E8 ist schwache eHand-Expression in den sympathischen Ganglien auf Höhe der Flügelanlagen detektierbar (Daten nicht gezeigt). Eine spezifische Rolle für eHand in der frühen, BMP-abhängigen sympathischen Differenzierung kann damit ausgeschlossen werden.

Tab. 3.1: Zeitliche Abfolge der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und des terminalen Differenzierungsgenes TH in den primären sympathischen Ganglien des Hühnchenembryos.

<u>Somiten</u>	<u>29-30</u>	<u>31-32</u>	<u>33-34</u>	<u>35-36</u>
Sonde				
Cash1	+,+	+,+	+	+,+
Phox2b	+,+	+,+	+	+,+
dHand	-, -	+,+	+	+,+
Phox2a	-, -	-, +	+	+,+
TH	-, -	-, -	-	+,+
eHand	-, -	-, -	-	-, -

+ bezeichnet Schnitte mit positiven Zellen in der Gegend der dorsalen Aorta.

- Schnitte zeigen keine positiven Zellen.

Alle Schnitte entstammen der Höhe der Flügelanlage. Schnitte in einer Spalte entstammen dem selben Tier.

in vivo-Überexpression von dHand ist ausreichend, noradrenerge und neuronale Zellen zu induzieren

Wie wird sich die Funktion von dHand auswirken, wenn dieser Transkriptionsfaktor in Vorläuferzellen überexprimiert wird? Ist dHand ausreichend, einen sympathischen Phänotyp *in vivo* ektopisch zu induzieren? Zur Beantwortung dieser Frage wurde wiederum der Überexpressionsansatz mittels der RCAS-Viren gewählt. Die Untersuchung dHand-implantierter Embryonen an E8 ergab, dass dHand die Expression der noradrenergen Markergene TH und DBH in Zellen des Brachialnervs induziert (Abb. 3.13). Zudem konnte nicht nur noradrenerge Genexpression, sondern auch die Expression der panneuronalen Markergene SCG10 und NF160 gezeigt werden (Abb. 3.14). Die neuronalen und die noradrenergen Gene werden in den ektopischen sympathischen Zellen koexprimiert (Abb. 3.15). Diese Ergebnisse weisen auf eine zentrale Rolle von dHand nicht nur in der Spezifizierung des Transmitter-phänotyps, sondern auch bei der koordinierten Expression panneuronaler Eigenschaften hin.

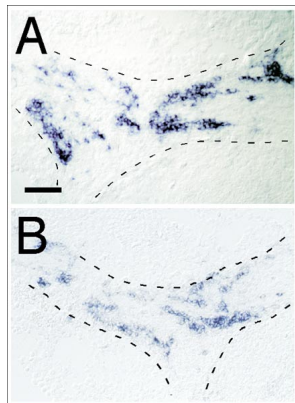


Abb. 3.13: Die Überexpression von dHand im Embryo führt zur Ausbildung eines ektopischen noradrenergen Phänotyps in den Brachialnerven infizierter Tiere. In situ-Hybridisierung mit Sonden gegen TH- (A) und DBH-mRNS (B) färbt positive Zellen in den Brachialnerven. Die Umrisse der Nerven sind mit gestrichelten Linien markiert. Masstab 100 μm .

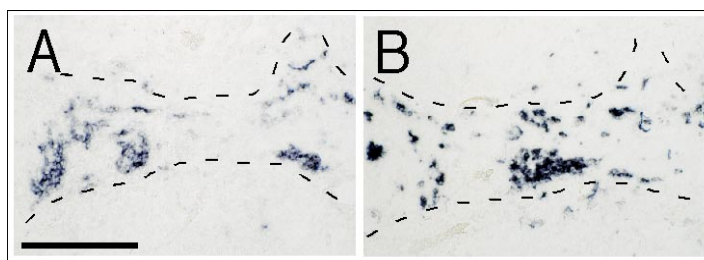


Abb. 3.14: Ektopische Nervenzellen in den Brachialnerven dHand-RCAS-infizierter Embryonen. Die neuronalen Markergene SCG10 (A) und NF160 (B) sind in Zellen des Brachialnervs ektopisch exprimiert. Der Umriss der Nerven ist mit einer unterbrochenen Linie dargestellt. Maßstab 100 μm .

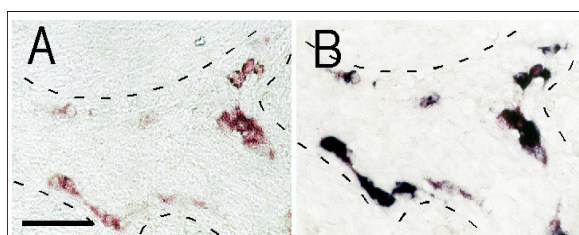


Abb. 3.15: dHand-Überexpression führt zu der Expression von noradrenergen und neuronalen Differenzierungsgenen in denselben Zellen. Nach Doppel-in situ-Hybridisierung gegen mRNA für SCG10 (rote Färbung, A) und TH (blaue Färbung, B) ist ein identisches Färbungsmuster erkennbar. Die Umrisse des Nervs sind mit gestrichelter Linie gekennzeichnet. Maßstab 50 μm .

Die dHand-induzierten ektopischen Zellen im Brachialnerv exprimieren beide Phox2-Transkriptionsfaktoren

Wirkt dHand direkt auf die Promotoren der noradrenergen Gene oder kann seine Wirkung durch andere Transkriptionsfaktoren vermittelt werden? Da Phox2a in der Expressionskaskade der sympathischen Nervenzellen erst nach dHand exprimiert wird, ist es möglich, dass dHand seine induzierende Wirkung auf die TH und DBH-Expression über Phox2a vermittelt. In den Brachialnerven der dHand-infizierten Embryonen wurden Phox2a-positive Zellen gefunden (Abb. 3.16). In den mPhox2a-infizierten Embryonen wurden Phox2b-positive ektopische Zellen nachgewiesen. Kann dHand die Expression von Phox2b hervorrufen? Der Nachweis von Phox2b-mRNS in den Brachialnerven der dHand-implantierten Embryonen bestätigte diese Vermutung (Abb. 3.16). Es ist allerdings unklar, ob diese Fähigkeit ein direkter Effekt von dHand ist. Hier könnte die Induktion über Phox2a verlaufen, von dem gezeigt wurde, dass es in der Lage ist, Phox2b zu induzieren.

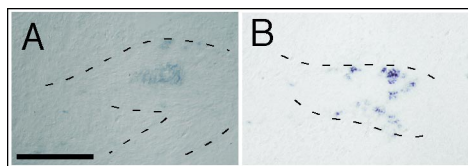
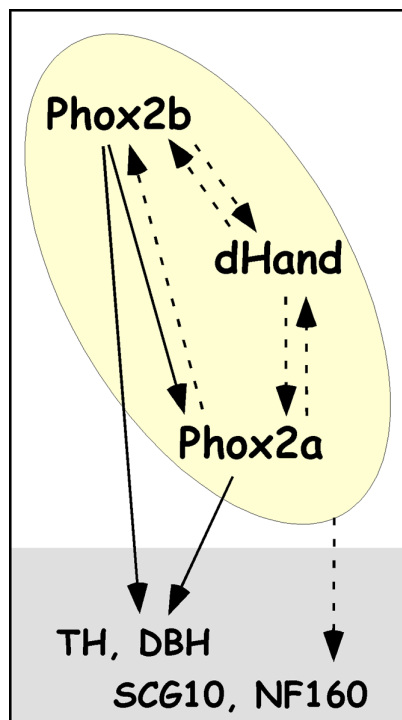


Abb. 3.16: In situ-Hybridisierung mit Sonden gegen die beiden Phox2-Transkriptionsfaktoren. In den Brachialnerven dHand-infizierter Embryonen sind Phox2a (A) und Phox2b (B) ektopisch exprimiert. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Umriss der Nerven. Maßstab 100 μm .



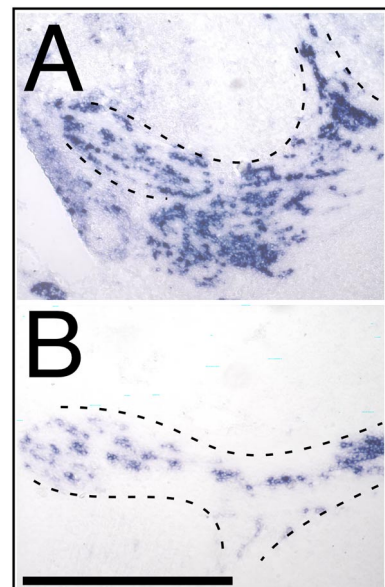
Schema 3.1: Modell der Regulation noradrenerger und panneuronaler Differenzierungsgene durch die Transkriptionsfaktoren Phox2a, Phox2b und dHand. Pfeile sind durchgezogen gezeichnet, wenn gezeigt wurde, dass eine direkte Wechselwirkung besteht. Die Ergebnisse der Überexpression von Phox2b zeigen, dass die Expression von dHand und Phox2a stimuliert wird. Der Phox2a-Promotor kann direkt aktiviert werden (durchgezogener Pfeil, Hong et al. 2001); im Falle der dHand-Expression können andere Gene beteiligt sein (gestrichelter Pfeil). Phox2a und Phox2b binden beide direkt an die TH- und DBH-Promotoren. Phox2a-Überexpression induziert die Expression von dHand und Phox2b. Das einfachste Modell zur Erklärung verlangt eine Aktivierung des Phox2b-Promotors durch Phox2a (gestrichelter Pfeil). dHand-Überexpression führt zur Expression von Phox2b und Phox2a. dHand könnte direkt oder indirekt Phox2a-Expression stimulieren (gestrichelte Pfeil). In allen Fällen werden DBH- und TH-Promotoren aktiviert. Die bisherigen Experimente geben keinen Aufschluß über den Mechanismus der Aktivierung der panneuronalen Gene SCG10 und NF160.

3.1.4. Mash-1

Mash-1 ist ein starker Regulator neuronaler Gene

Die Ash-Transkriptionsfaktoren (Cash-1 beim Hühnchen; Mash1 bei der Maus) sind die frühesten Marker der sympathoadrenergen Zelllinie. Cash-1 wird noch vor den Phox2-Faktoren in den Vorläuferzellen der sympathischen Nervenzellen an der dorsalen Aorta exprimiert (Ernsberger et al. 1995, McPherson et al. 2000). In der Maus ist Mash-1 unter anderem notwendig für die Differenzierung der sympathischen Nervenzellen (Guillemot et al. 1993, Hirsch et al. 1998). Ob das Potential von *achaete scute*-Homologen ausreicht, undifferenzierte Vorläuferzellen zu einer vollen sympathoadrenalen Differenzierung zu bringen, konnte bisher nicht ausreichend beantwortet werden. Das RCAS-System bietet die Möglichkeit, die Wirkung von Mash-1 in vivo zu untersuchen. RCASB/Mash-1-implantierte Tiere wurden an E8 analysiert. Die Untersuchung der Embryonen ergab, dass Mash-1 ausreichend ist, in Zellen des Brachialnervs ektopisch Nervenzellen entstehen zu lassen. In situ-Hybridisierungen mit NF160 und SCG10-Sonden zeigten, dass eine grosse Anzahl positiver Zellen ektopisch entstehen (Abb. 3.17). Im Unterschied zur Phox2- oder dHand-Überexpression waren diese Effekte nicht auf den Brachialnerv begrenzt. Zwar enthielt der Brachialnerv positive Zellen, welche die neuronalen Markergene sehr stark exprimierten; jedoch wurden SCG10- und NF160-positive Zellen auch im angrenzenden mesenchymalen Gewebe gefunden (Abb. 3.17). Die Fähigkeit des proneuronalen Transkriptionsfaktors Mash-1 zur Induktion neuronaler Gene ist also stärker als das Potential von Phox2-Faktoren.

Abb. 3.17: Der proneurale Transkriptionsfaktor Mash1 induziert die Expression neuronaler Gene in Mash1-infizierten Tieren. Zellen der Brachialnerven exprimieren die Gene NF160 (A) und SCG10 (B). Besonders Neurofilament-positive Zellen finden sich auch ausserhalb des Brachialnervs im umliegenden mesenchymatischen Gewebe. Maßstab 500 µm.



Mash-1 überexprimierende Embryonen zeigen ektopische noradrenerge Differenzierung

Ist die Mash-1-Überexpression ausreichend, die Expression noradrenerger Gene zu induzieren? Durch in situ-Hybridisierung mit Sonden gegen TH und DBH konnten tatsächlich noradrenerge Zellen in den Geweben des Brachialnervs Mash-1-infizierter Embryonen detektiert werden (Abb. 3.18). Ein wichtiger Unterschied zu der Induktion neuronaler Charaktere besteht darin, dass noradrenerge Gene nur in Brachialnervenzellen, nicht aber im umgebenden mesenchymatischen Gewebe zur Expression kommen. Die Kompetenz zur Expression von DBH und TH ist beschränkt auf Zellen, die der Neuralleiste entstammen. Im Nerv ist die Anzahl TH-positiver Zellen (Abb.3.18) deutlich kleiner als die Anzahl von SCG10-positiven Zellen. Dies ist ein signifikanter Unterschied zur Phox2a/b und dHand-Überexpression, bei der alle ektopischen Neuronen noradrenerge Eigenschaften aufweisen. Zudem scheint das Ausmaß Mash-1-induzierter noradrenerger Differenzierung kleiner zu sein als nach Phox2-Überexpression: in Mash-1-implantierten Tieren wurden bislang noch keine ektopischen noradrenergen Nervenzellen in den Hinterwurzelganglien detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mash-1 alleine nicht ausreicht, um in nichtneuralen Geweben wie dem Mesenchym Transmitter-Subtypspezifische Gene zu induzieren.

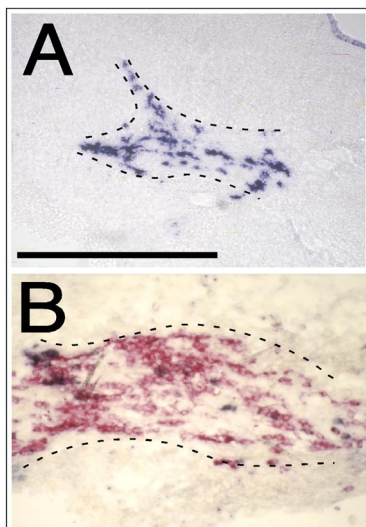


Abb. 3.18: In situ-Hybridisierung gegen noradrenerge Markergene in Mash1-infizierten Embryonen. In den Brachialnerven sind Zellen gefärbt, die ektopisch TH (A) exprimieren. Doppel-in situ-Hybridisierung gegen SCG10 (rot) und TH (blau) in (B) zeigt, dass mehr Zellen SCG10-positiv sind als TH-positiv. Maßstab 500 μm in (A), 125 μm in (B).

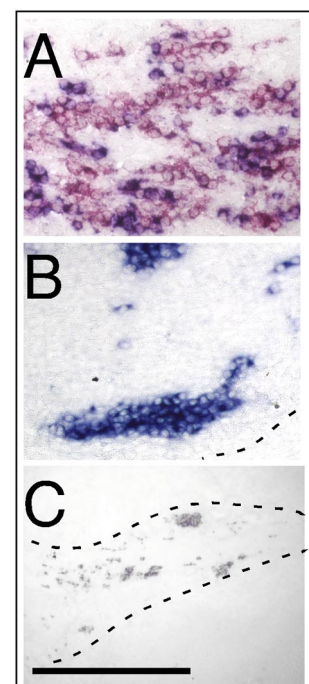


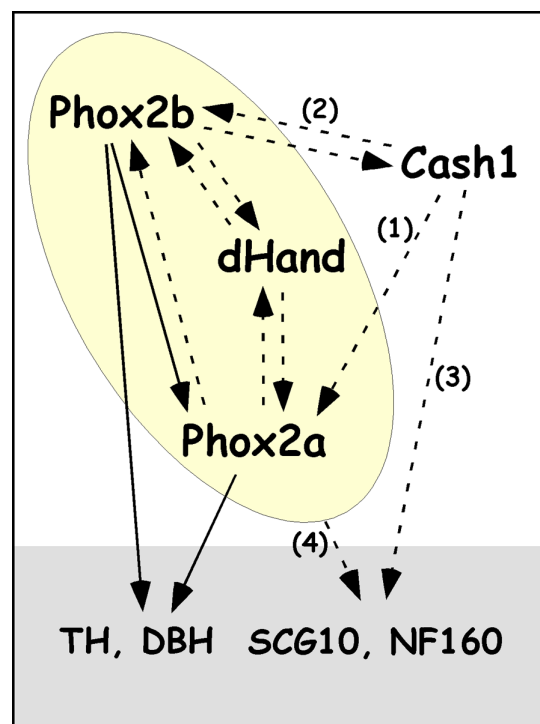
Abb. 3.19: Mash1 ist ausreichend, in den Brachialnerven infizierter Embryonen die Expression von Phox2a und-b und dHand zu induzieren. In situ-Hybridisierung mit Sonden gegen Phox2a (blaue Färbung in (A)), Phox2b (B) und dHand (C). Die Doppel-in situ-Hybridisierung in (A) zeigt, dass mehr Zellen SCG10-positiv sind (rot) als Phox2a-positiv (blaue Färbung). Maßstab in (A) und (B) 125 μm, in (C) 250 μm.

Mash-1 rekrutiert die Transkriptionsfaktoren Phox2b, dHand und Phox2a

Eine Funktion von Mash-1/Cash-1 liegt in der Kontrolle autonomer Subtypen des PNS (Guillemot et al. 1993). In der Mash-1-Mutante ist die Bildung verschiedener autonomer Bereiche des ZNS und des PNS gestört. Diese Bereiche umfassen Nervenzellpopulationen mit verschiedenen Transmitterphänotypen. Cash-1/Mash-1 sind in neuronalen Geweben exprimiert, die in ihrer Entwicklung keinen autonomen oder gar noradrenergen Phänotyp zeigen, z. B. in den Nervenzellvorläufern des ventralen Telencephalons oder in den Nervenzellen des olfaktorischen Epitheliums (Ma et al. 1997, Guillemot et al. 1993). Dies macht klar, dass Mash-1/Cash-1 nicht alleine für die Determinierung des Transmitterphänotyps verantwortlich sein kann. Wie kann Mash-1 die Expression noradrenerger Gene auslösen? Um diese Frage zu klären, wurden die infizierten Embryonen auf die Expression sympathischer Transkriptionsfaktoren untersucht. Es zeigt sich, dass in den Brachialnerven implantierter Tiere Phox2a und Phox2b exprimiert werden (Abb.3.19). Auch hier ist die Expression in den ektopischen Zellen unterschiedlich: von den auftretenden SCG10-positiven Zellen ist nur ein Teil auch Phox2a-positiv (Abb. 3.19). dHand ist in den Brachialnerven ebenfalls ektopisch exprimiert (Abb. 3.19).

Die Ergebnisse aus den Mash-1-Infektionen in vivo zeigen, dass Mash-1 ein stark ausgeprägtes neuronales Induktionspotential besitzt. In nichtneuronalem mesenchymalen Gewebe ist Mash-1 ausreichend, neuronale Genexpression auszulösen. Auch in neuronalen Bereichen ist eine ausgeprägte Expression neuronaler Gene zu beobachten. Mash-1 alleine ist in nichtneuronalen Geweben nicht ausreichend, subtypspezifische Genexpression auszulösen. Dies gelingt jedoch im Brachialnerv, der noch undifferenzierte Vorläuferzellen enthält. Hierzu werden in einem Teil der infizierten Zellen die subtypspezifischen Transkriptionsfaktoren Phox2a/b und dHand rekrutiert. Diese führen dann vermutlich zur Expression von TH und DBH.

Schema 3.2: Modell der Regulation noradrenerger und panneuronaler Differenzierungsgene nach Überexpression von ash-Faktoren: Die Überexpression von Mash1 führt zur Induktion von Phox2a/b und dHand. In einem einfachen Modell genügt eine direkte oder indirekte Aktivierung des Promotors eines oder beider Phox2-Faktoren (1, 2), um diesen Effekt auszulösen (gestrichelte Pfeile). Die Aktivierung der panneuronalen Gene SCG10 und NF160 kann direkt (3) oder indirekt (4) mit oder ohne Beteiligung von Phox2/dHand erfolgen. Zur Rolle von Phox2a/b und dHand siehe Schema 3.1.



3.2. BMP induziert die Expression der Transkriptionsfaktoren Phox2b und dHand in Zellen des Brachialnervs.

Die bisherigen Ergebnisse aus den Überexpressionsexperimenten zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren Mash-1, Phox2b, dHand und Phox2a alle ausreichend sind, einen komplexen sympathischen Phänotyp zu induzieren. Ein wichtiges Ergebnis ist die Beobachtung, dass jeder einzelne Faktor ausreichend ist, die Expression der anderen beteiligten Transkriptionsfaktoren zu stimulieren. Dies führt zu der Vorstellung, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren Cash-1, Phox2a/b und dHand netzwerkartig reguliert wird. Das Potential, auf die Wirkung eines Faktors in dieser Weise zu antworten, ist jedoch auf Zellen innerhalb des Brachialnervs beschränkt.

Es ist wahrscheinlich, dass im Brachialnerv noch undifferenzierte Vorläuferzellen aus der Neuralleiste existieren (Morrison et al. 1999). BMP4 wurde als ein Faktor identifiziert, der in vivo für die sympathische Differenzierung von undifferenzierten Vorläuferzellen der sympathoadrenalen Linie ausreichend und erforderlich ist (Reissmann et al. 1996, Schneider et al. 1999). Kann BMP4 in den Vorläuferzellen des Brachialnervs ebenfalls eine sympathische Differenzierung auslösen? Durch die Infektion von Embryonen mit dem RCAS(B)-Virus wurde viral kodiertes BMP4 exprimiert (Reissmann et al. 1996). Embryonen, denen am zweiten Embryonaltag ein virusproduzierendes Fibroblastenaggregat implantiert wurde, wurden an E8 untersucht. Mittels in situ-Hybridisierungen wurde besonders die Region um die Flügelanlage mit dem Brachialnerv untersucht. Es zeigte sich, dass BMP4 in der Lage ist, innerhalb des Brachialnervs Zellen hervorzubringen, die einen sympathischen Phänotyp aufweisen (Abb. 3.20). Die beobachtete Expression sympathischer Markergene im Brachialnerv umfasste die Transkriptionsfaktoren Phox2b und dHand und die noradrenergen und neuronalen terminalen Differenzierungsgene TH, DBH und SCG10 (Abb. 3.20). Es kann davon ausgegangen werden, dass auch Cash1 und Phox2a (nicht untersucht) wie in der Normalentwicklung auch exprimiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Vorläuferzellen innerhalb des Brachialnervs in der Lage sind, auf BMP4-Signale mit einer spezifischen sympathischen Differenzierung zu antworten. Hiermit wurde zum ersten Mal in vivo gezeigt, dass auch dHand in der Reihe der Transkriptionsfaktoren steht, die in der sympathischen Entwicklungslinie von BMP4 reguliert werden.

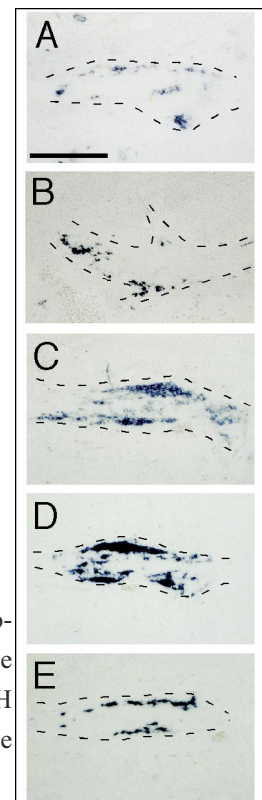
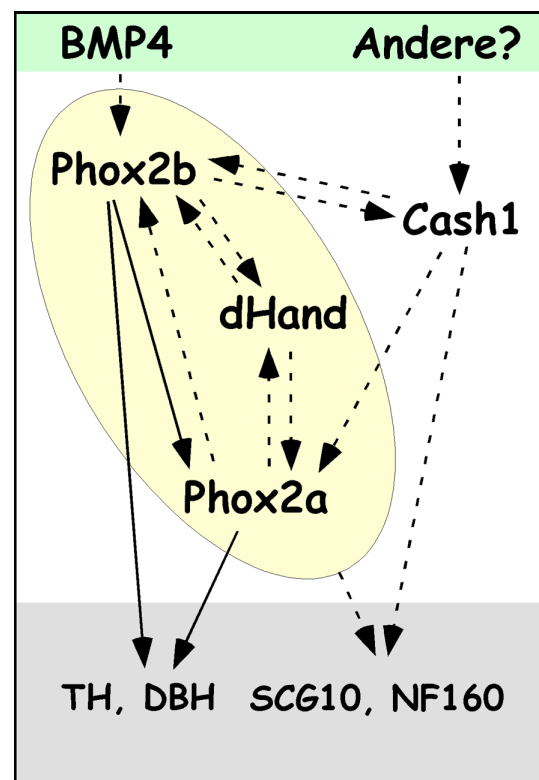


Abb. 3.20: In situ-Hybridisierungen auf Querschnitten BMP4-RCAS-infizierter Embryonen. In den Brachialnerven BMP4-infizierter Tiere sind Zellen, die die transkriptionsregulierenden Gene dHand (A) und Phox2a (B), die noradrenergen Gene TH (C) und DBH (D), sowie das panneuronale Gen SCG10 (E) ektopisch exprimieren. Die durchbrochenen Linien begrenzen die Umrisse der Nerven. Maßstab 100 μ m.

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die entwicklungsabhängige Expression von Transkriptionsfaktoren sympathischer Entwicklungslinie untersucht. Diese Untersuchungen konnten dem bHLH-Transkriptionsfaktor dHand eine prominente Rolle in der frühen Differenzierung sympathischer Nervenzellen zuweisen. dHand wird in engem zeitlichen Zusammenhang mit den Transkriptionsfaktoren Phox2b und Phox2a in den primären sympathischen Ganglien exprimiert. Die erstmalige Expression erfolgt kurz vor der Expression der noradrenergen und neuronalen terminalen Differenzierungsgene TH, DBH, SCG10 und NF160 (Ernsberger et al. 1995). Im Gegensatz dazu konnte eine Rolle des homologen Faktors eHand innerhalb dieses Prozesses ausgeschlossen werden: eHand ist zum Zeitpunkt noradrenergen sympathischen Differenzierung noch nicht in den sympathischen Ganglien exprimiert.

Die Überexpressionsexperimente zielten darauf ab, die Rolle der Transkriptionsfaktoren Cash-1, Phox2a/b und dHand innerhalb der sympathischen Differenzierung zu beleuchten. Es stellte sich heraus, dass jeder der Faktoren in der Lage ist, in undifferenzierten Vorläuferzellen des Brachialnervs den vollen sympathischen Phänotyp zu induzieren. Diese Transkriptionsfaktoren induzieren gegenseitig ihre Expression und bilden so ein regulatorisches Netzwerk. dHand ist Teil dieses Netzwerkes und seine Expression wird zusammen mit Phox2b durch das Differenzierungssignal BMP4 in den Vorläuferzellen peripherer Nerven induziert.



Schema 3.3: Modell zur Regulation von Phox2b und dHand durch BMP4. Nach Überexpression von BMP4 werden Phox2b- und dHand-positive Zellen detektiert.

4. Diskussion

In der Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren Mash-1, Phox2a und Phox2b und dHand ausreichend ist, die Entstehung ektopischer Nervenzellen in den Brachialnerven infizierter Embryonen zu induzieren. Es handelt sich um Nervenzellen, die sowohl panneuronale Gene wie SCG10 und NF160, als auch die noradrenergen Markergene TH und DBH exprimieren. Die Regulation neuronaler und noradrenerger Gene wird wahrscheinlich dadurch vermittelt, dass die Expression der einzelnen Transkriptionsfaktoren ein Regulationsnetzwerk aktivieren. Cash-1, Phox2a/b und dHand selbst sind Teile dieses Netzwerks. Die induzierten noradrenergen Nervenzellen differenzieren sehr wahrscheinlich aus Vorläuferzellen, die sich in der Umgebung der Schwannzellen erhalten haben. Auch die BMP4-Überexpression ist in der Lage, diese Vorläuferzellen zu sympathischer Differenzierung zu bringen. Dies geschieht ebenfalls durch Aktivierung des regulatorischen Netzwerkes unter Beteiligung von Phox2b und dHand.

4.1.1. Die Überexpression von Transkriptionsfaktoren führt zur ektopischen neuronalen Differenzierung

Die Überexpression von Phox2a und Phox2b, dHand und Mash-1 im Huhnembryo induzierte die Differenzierung sympathischer Nervenzellen in verschiedenen Bereichen des peripheren Nervensystems (siehe unten). In den Embryonen gibt es zwei verschiedene Bereiche, in denen dieser Effekt beobachtet wurde: die Hinterwurzelganglien (nur nach Phox2-Expression) sowie die Spinalnerven. Durch die geeignete Auswahl der Implantationsstelle konnte eine bevorzugte Infektion derjenigen Spinalnerven im thorakalen Rumpfbereich erreicht werden, welche in ihrer Gesamtheit den Brachialnerv und den Brachialplexus bilden. Dies ist eine Bündelung von Spinalnerven benachbarter Segmente, die zusammen in die Vorderextremität ziehen und sich innerhalb des Plexuses in definierte Äste verzweigen (Hollyday 1995). Hier wird weiter nur vom Brachialnerv die Rede sein, ohne seine Verzweigungen weiter zu unterscheiden. Die Schwannzellen der Spinalnerven entstammen den Neuralleistenzellen der korrespondierenden Segmente (Carpenter und Hollyday 1992a,b). In den Phox2a-implantierten Embryonen wurde durch den Nachweis verschiedener mRNS-Transkripte in den Zellen demonstriert, dass die beiden betrachteten neuronalen Gene SCG10 und NF160 sowie die beiden noradrenergen Gene TH und DBH ektopisch exprimiert wurden. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die induzierten Zellen SCG10 und TH koexprimieren. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass Phox2a ausreicht, sowohl die Expression neuronaler als auch noradrenerger Differenzierungsgene in denselben Zellen hervorzurufen. Weiter werden in den ektopischen Nervenzellen die Transkriptionsfaktoren Cash-1, das Phox2b-Homolog und dHand exprimiert. All diese Faktoren sind auch in differenzierenden Zellen der primären sympathischen Ganglien exprimiert. Weiter wurde gezeigt, dass eine schwache Expression der Rezeptortyrosin-Kinase c-ret in vergleichsweise wenigen Zellen auftritt. Die sympathischen Nervenzellen in den nichtinfizierten Ganglien kontra-

lateral oder in kontrollinfizierten Embryonen (RCAS(B) ohne Transgen, Daten nicht gezeigt) sind in der Expression panneuronaler und noradrenerger Differenzierungsgene und der Transkriptionsfaktoren Cash-1, Phox2a/b und dHand von den ektopischen Nervenzellen nicht zu unterscheiden. Durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren Mash-1 und dHand wurden ebenfalls ektopisch Nervenzellen induziert, die SCG10, NF160, TH, DBH, dHand und Phox2a/b exprimierten. In der Summe weisen die ektopisch auftretenden Nervenzellen einen peripheren autonomen Phänotyp auf, der dem sympathischen Phänotyp gleicht.

Im Verlauf der Arbeit wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass Phox2a in anderen Systemen für die Expression noradrenerger Phänotypen von Bedeutung ist. In der Phox2a-defizienten Zebrafisch-Mutante *soulless* ist die Entwicklung noradrenerger peripherer und zentralnervöser Nervenzellen gestört. Injektion von *zPhox2a* in Blastomere führt zur Entwicklung ektopischer TH-positiver Nervenzellen im ZNS (Guo et al. 1999). Auch im Huhnembryo führte die Überexpression von Phox2a im Hinterhirn zur Entstehung ektopischer noradrenerger Nervenzellen dorsal des locus coeruleus, des grössten Zentrums noradrenerger Nervenzellen im ZNS (Vogel-Höpker und Rohrer 2002).

4.1.2. Unterschiede zu anderen autonomen peripheren Phänotypen

Die ektopisch induzierten Neurone besitzen eine große Ähnlichkeit mit sympathischen Neuronen. Im Rumpfbereich des Huhns existieren an E8 neben den sympathischen Neuronen jedoch noch andere Zellpopulationen, die DBH- und TH-positiv sind.

Die endokrinen chromaffinen Zellen der Nebenniere, die Adrenalin synthetisieren, exprimieren früh in ihrer Entwicklung auch NF160. Im Gegensatz zu den sympathischen Nervenzellen verlieren sie die Neurofilamentexpression im Verlauf ihrer späten Differenzierung (U. Ernsberger, persönliche Mitteilung). An E8 ist allerdings noch eine deutliche NF160-Expression vorhanden (Combs et al. 2001). Ein starkes Argument gegen eine chromaffine Identität der induzierten Nervenzellen im Brachialnerv ist die Expression der Gene ChAT und VAcHT. Diese sind ebenfalls an E8 schon in den sympathischen Ganglien exprimiert, während die Nebenniere frei von VAcHT- und ChAT-Expression ist.

Darüber hinaus gibt es im Verdauungstrakt von Säugern die Cash-1- und Phox2-positiven Zellen des enterischen Nervensystems, die vorübergehend TH exprimieren (Young et al. 1999, 2001). In den enterischen Populationen des Huhns werden jedoch zu keiner Zeit während der Normalentwicklung TH-positive Zellen beobachtet (Le Douarin et al. 1978). Zudem entstammen die Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems nicht dem thorakalen Bereich, sondern aus dem vagalen und sakralen Bereich.

Weiter wurde gezeigt, dass einige oder alle der Phox2-positiven parasympathischen Nervenzellen des autonomen Nervensystems wenigstens transient DBH und TH exprimieren (Iacovitti et al. 1985, F. Müller; unveröffentlichte Ergebnisse). Gegen eine parasympathischen Identität der induzierten Zellen im Brachialnerv spricht die Tatsache, dass die ektopischen Nervenzellen

dHand und GATA-2 (K. Tsarinova, unveröffentlichte Ergebnisse) exprimieren. dHand- und GATA-2-Expression sind in Zellen des parasymphatischen Ciliarganglions bis E8 nicht vorhanden (F. Müller und N. Tsarinova; persönliche Mitteilung). Nach den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich somit bei den induzierten ektopischen Nervenzellen nicht um chromaffine Zellen, enterische oder parasymphatische Nervenzellen, sondern um sympathische Nervenzellen.

Die Infektion des Embryos mit dHand-exprimierenden Viren erbrachte den Phox2-Überexpressionen vergleichbare Resultate. Auch hier kam es zur Ausbildung ektopischer adrenerg/neuronaler Phänotypen in Zellen des Brachialnervs. Eine Abweichung zu den sehr stabilen Induktionen nach Phox2a-Misexpression war hier allerdings, dass die Anzahl der dHand-induzierten ektopischen Nervenzellen geringer schien als in der Phox2a-Situation.

Es ist nicht klar, wodurch dieser geringere Effekt zustande kommt. Es ist denkbar, dass eine unterschiedliche Effizienz der Transkription aus dem Provirus heraus gegeben ist. Zwar wird die Transkription der proviralen DNS in allen RCAS-Konstrukten durch dieselben Promotoren reguliert; je nach Insertionsort der Virus-DNS in das Wirtsgenom sind aber zellspezifische Unterschiede möglich. Dieses Argument ist allerdings schwach, da eine Vielzahl von Zellen zur Infektion beiträgt und sich Unterschiede in der Expressionsstärke über alle Zellen herausmitteln würden. Ein anderer Befund könnte wichtiger sein: die beiden Phox2/RCAS-Konstrukte besitzen eine Kozak-Sequenz, die die Translation des Proteins aus der mRNS erleichtert. Das dHand/RCAS-Konstrukt hingegen wurde ohne Kozak-Sequenz kloniert. Aus diesem Grund könnte eine unterschiedliche Translationseffizienz der Konstrukte gegeben sein.

4.1.3. Identität der reagierenden Zellen

Welche Zellen sind denn nun in der Lage, das Signal der überexprimierten Transkriptionsfaktoren umzusetzen? Es existieren zwei Möglichkeiten. Entweder werden durch die Expression der Transkriptionsfaktoren differenzierte Gliazellen des Hinterwurzelganglions und des Brachialnervs zu einer Dedifferenzierung und einer anschließenden sympathischen Differenzierung gebracht, oder es existieren noch undifferenzierte Vorläuferzellen im Gewebe des Brachialnervs. Die Existenz von undifferenzierten Vorläuferzellen, auch in späten embryonalen Stadien, wurde mit verschiedenen Methoden demonstriert: Hinterwurzelganglien, die heterotopisch in die Umgebung des Neuralleistenwanderungsweges verpflanzt werden, enthalten Zellen, die zur sympathischen Nervenzellenpopulation in den Ganglien der Wirtstiere beitragen (LeLievre et al. 1980, Rohrer et al. 1986). Zellen aus frühen Hinterwurzelganglienpräparationen der Maus exprimieren unter geeigneten Kulturbedingungen die sympathischen Gene Mash-1, Phox2a und TH, ChAT und NPY (Paulsen und Matsumoto 2000). Schliesslich reagieren in den Kulturen aus sensorischen Hinterwurzelganglien von E5-Embryonen Vorläuferzellen auf Phox2a-Expression (vorliegende Arbeit) und BMP4/5-Gabe (Daten nicht gezeigt) mit TH-Expression. Dies verdeutlicht, dass Vorläuferzellen sensorischer Ganglien in geeigneter Umgebung und mit entsprechenden induzierenden Faktoren einen sympathischen Phänotyp ausbilden können. Auch Nervgewebe

enthält in frühen embryonalen Stadien noch Zellen, die sich Pluripotenz bewahrt haben. Embryonale Nerven (N. ischiadicus) der Maus enthalten zumindest in frühen Entwicklungsstadien unreife, multipotente Vorläuferzellen, die sich durch Fluoreszenz-aktivierte Sortierungsverfahren isolieren lassen. Diesen Zellen fehlt der Schwanzzell-Differenzierungsmarker P0 und sie exprimieren noch den niederaffinen NGF-Rezeptor p75, der ein Marker für undifferenzierte Vorläuferzellen aus der Neuralleiste ist (Rao et al. 1997, Morrison et al. 1999). Sie sind nach Reimplantation in Huhnembryonen noch fähig, sowohl periphere Neuronen als auch Glia hervorzubringen (Morrison et al. 1999). SCG10-positive Nervenzellen aus diesen injizierten Populationen wurden in sympathischen Ganglien und im enterischen Remakganglion von Wirtstieren entdeckt. Einige der Spenderzellen in den sympathischen Ganglien zeigten Phox2b-Expression. Weiterführende Arbeiten zeigten, dass die implantierten Vorläuferzellen der Ratte im sympathischen Ganglion des Wirtshuhns zu c-ret-, GATA-2- und z.T. auch TH-positiven Zellen heranreifen können (White und Anderson 1999, White et al. 2001).

Andererseits gibt es Arbeiten, die eine Dedifferenzierung von differenzierten Nervenzellen in Gliazellen demonstrieren. So verlieren sympathische Neuroblasten noradrenerge Charaktere, wenn sie in Umgebungen kultiviert werden, die die Differenzierung und Erhaltung enterischer Nervenzellen fördern (Pisano und Birren 1999). Umgekehrt verlieren Schwanzzellen Differenzierungsmarker, wenn sie in Kokultur mit enterischen Geweben gebracht werden, welche die Schwanzzellendifferenzierung in der normalen Entwicklung nicht zulassen (Dulac und Le Douarin, 1991). Auch Gliazellen peripherer Ganglien aus dem Huhnembryo verlieren in Kultur sehr rasch ihre differenzierten Eigenschaften (Rüdel und Rohrer, 1986). O-2A-positive Oligodendroglia-Vorläuferzellen können unter geeigneten Bedingungen in Nervenzellen differenzieren (Lillien et al. 1988). Diese Beispiele zeigen, dass durch äussere oder innere Faktoren ein ganz oder teilweise differenzierter Zelltyp beeinflusst werden kann. Solange die Zellen nicht identifiziert sind, die auf die Überexpression der Transkriptionsfaktoren mit der Differenzierung zu sympathischen Nervenzellen antworten, kann keine der beiden Möglichkeiten ausgeschlossen werden. Da die Zahl der durch BMP-Behandlung, bzw. Phox2a-Überexpression entstandenen sympathischen Neuronen im Vergleich zum Umfang der Infektion eher gering ist, scheint es wahrscheinlich, dass die ektopischen noradrenergen Nervenzellen von undifferenzierten Stammzellen des Nervengewebes abstammen. Es existiert die Möglichkeit, in dieser Frage Klärung zu schaffen: es könnte versucht werden, durch Methoden der Immunselektion die in der Maus beschriebene p75⁺/P0⁻-Population auch aus peripherem Nervengewebe des Hühnchens zu isolieren und anzureichern. In dieser Population sollte der Anteil derjenigen Zellen sehr hoch sein, die noch undifferenziert sind. Diese sollten in der Lage sein, auf BMP4-Signale oder die Expression von Transkriptionsfaktoren mit der Differenzierung zu sympathischen Nervenzellen zu antworten.

4.1.4. Differentielle Antwort auf die Überexpression von Transkriptionsfaktoren in neuronalen und nichtneuronalen Geweben

Die Induktion der noradrenergen Markergene TH und DBH sowie der neuronalen Markergene SCG10 und NF160 nach Expression von Phox2a/b und dHand mit der angewandten Infektionsmethode bleibt beschränkt auf Zellen innerhalb neuraler Anteile des PNS. Infizierte oder nicht-infizierte mesenchymale Gewebe, Muskeln oder Knochen zeigen zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer Phox2- oder dHand-abhängigen Transkription noradrenerger oder neuronaler Gene. Dieser offenkundige Unterschied im Differenzierungsvermögen kann aus der ontogenetisch differentiellen Herkunft erklärt werden. Während der Bildung der Körpergrundgestalt entstehen bestimmte Anteile des Embryos aus unterschiedlichen Keimblättern. So finden während der Neurulation Induktionsprozesse statt, die die Grundlagen für eine Aufteilung ektodermalen Gewebes in Neuroektoderm und nichtneurales Ektoderm legen. In Vertebraten spielen hierbei die aus der Neuralplatte stammenden und später im Neuralrohr lokalisierten Homeobox-Transkriptionsfaktoren der Pax- und der Nkx-Klasse eine aktive Rolle in der Neuralisierung des Ektoderms. Die Expression dieser Faktoren wird durch BMP-Signale im nichtneuronalen Ektoderm unterdrückt, während im neuronalen Ektoderm Inhibitoren von BMPs eine Umgebung schaffen, die die Entwicklung neuraler Phänotypen gestattet. Am Ende dieser Entwicklung steht das Neuralrohr, welches alle ZNS- und den grössten Teil der PNS-Vorläuferzellen enthält.

Im Gegensatz zum Neuroektoderm besitzen weder das Endoderm noch das Mesoderm die Kompetenz, im Laufe der normalen Entwicklung Zellen mit neuronalem Schicksal hervorzubringen.

Es ist wahrscheinlich, dass Phox2a/b und dHand zur Transaktivierung von noradrenergen und pan-neuronalen Genen in neuronalen Geweben auf die Mitwirkung von Kofaktoren angewiesen sind, die in nicht-neuronalen Geweben nicht exprimiert werden. Das Fehlen spezifischer Kofaktoren im mesenchymalen Gewebe könnte eine noradrenerge Differenzierung nach Phox2- oder dHand-Überexpression verhindern. Im Falle der Vorläuferzellen der Schwannzellen des Brachialnervs sieht die Lage anders aus: diese Zellen stammen, wie auch die sympathischen Vorläuferzellen, von der Neuralleiste ab, welche neuroektodermalen Ursprungs ist. Es ist wahrscheinlich, dass undifferenzierte multipotente Zellen im Brachialnerv eine Umgebung bieten, in der Phox2a/b und dHand eventuell benötigte Kofaktoren vorfinden (siehe auch Abschnitt 4.2).

Andererseits gibt es viele Hinweise auf einen inhibitorischen Mechanismus, der dafür verantwortlich ist, dass die Expression neuraler Gene in nichtneuronalen Zellen wirksam und dauerhaft unterdrückt bleibt (Chen et al. 1998, Paquette et al. 2000, Ballas et al. 2001). Ein entscheidender Bestandteil ist der mutmassliche Zinkfinger-Repressor NRSF (neuron-restrictive silencer factor). Eine Vielzahl neuronaler Gene, unter anderen N-Tubulin, NgCAM, SCG10 und NF160, besitzen spezifische Promotorsequenzen, die die Bindung dieses Repressors zulassen (Schoenherr und Anderson 1995). Seine Überexpression im Rückenmark führt zur Störung der Expression von neuronalem N-Tubulin und NgCAM; jedoch nicht von SCG10 und NF160. Auch reicht NRSF-Überexpression nicht aus, die Bildung und Wanderung von Nervenzellen zu verhindern

(Chong et al. 1995, Chen et al. 1998, Paquette et al. 2000). Allerdings ist bekannt, dass neben NRSF noch andere Moleküle daran beteiligt sind, die Expression neuronaler Gene zu beschränken. Diese umfassen die Korepressoren CoREST und Sin3 (Andres et al. 1999, Roopra et al. 2000). Auch für die Promotoren der noradrenergen Differenzierungsgens DBH und für die Gene des cholinergen Locus ChAT und VAcHT sind reprimierende Sequenzen beschrieben worden (Wuenschell et al. 1990, Kim und Kim 1998, De Gois et al. 2000), wenn auch über die physiologische Relevanz im Falle der DBH-Regulierung Uneinigkeit besteht (Kim und Kim 1998, aber Schoenherr und Anderson 1995). Eine entsprechende reprimierende Sequenz kann schliesslich auch für die Promotoren beider Phox2-Faktoren postuliert werden, die in der Normalentwicklung ausschließlich in neuronalen Geweben exprimiert werden. Eine Repression durch den NRSF-Komplex könnte erklären, dass keiner der Transkriptionsfaktoren ausreichend ist, Cash-1, dHand und das andere Phox2-Homolog in den mesenchymalen Zellen zu aktivieren. Detaillierte Untersuchungen der Promotorsequenz von Phox2a und Phox2b sind zur Zeit noch nicht veröffentlicht, so dass nicht klar ist, ob ihre Expression in nichtneuronalen Zellen durch NRSF blockiert werden könnte.

Interessanterweise wird durch Mash-1-Überexpression in mesenchymalen Zellen die Expression neuronaler Gene ausgelöst. Dies führt zu der Annahme, dass Mash-1 in der Lage ist, die Blockierung neuronaler Gene im Mesenchym zu durchbrechen. Die molekulare Grundlage dafür ist unklar.

4.2. Weitere Regulationswege noradrenerger Gene

Neben Phox2a und Phox2b sind noch andere Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, die zur Aktivierung der Promotoren noradrenerger Gene ausreichend sind oder die Phox2-Wirkung verstärken können.

Der cAMP-PKA-Signalweg:

Für ein Zusammenwirken von intrazellulärem cAMP-Niveau und Phox2-Faktoren sprechen mehrere Anhaltspunkte: Phox2a weist in seiner N-terminalen Aktivierungsdomäne eine Aminosäuresequenz auf, über die es mit dem Transkriptions-Koaktivator cAMP-responsive element binding protein (CREB) interagiert (Swanson et al. 2000). CREB selbst verstärkt die Transkription des DBH-Promotors in Abhängigkeit der Proteinkinase A (PKA). Auf dem Promotor von DBH liegen die Bindestellen für CREB und Phox2a direkt nebeneinander (Swanson et al. 1997). Schliesslich zeigen Phox2a/b und PKA in Kofunktionsexperimenten synergistische Effekte auf die DBH-Promotoraktivierung (Adachi et al. 2000). TH-Promotor-Reporterkonstrukte in PC12-Zellen werden nach Membrandepolarisierung und folgendem Kalziumeinstrom aktiviert, wofür das cAMP-responsive element (CRE)- und die activating protein 1 (AP-1)-Bindungsstellen erforderlich sind (Nagamoto-Combs et al. 1997). Wird die TH-Induktion dagegen durch FGF-2-Gabe ausgelöst, ist AP-1 verzichtbar, während CREB weiterhin beteiligt bleibt (Osaka und Sabban 1997). Die Analyse des elektrophysiologischen Verhaltens

neuronal differenzierender Neuralleistenzellen der Ratte zeigte, dass eine Subpopulation der differenzierenden Neurone neben der Expression neuronenspezifischer Proteine auch vom Profil ihrer Kalziumströme her sympathischen Nervenzellen gleicht (Carey und Matsumoto 1999a). Darüberhinaus scheinen während der Phase der Differenzierung spontane Kalziumströme in den Zellen aufzutreten (Carey und Matsumoto 1999b), die über den IP3-Rezeptor reguliert werden (Carey und Matsumoto 2000). In dichten Kulturen korrelieren diese spontanen transienten Kalziumeinströme mit Mash-1-Immunreaktivität (Matsumoto 2000). Werden diese Ströme blockiert, so unterbleibt die Neurogenese in den Kulturen (Carey und Matsumoto 1999b). Es ist nicht klar, ob Mash-1 in vivo in die Regulation des Kalziumspiegels eingreift oder selbst dessen Ziel ist. Die transiente pharmakologische Induktion der Kalziumaktivität führt weiter zu einem drastischen Anstieg der Zahl Phox2a/Hu-doppelimmunreaktiver Zellen in Kultur, wobei das Phox2a-Signal cytoplasmatisch lokalisiert ist und nur in geringem Anteil der Zellen auch nukleär. Die chronische Steigerung intrazellulärer Kalziumkonzentration verhindert jedoch die Translokation von Phox2a in den Zellkern (Matsumoto 2000).

Die These eines kalziumabhängigen Signalwegs bei der noradrenergen Differenzierung findet Unterstützung in Arbeiten mit Wachtelneuralleistenzellen in klonalen und dichten Kulturen: in dichten Kulturen führten BMP2 wie auch eine pharmakologische Erhöhung des cAMP-Spiegels sowohl einzeln als auch synergistisch zusammenwirkend zur catecholaminergen Differenzierung bzw. TH-Expression der Zellen. In klonal geführten Kulturen zeigte eine Erhöhung des cAMP-Spiegels alleine keine induzierende Wirkung auf die Catecholamin-synthese; der Synergieeffekt mit BMP2-Gabe blieb jedoch deutlich ausgeprägt. RT-PCR-Daten aus dichten Neuralleistenzellkulturen der Wachtel zeigen zudem, dass nur die BMP-Aktivität zu der Expression von Mash-1, Phox2a und Phox2b führt; nicht jedoch die Erhöhung des cAMP-Spiegels (Bilodeau et al. 2000). Andererseits gibt es den TH-induzierenden Effekt eines erhöhten cAMP-Spiegels, welcher Phox2- und Mash-1-unabhängig ist und an dem die PKA beteiligt ist (Bilodeau et al. 2000). Der Effekt des erhöhten cAMP-Spiegels auf die Aktivierung des TH-Genes kann widerspruchsfrei mit dem Vorhandensein eines cAMP-response element (CRE) im TH-Promotor erklärt werden (Kim et al. 1993, Lim et al. 2000).

Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass sich die sympathischen Ganglien in CREB-Mutanten bilden und initiale TH-Expression stattfindet (Lonze et al. 2002). Defekte in der Zellzahl sympathischer Nervenzellen treten erst auf, nachdem die Axone der sympathischen Nervenzellen ihre Zielgebiete erreichen. Das Ausschalten des Zielgebietsstammigen Überlebensfaktors NGF (Nerve growth factor) durch blockierende Antikörper in P0-Mäusen verhindert die Phosphorylierung und Aktivierung von CREB in den superioren Cervikalganglien. Diese Befunde weisen eine mögliche in vivo-Beteiligung von CREB an der Regulierung von TH erst nach Zielgebietskontakt zu. In diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass die Gewebs- und Funktionsspezifische Regulation der TH-Expression sehr komplex ist und eine sehr grossen Promotor-/Enhancerbereich umfasst (Trocme et al. 1998).

Sauerstoffkonzentrationsabhängige Regulation

Ein weitere mögliche Transaktivierung des TH-Promotors geschieht über einen Transkriptionsfaktor, der im Zuge einer Antwort auf Sauerstoff-Mangelzustände exprimiert wird. Dies ist HIF1a/EPAS1 (Hypoxia inducible Transcription Factor/Endothelial PAS protein 1, Tian et al. 1998, Favier et al. 1999). Beide Faktoren binden an Hypoxia responsive Elemente (HRS). HIF1a wird in der normalen Entwicklung sympathischer Ganglien in der Maus und im Huhn exprimiert und kolokalisiert mit Tyrosin-Hydroxylase (Tian et al. 1998, Favier et al. 1999). In der Maus wurde HIF1a-Expression in sympathischen Ganglien schon an E11,5 detektiert (Tian et al. 1998). HIF1a-defiziente Mutanten sterben bis spätestens E16. Der Noradrenalinegehalt in den Körpern dieser Tiere ist gegenüber den Wildtypembryonen um über 40% reduziert und die Letalität der Mutation wird auf eine defiziente Herzentwicklung als Folge des Catecholaminmangels zurückgeführt (Tian et al. 1998). Hypoxische Bedingungen aktivieren TH-Expression in PC12-Kulturen über eine PKA-unabhängige Phosphorylierung von CREB (Breiter-Johnson und Millhorn 1998). Die Wirksamkeit eines sauerstoffabhängigen Regulationsmechanismus auch in Neuralleistenzellkulturen wurde ebenfalls gezeigt: Die Kultivierung von Neuralleistenzellkulturen bei niedrigem Sauerstoff-Partialdruck führte zur vermehrten Expression von TH (Morrison et al. 2000a). Zur Zeit ist nicht klar, ob die Expression des Faktors HIF1a in den sympathischen Ganglien notwendig oder ausreichend für die entwicklungsabhängige Expression noradrenerger Gene ist. Auch ist nicht bekannt, ob eine Wechselwirkung dieses Faktors mit Phox2 oder dHand besteht.

Der MAP-Kinase Signalweg

Die Map-Kinase (MAPK; mitogen-activated protein kinase) und weitere Angehörige dieses Signalwegs (ebenfalls Kinasen) werden assoziiert mit der Weiterleitung von Wachstumsfaktor- und Differenzierungsfaktor-Signalen innerhalb der Zelle (Garrington und Johnson, 1999). Insbesondere sind sie essentiell für die Aktivierung der immediate-early-Gene c-Jun und fos. Die Hemmung dieses Signalwegs in Neuralleistenzellkulturen der Wachtel zeigten, dass die spontane, BMP-unabhängige catecholaminerge Differenzierung in diesen Kulturen MAPK-abhängig ist (Wu und Howard, 2001). Diese Differenzierung wird geleistet durch den Zusatz von Embryoextrakt im Kulturerum, welcher für die Antwortbereitschaft auf BMP-Signale notwendig ist. Die BMP-stimulierte Differenzierung wiederum ist MAPK-unabhängig. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des MAPK-Signalwegs in BMP-unabhängigen Vorgängen; hierbei sind insbesondere nachgeschaltete Proliferations- oder Überlebenswirkungen zu berücksichtigen.

Eine mögliche Rolle für MAPK ergibt sich innerhalb der Weiterleitung von Signalen der GDNF-Familie. MAPK ist Teil des Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalwegs. Der Tyrosin-Kinaserezeptor RET ist früh in sympathischen Neuronen exprimiert (Tsuzuki et al. 1995, Schuchardt et al. 1995, Durbec et al. 1996.) und stellt einen möglichen Aktivator MAPK-abhängiger Signale dar. In der RET-Mutante entwickeln sich die frühen sympathischen Nervenzellen; jedoch ist ihre

Wanderung und die Axonlenkung gestört, so dass sie ihre Zielgebiete nicht erreichen und später sterben (Enomoto et al. 2002). Möglicherweise ergibt sich daraus die Erklärung für MAPK-abhängige catecholaminerge Syntese in der Kultursituation: MAPK könnte eine Rolle im Überleben differenzierter catecholaminerger Neurone spielen. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt, dass MAPK an der Signalweiterleitung des ret-abhängigen GFRA1-Rezeptors beteiligt ist (Mograbi et al. 2002).

Mögliche Überschneidungen der Signalwege

Es konnte eine Verbindung zwischen dem TGF β -Signalweg und der PKA-Aktivität in der embryonalen Ausbildung der Knochen demonstriert werden: die BMP2-stimulierte Knochenentwicklung während der Entwicklung der Extremitäten ist von PKA abhängig (Lee und Chuong 1997). Erst kürzlich wurde ein anderes Beispiel aufgezeigt, das den Zusammenhang zwischen TGF β -Signalwegen und dem PKA-Signalweg in der Embryonalentwicklung illustriert. In der frühen Achsenbildung des Wirbeltierembryos, in der die TGF β -Mitglieder Nodal und BMPs Signale zur Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie beitragen (Whitman und Mercola 2001), wurde die Beteiligung eines endogenen PKA-Inhibitors (PKIa) an der Integration der verschiedenen Signale demonstriert (Kawakami und Nakanishi 2001). In diesem Zusammenhang wäre sicher von Interesse, ob die induzierende Aktivität von BMPs im Kontext der sympathischen Differenzierung in vivo ebenfalls von der Aktivität der PKA abhängig ist. Ein geeignetes Mittel, um in vivo zu interferieren, könnte wiederum die virale Überexpression sein. Um die Notwendigkeit einer PKA-Aktivierung für die sympathische Differenzierung in vivo nachzuweisen, könnte ein PKA-Antagonist wie PKIa in den sympathischen Vorläuferzellen exprimiert werden. Um zu bestimmen, ob eine Stimulierung der PKA in vivo ausreichend ist, könnte versucht werden, durch lokal begrenzte Gabe von Agonisten den cAMP-Spiegel zu erhöhen.

Die Verbindung des cAMP- und des MAPK-Signalwegs ist in verschiedenen Beispielen aufgezeigt worden (Saxena et al. 1999, Stork und Schmitt, 2002). In PC12-Zellen kann cAMP aktivierend auf MAP-Kinasen einwirken (Arslan und Fredholm 2000, Vossler 1997).

4.3. Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren

Die Ergebnisse aus den Überexpressionsversuchen zeigen, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren Cash-1, Phox2a/b und dHand miteinander verknüpft ist. Wie dies geschieht, ist nicht bekannt, da die Promotoren dieser Gene noch nicht untersucht sind. Die Kreuzregulation und gegenseitige Aktivierung der Phox2-Faktoren wurde in vitro untersucht. Demnach ist Phox2a in der Lage, den Phox2b-Promotor direkt zu aktivieren (Hong et al. 2001). Allerdings bringen auch die Phox2- und Mash-1-Mutanten indirekte Erkenntnisse über Regulationswege zwischen den Transkriptionsfaktoren: in den Phox2b-Mutanten unterbleibt die Phox2a-Expression und es findet keine Differenzierung von Vorläuferzellen zu sympathischen Nervenzellen statt (Pattyn et al. 1999). Dies zeigt, dass in der Normalentwicklung sehr wahrscheinlich Phox2a ein Zielgen

von Phox2b darstellt. Die initiale Mash-1-Expression in den Phox2b-Mutanten ist ungestört. Mash-1 ist also nicht in der Lage, Phox2a in der Abwesenheit von Phox2b zu aktivieren. In den Mash-1-defizienten Tieren ist Phox2b-Expression in den sympathischen Vorläuferzellen vorhanden; diese Zellen exprimieren jedoch kein Phox2a (Hirsch et al. 1998). Dies zeigt, dass in der in vivo-Situation Phox2b alleine nicht ausreichend ist, Phox2a-Expression zu aktivieren. Hier ist offensichtlich Mash-1 notwendig, um die Phox2a-Expression auszulösen.

Die Phox2-Überexpression in dieser Arbeit zeigte, dass Cash-1 in einer Subpopulation der TH-positiven ektopischen Zellen exprimiert wird. Es ist möglich, dass Cash-1 sogar in jeder ektopisch auftauchenden Nervenzelle wenigstens vorübergehend exprimiert wird; dass die Expression jedoch, analog zur Situation in den sympathischen Ganglien selbst, nach kurzer Zeit herunterreguliert wird. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob in den Phox2b-implantierten Embryonen die induzierte Phox2a-Expression von Cash-1-Expression begleitet wird.

4.4. Cash-1/Mash-1 in der neuronalen Differenzierung

Mash-1 als auch die Neurogenine Ngn1 und Ngn2 sind in der Lage, im kortikalen neuronalen Differenzierungsprozess zwischen neuronaler und glialer Alternative eine Entscheidung zugunsten neuronaler Differenzierung hervorzurufen. Dies geht aus Untersuchungen kortikaler Vorläuferzellkulturen von Mash-1/Math-3-Doppelmutanten und Ngn1/Ngn2-Doppelmutanten hervor: das Ausschalten der Wirkung proneuraler bHLH-Faktoren führt dazu, dass in den Populationen die gliale Differenzierung gegenüber Wildtyp-Kulturen favorisiert wird (Tomita et al. 2000, Nieto et al. 2001). Eine mögliche Erklärung liefern Ergebnisse aus klonalen Kulturen kortikaler Vorläuferzellen, in denen die Komposition der Klone in Abhängigkeit von Alter analysiert wird. Die ersten Teilungen kortikaler Vorläuferzellen bringen Neurone und Stammzellen hervor; die späten Teilungen Neurone, Stammzellen und Gliazellen (Quian et al. 2000). Eine Verbindung dieser Arbeiten leitet zu der Hypothese, dass die proneuronalen bHLH-Faktoren entweder die Suppression glialer Phänotypen in Tochterzellen aus frühen Teilungen oder die Expansion neuronaler Abkömmlinge verantwortet. Es scheint klar zu sein, dass die gliale Differenzierung nicht stattfindet, solange proneuronale bHLH-Faktoren prominent exprimiert werden (Vetter 2001). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Rolle von Mash-1 für die Entscheidung zugunsten neuronaler Zelltypen. Allerdings gibt es bHLH-Faktoren, die in der Entwicklung glialer Phänotypen äquivalente Rollen einnehmen (Zhou et al. 2000).

Neben der neuronal differenzierenden Wirkung von Mash-1 gibt es Hinweise auf eine weitere Funktion: Transfektion von cDNA neural determinierender bHLH-Faktoren in die embryonale Maus-Karzinomzelllinie P19 führt nicht nur zu deren neuronaler Differenzierung, sondern auch zum vorangehenden Austritt aus dem Zellzyklus unter Beteiligung des Cdk-Inhibitors p27Kip1 (Farah et al. 2000). Die Überexpression des Mash-1 nachgeschalteten Phox2b im Rückenmark reicht aus, um Zellen zum Austritt aus dem Zellzyklus und zur vorzeitigen

Differenzierung in branchio- oder viszerale Motoneuronen zu bewegen (Pattyn et al. 2000b, Dubreuil et al. 2000). Es besteht die Möglichkeit, dass Differenzierungsgene zusätzliche Aufgaben besitzen, die mit der Steuerung des Zellzyklus zu tun haben (Ohnuma und Sabban 1997). Ob Mash-1 selbst Zellzyklus-Gene reguliert, ist nicht bekannt. In der Entwicklung sympathischer Nervenzellen ist eine Beteiligung von Cash-1 oder Phox2-Faktoren an dem Austritt sympathischer Nervenzellen aus dem Zellzyklus unwahrscheinlich, da sympathische Nervenzellen auch nach der phänotypischen Differenzierung mitotisch aktiv sind (Rohrer und Thoenen 1987).

4.5. Die Beziehung zwischen ASH-Faktoren und BMP

Es ist gezeigt worden, dass die Expression von Mash-1 und Cash-1 während der Entwicklung sympathischer Nervenzellen durch BMP2/4 reguliert wird (Schneider et al. 1999). Dabei ist es zur Zeit noch unklar, ob dies ein Effekt auf die initiale Induktion von Cash1 ist oder auf die Aufrechterhaltung der Expression. Hinweise darauf, dass Neuralleistenzellen, die an der dorsalen Aorta ankommen schon Cash-1-positiv sind, bevor sie BMP-Rezeptoren exprimieren (McPherson et al. 2000), deuten vielleicht auf eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Cash1-expression. Demnach würde BMP auf eine Zelle wirken, die schon die Expression proneuronaler ASH-Transkriptionsfaktoren aufweist. BMP würde somit nicht die Entscheidung einer neuronalen Differenzierung herbeiführen, sondern in einer BMPR-positiven Subpopulation der Mash1/Cash1-positiven Zellen die neuronale Differenzierung dieser Zellen gewährleisten, bzw. ermöglichen. In all diesen Fällen würde der initiale Aktivator der ASH-Expression in sympathischen Vorläuferzellen entweder stromaufwärts von BMP und der dorsalen Aorta oder in einem engen Zeitfenster, schon an der dorsalen Aorta, aber noch vor BMPR-Expression, gesucht werden.

Die Überexpression von BMP4 im Huhnembryo zeigt andererseits, dass Vorläuferzellen nicht zwangsläufig durch Cash-1-Expression auf eine neuronale Differenzierung vorbereitet sein müssen. Die Zellen in den Brachialnerven von Kontrolltieren exprimieren in der Normalentwicklung kein Cash-1 und reagieren dennoch auf BMP4 mit der Differenzierung zu sympathischen Neuronen.

4.6. Notch/Delta-Signale in der Sympathogenese

Ein wichtiger Mechanismus, der bei der Entscheidung zwischen Neuron- oder Glia-Schicksal beteiligt ist, ist das Notch-Delta-System. Dieser Signalweg führt in neural-determinierten Geweben die Entscheidung zwischen neuronaler und nichtneuronaler Differenzierung durch laterale Inhibition herbei. Die Aktivierung des membrangebundenen Rezeptors Notch durch den membrangebundenen Liganden Delta einer neuronalen Nachbarzelle führt zur Hemmung der neuronalen Differenzierung über die Aktivierung des bHLH-Repressors Hairy/Enhancer of split (Hes). Es wurde gezeigt, dass in der Entscheidung sensorischer Vorläuferzellen zugunsten neuronaler oder glialer Differenzierung Notch und Delta beteiligt sind (Morrison et al. 2000b). Daten zur Funktion von Notch und Delta in der neuronalen Differenzierung sympathischer Vor-

läuferzellen liegen noch nicht vor. Interessant wäre sicher, ob allein durch die experimentelle Beeinflussung des Notch/Delta-Systems eine Nervenzellbildung in Zellen des Brachialnervs induziert werden kann. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass dazu eine vorherige Aktivierung durch einen proneuralen bHLH-Faktor notwendig ist.

4.7. Mögliche Aufgaben von eHand in der sympathischen Differenzierung

Die Überexpression von eHand im Huhnembryo erbrachte zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf eine Rolle für diesen Transkriptionsfaktor in der frühen Differenzierung von Vorläuferzellen zu sympathischen Nervenzellen. Die entwicklungsabhängige Expression von eHand in den sympathischen Ganglien des Huhns und der Maus legen jedoch eine Rolle in der Entwicklung dieser Zellen nahe. eHand ist in den sympathischen Nervenzellen des Rumpfes an E2 noch nicht exprimiert. In cranialen Ganglien beginnt die Expression an E3 und ist in den sympathischen Ganglien des Rumpfes an E7/8 schwach detektierbar. Der Zeitpunkt frühester Expression in den sympathischen Rumpfganglien wurde nicht genau ermittelt, da er für die initiale BMP-gesteuerte Differenzierung nicht relevant sein kann. Somit ist der mögliche Expressionsbeginn zwischen E3 und E7 anzusetzen. Welche Aufgaben könnten eHand damit zukommen? Es gibt verschiedene Hinweise dafür, dass eHand vielleicht an der cholinergen Differenzierung beteiligt sein kann.

- i. Zwischen dem 4. und dem 6. Tag der Embryonalentwicklung beginnen sich in den sympathischen Ganglien des Huhns die ersten cholinergen Eigenschaften herauszubilden. In diesem Zeitraum wird erstmals die Expression des cholinergen Markermoleküls VAcHT detektierbar (U. Ernsberger, eigene Beobachtungen). Diese Expression findet in bereits noradrenergen Zellen statt, da zu diesem Zeitpunkt alle sympathischen Nervenzellen TH-positiv sind. Die Expression von eHand könnte mit dem Beginn der cholinergen Genexpression auf zellulärer Ebene korrelieren.

- ii. Im Laufe der Entwicklung verliert eine Subpopulation der sympathischen Nervenzellen ihren noradrenergen Phänotyp und erlangt stattdessen einen cholinergen Phänotyp (Ernsberger et al. 1997). Dies bedeutet, dass die Expression noradrenerger Gene reprimiert werden muss, bzw. dass die aktivierende Wirkung von Phox2-Faktoren und dHand inhibiert werden muss. eHand ist in einigen Fällen als Repressor von bHLH-Faktoren beschrieben worden (Bounpheng et al. 2000, Knofler et al. 2002). Weiter ist eine direkte Interaktion zwischen dHand und eHand aufgezeigt worden (Firulli et al. 2000). Es ist möglich, dass eHand daran beteiligt ist, die stabilisierende Wirkung von dHand in einer Subpopulation sympathischer Nervenzellen aufzuheben. In der vorliegenden Untersuchung wurde diese Hypothese nicht untersucht, da das Hauptaugenmerk auf der noradrenergen Differenzierung lag. Mit den vorliegenden Methoden könnte jedoch auch versucht werden, die Rolle von eHand in der Entwicklung sympathischer Nervenzellen genauer herauszuarbeiten.

4.8. Ausblicke

Die Untersuchung der transkriptionellen Kontrolle der Differenzierung sympathischer Nervenzellen wartet mit einigen bemerkenswerten Ergebnissen auf. Hervorzuheben ist, dass eine Induktion sympathischer Nervenzellen in undifferenzierten Vorkäufervellen des peripheren Nervensystems durch Überexpression jedes der untersuchten Transkriptionsfaktoren erreicht wird. Mash1, Phox2a/b und dHand sind jeder für sich ausreichend, den sympathischen Phänotyp in all seinen Facetten hervorzubringen. Eine wichtige Beobachtung hierbei ist, dass alle beteiligten Transkriptionsfaktoren aufgerufen werden. Diese durchgehend beobachtete wechselseitige Verknüpfung der Transkriptionsfaktoren miteinander lässt vermuten, dass nur eine Möglichkeit der transkriptionellen Regulation des sympathischen Phänotyps in vivo sinnvoll ist und realisiert wird. Die Organisation der beteiligten Transkriptionsfaktoren auf genetischer Ebene zu untersuchen, wird einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis des Differenzierungsprozesses liefern.

Nur eine kleine Anzahl von Vorläuferzellen in den Spinalnerven ist potent genug, in dieser Umgebung zu sympathischen Nervenzellen zu differenzieren. Die Voraussetzungen hierfür sind noch völlig unklar. Es wird eine wichtige Fragestellung für zukünftige Untersuchungen sein, diese Zellen zu identifizieren und auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Die begrenzte Anzahl dieser Zellen lässt ihre Untersuchung jedoch schwierig erscheinen. Eine eventuelle Erleichterung hierfür könnte die Isolierung und Vermehrung von peripheren neuronalen Stammzellen durch die selektive Kultivierung in vitro nach dem Vorbild neuronaler Stammzellen aus dem ZNS sein.

Literatur

- Adachi, M., Browne, D. und Lewis, E. J. (2000).** Paired-like homeodomain proteins Phox2a/Arx and Phox2b/NBPhox have similar genetic organization and independently regulate dopamine beta-hydroxylase gene transcription. *DNA Cell Biol.* 19 (9), 539-54.
- Akitaya, T. und Bronner-Fraser, M. (1992).** Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. *Dev. Dyn.* 194 (1), 12-20.
- Anderson, D. J. (1999).** Lineages and transcription factors in the specification of vertebrate primary sensory neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9 (5), 517-24.
- Andres, M. E., Burger, C, Peral-Rubio, M. J., Battaglioli E., Anderson M. E., Grimes J., Dallman J., Ballas N. und Mandel, G. (1999).** CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *PNAS*, 96 (17), 9873-8.
- Arslan, G. und Fredholm, B. B. (2000).** Stimulatory and inhibitory effects of adenosine A(2A) receptors on nerve growth factor-induced phosphorylation of extracellular regulated kinases 1/2 in PC12 cells. *Neurosci Lett.*, 292 (3), 183-6.
- Artinger, K. B. und Bronner-Fraser, M. (1992).** Partial restriction in the developmental potential of late emigrating avian neural crest cells. *Dev. Biol.* 149 (1), 149-57.
- Baetge, G. und Gershon, M. D. (1989).** Transient catecholaminergic (TC) cells in the vagus nerves and bowel of fetal mice: relationship to the development of enteric neurons. *Dev. Biol.* 132 (1), 189-211.
- Baker, C. V., Bronner-Fraser, M. (2001).** Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol.*, 232 (1), 1-61.
- Ballas, N., Battaglioli, E., Atouf, F., Andres, M. E., Chenoweth, J., Anderson, M. E., Burger, C., Moniwa, M., Davie, J. R., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., Brehm, P. und Mandel, G. (2001).** Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* 31 (3), 353-65.
- Bang, A. G und Goulding, M. D. (1996).** Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 25-32.
- Bilodeau, M. L., Boulineau, T., Hullinger, R. L. und Andrisani, O. M. (2000).** Cyclic AMP signaling functions as a bimodal switch in sympathoadrenal cell development in cultured primary neural crest cells. *Mol. Cell. Biol.*, 20 (9), 3004-14.
- Blaugrund, E., Pham, T. D., Tennyson, V. M., Lo, L., Sommer, L., Anderson, D. J. und Gershon, M. D. (1996).** Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Dev.* 122 (1), 309-20.

- Beitner-Johnson, D.** und Millhorn, D. E. (1998). Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J. Biol. Chem.* 273 (31), 19834-9.
- Britsch, S.,** Goerich, D. E., Riethmacher, D., Peirano, R. I., Rossner, M., Nave, K. A., Birchmeier, C. und Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 15 (1), 66-78.
- Burns, A. J.** und Le Douarin, N. M. (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat. Rec.* 262 (1), 16-28.
- Carey, M. B.** und Matsumoto, S. G. (1999a). Neurons differentiating from murine neural crest in culture exhibit sensory or sympathetic-like calcium currents. *J. Neurobiol.* 39 (4), 501-14.
- Carey, M. B.** und Matsumoto, S. G. (1999b). Spontaneous calcium transients are required for neuronal differentiation of murine neural crest. *Dev. Biol.* 215 (2), 298-313.
- Carey, M. B.** und Matsumoto, S. G. (2000). Calcium transient activity in cultured murine neural crest cells is regulated at the IP(3) receptor. *Brain Res.* 862 (1-2), 201-10.
- Carpenter, E. M.** und Hollyday, M. (1992). The distribution of neural crest-derived Schwann cells from subsets of brachial spinal segments into the peripheral nerves innervating the chick forelimb. *Dev. Biol.* 150 (1), 160-70.
- Carpenter, E. M.** und Hollyday, M. (1992). The location and distribution of neural crest-derived Schwann cells in developing peripheral nerves in the chick forelimb. *Dev. Biol.*, 150 (1), 144-59.
- Chen, Z. F.,** Paquette, A. J. und Anderson, D. J. (1998). NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat. Genet.* 20 (2), 136-42.
- Cheng, Y.,** Cheung, M., Abu-Elmagd, M. M., Orme, A. und Scotting, P. J. (2000). Chick sox10, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system. *Res. Dev. Brain Res.* 121 (2), 233-41.
- Chong, J. A.,** Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J. J., Zheng, Y., Boutros, M. C., Altshuler, Y. M., Frohman, M. A., Kraner, S. D. und Mandel, G. (1995). REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 80 (6), 949-57.
- Christiansen, J. H.,** Coles, E. G. und Wilkinson, D. G. (2000). Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 719-724.
- Cornbrooks, E. B.,** Newton, C. J., Forehand, C. J. (1997). Development of differential preganglionic projections to pre- and paravertebral sympathetic ganglia. *J Comp Neurol.*, 382 (1), 1-18.

- Cserjesi, P., Brown, D., Lyons, G. E. und Olson, E. N. (1995).** Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev Biol.*, 170 (2), 664-78.
- Davidson (1991).** Spatial mechanisms of gene regulation in metazoan embryos. *Dev.* 113, 1-26.
- Duband, J. L., Monier, F., Delannet, M. und Newgreen, D. (1995).** Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat.* 154 (1), 63-78.
- Dubreuil, V., Hirsch, M., Pattyn, A., Brunet, J. und Goridis, C. (2000).** The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity. *Dev.* 127 (23), 5191-201.
- Dudley, A. T. und 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 (3), 349-62.
- Dulac, C. und Le Douarin, N. M. (1991).** Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironment. *PNAS*, 88 (14), 6358-62.
- Durbec, P. L., Larsson-Blomberg, L. B., Schuchardt, A., Costantini, F. und Pachnis, V. (1996).** Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development*, 122 (1), 349-58.
- Enomoto, H., Crawford, P. A., Gorodinsky, A., Heuckeroth, R. O., Johnson, E. M. Jr. und Milbrandt, J. (2001).** RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development*, 128 (20), 3963-74.
- Ernsberger, U., Patzke, H., Tissier-Seta, J. P., Reh, T., Goridis, C. und Rohrer, H. (1995).** The expression of tyrosine hydroxylase and the transcription factors cPhox-2 and Cash-1: evidence for distinct inductive steps in the differentiation of chick sympathetic precursor cells. *Mech. Dev.* 52 (1), 125-36.
- Ernsberger, U. und Rohrer, H. (1996).** The development of the noradrenergic transmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Neurochem. Res.* 21, 823-829.
- Ernsberger, U., Patzke, H. und 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 (1-2), 115-26.
- Ernsberger, U. und Rohrer, U., (1999).** Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Cell Tissue Res.* 297, 339-361.
- Ernsberger, U. (2000).** Evidence for an evolutionary conserved role of bone morphogenetic protein growth factors and phox2 transcription factors during noradrenergic differentiation of sympathetic neurons. Induction of a putative synexpression group of neurotransmitter-synthesizing enzymes. *Eur. J. Biochem.* 267 (24), 6976-81.

- Ernsberger**, U., Reissmann, E., Mason, I. und Rohrer, H. (2000). The expression of dopamine b-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. (2001). The development of postganglionic sympathetic neurons: coordinating neuronal differentiation and diversification. *Auton. Neurosci.* 94 (1-2), 1-13.
- Farah**, M. H., Olson, J. M., Sucic, H. B., Hume, R. I., Tapscott, S. J. und Turner, D. L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development*, 127,(4), 693-702.
- Favier**, J., Kempf, H., Corvol, P. und Gasc, J. M. (1999). Cloning and expression pattern of EPAS1 in the chicken embryo. Colocalization with tyrosine hydroxylase. *FEBS Lett.* 462 (1-2), 19-24.
- Federspiel**, M. J. und Hughes, S. H. (1997). Retroviral gene delivery. *Methods Cell Biol.* 52, 179-214.
- Ferreiro**, B., Kintner, C., Zimmerman, K., Anderson, D. und Harris, W. A. (1994). XASH genes promote neurogenesis in *Xenopus* embryos. *Dev.* 120 (12), 3649-55.
- Firulli**, B. A., Hadzic, D. B., McDaid, J. R. und 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, 33567-33573.
- Fode**, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S. L., Anderson, D. J. und Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* 14 (1), 67-80.
- Garrington**, T. P. und Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.*, 11 (2), 211-8.
- Geissen**, M., Heller, S., Pennica, D., Ernsberger, U. und Rohrer, H. (1998). The specification of sympathetic neurotransmitter phenotype depends on gp130 cytokine receptor signaling. *Dev.* 125 (23), 4791-801.
- Gershon**, M. D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7(1), 101-9.
- Ghysen**, A. und Richelle, J. (1979). Bristle determination and pattern formation in *Drosophila*. II. The ac-sc locus. *Dev. Biol.* 70, 438-452.
- Gibbins** I. (1995). Chemical Neuroanatomy of Sympathetic Ganglia. In: „Autonomic Ganglia“, *The Autonomic Nervous System*, Vol. 6. Ed. McLachlan E. M., Burnstock, G., Harwood Academic Publishers, 1. ed. 1995, pp. 73 ff.

- Goridis, C.** und Brunet, J. F. (1992). NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. *Sem. Cell Biol.* 3, 189-197.
- Grens, A.,** Mason, E., Marsh, J. L. und Bode, H. R. (1995). Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the Hydra achaete-scute homolog has proneural activity in *Drosophila*. *Dev.* 121 (12), 4027-35.
- Groves, A. K.,** George, K. M., Tissier-Seta, J. P., Engel, J. D., Brunet, J.F. und Anderson, D. J. (1995). Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons. *Dev.* 121 (3), 887-901.
- Guillemot, F.** (1999). Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp. Cell Res.* 253 (2), 357-64.
- Guillemot, F.,** Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D.J. und Joyner, A.L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, (3), 463-76.
- Guo, S.,** Brush, J., Teraoka, H., Goddard, A., Wilson, S. W., Mullins, M. C. und 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.** und 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, 231-72.
- Hinz, U.,** Giebel, B. und Campos-Ortega, J. A. (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* 76 (1), 77-87.
- Hirsch, M.-R.,** Tiveron, M.-C., Guillemot, F., Brunet, J.-F. und Goridis, C. (1998). Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Dev.* 125, 599-608.
- Hollenberg, S. M.,** Sternglanz, R., Cheng, P. F. und 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 (7), 3813-3822.
- Hollyday, M.** (1995). Chick wing innervation. I. Time course of innervation and early differentiation of the peripheral nerve pattern. *J Comp Neurol.* 357 (2), 242-53.
- Homburger, S. A.** und 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. und Kim, K. S. (2001). Structural and functional characterization of the 5' upstream promoter of the human Phox2a gene: possible direct transactivation by transcription factor Phox2b. *J Neurochem.*, 79 (6), 1225-36.

- Howard**, M. J. und Cserjesi, P. (1996). Chicken eHAND and dHAND influence neural crest cell differentiation. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22, 28.
- Howard**, M., Foster, D. N. und 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. *Dev Biol.*, 215 (1), 62-77.
- Howard**, M. J., Stanke, M., Schneider, C., Wu, X. und Rohrer, H. (2000). The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification. *Dev.* 127 (18), 4073-81.
- Iacovitti**, L., Joh, T. H., Albert, V. R., Park, D. H., Reis, D. J. und Teitelman, G. (1985). Partial expression of catecholaminergic traits in cholinergic chick ciliary ganglia: studies in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 110, 402-412.
- Jänig**, W. und Bräunig, P.: Vegetatives Nervensystem bei Vertebraten und Invertebraten. In: „Neurowissenschaft: vom Molekül zur Kognition“, Hrg. J. Dudel, R. Menzel, R. F. Schmidt, 1. Aufl. 1996, Springer-Verlag, Berlin.
- Kageyama**, R. und Nakanishi, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Current Opinion in Genetics & Dev.* 7 (5), 659-665.
- Kawakami**, M., Nakanishi, N. (2001). The role of an endogenous PKA inhibitor, PKIalpha, in organizing left-right axis formation. *Dev.* (13), 2509-15.
- Kennedy**, C. (1993). ATP as a Cotransmitter with Noradrenaline in Sympathetic Perivascular Nerves. In: *Vascular Innervation and Receptor Mechanisms. New Perspectives.* Eds. Edvinsson, L. and Uddman, R. Academic Press, San Diego, pp. 187 ff.
- Kos**, R., Reedy, M. V., Johnson, R. L. und Erickson, C. A. (2001). The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Dev.* 128, 1467-1479.
- Kim**, K. S., Lee, M. K., Carroll, J. und Joh, T. H. (1993). Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP response element. *J. Biol. Chem.* 268 (21), 15689-95.
- Kim**, H. S., Seo, H., Yang, C., Brunet, J. F. und Kim, K. S. (1998a). Noradrenergic-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites. *J. Neurosci* 18 (20), 8247-60.
- Kim**, H. S., Yang, C. und Kim, K. S. (1998b). The cell-specific silencer region of the human dopamine beta-hydroxylase gene contains several negative regulatory elements. *J Neurochem.*, 71 (1), 41-50.

- Knofler**, M., Meinhardt, G., Bauer, S., Loregger, T., Vasicek, R., Bloor, D. J., Kimber, S. J. und Husslein, P. (2002). Human Hand1 basic helix-loop-helix (bHLH) protein: extra-embryonic expression pattern, interaction partners and identification of its transcriptional repressor domains. *Biochem J.*, 361 (Pt 3), 641-51.
- Krull**, C. E. (2001). Segmental organization of neural crest migration. *Mech. Dev.* 105, 37-45.
- Lallier**, T. E. und Bronner-Fraser, M. (1988). A spatial and temporal analysis of dorsal root and sympathetic ganglion formation in the avian embryo. *Dev. Biol.* 127 (1), 99-112.
- Landis**, S. C. (1988). Neurotransmitter plasticity in sympathetic neurons and its regulation by environmental factors in vitro and in vivo. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 6: The Peripheral Nervous System.* A. Björklund, T. Hökfelt and C. Owman (eds). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam-N.Y., Oxford, 1988. pp. 65-115.
- Le Douarin**, N. M., Teillet, M. A., Ziller, C. und Smith, J. (1978). Adrenergic differentiation of cells of the cholinergic ciliary and Remak ganglia in avian embryo after in vivo transplantation. *PNAS* 75 (4), 2030-4.
- Le Douarin**, N. M. und Smith, J. (1988). Development of the peripheral nervous system: cell line segregation and chemical differentiation of neural crest cells. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 6: The Peripheral Nervous System.* A. Björklund, T. Hökfelt and C. Owman (eds). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam-N.Y., Oxford, 1988. pp. 1-50.
- Lee**, J. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 13-20.
- Le Douarin**, N. M. und Kalcheim, C. (1999). The neural crest. *Developmental and Cell Biology Series 36.* Cambridge University Press, Cambridge, 2nd ed.
- Le Lievre**, C. S., Schweizer, G. G., Ziller, C. M. und LeDouarin, N. M. (1980). Restrictions of developmental capabilities in neural crest cell derivatives as tested by in vivo transplantation experiments. *Dev. Biol.* 77, 362-378.
- Lillien**, L. E., Sendtner, M., Rohrer, H., Hughes, S. M. und Raff, M. C. (1988). Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes. *Neuron*, 1 (6), 485-94.
- Lo**, L., Morin, X., Brunet, J.-F. und Anderson, D. J. (1999). Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells. *Neuron* 22, 693-705.
- Lo**, L., Sommer, L. und Anderson, D. J. (1997). MASH1 maintains competence for BMP2-induced differentiation in post-migratory neural crest cells. *Curr. Biol.* 7, 440-450.
- Lo**, L., Tiveron, M.-C. und 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.

- Lonze, B. E., Riccio, A., Cohen, S., Ginty, D. D. (2002).** Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*, 34 (3), 371-85.
- Lim, J., Yang, C., Hong, S. J. und Kim, K. S. (2000).** Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by the cAMP-signaling pathway: involvement of multiple transcription factors. *Mol. Cell Biochem.* 212 (1-2), 51-60.
- Ma, Q., Kintner, C. und Anderson, D. J. (1996).** Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87 (1), 43-52.
- Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P. und Anderson, D. J. (1997).** Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J. Neurosci.* 17 (10), 3644-52.
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L. und Anderson, D. J. (1998).** neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20 (3), 469-82.
- Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F. und Anderson, D. J. (1999).** Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev.* 13 (13), 1717-28.
- Massague, J. (1998).** TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-91
- Massague, J. (2000).** How cells read TGF-B-Signals. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 169-178.
- Matsumoto, S. G. (2000).** Calcium Transients are Required for the Initiation of Autonomic Neurogenesis. *Soc. Neurosci. Abstr.*
- McPherson, C. E., Varley, J. E. und Maxwell, G. D. (2000).** Expression and regulation of type I BMP receptors during early avian sympathetic ganglion development. *Dev Biol.* 1, 221 (1), 220-32.
- Mograbi, B., Bocciardi, R., Bourget, I., Busca, R., Rochet, N., Farahi-Far, D., Juhel, T. und Rossi, B. (2001).** Glial cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway: importance for the rescue of neuroectodermic cells. *J Biol Chem.*, 276 (48), 45307-19.
- Morin, X., Cremer, H., Hirsch, M-R., Kapur, R. P., Goridis, C. und 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.
- Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C. und Anderson, D. J. (1999).** Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96 (5), 737-49.

- Morrison, S. J., Csete, M., Groves, A. K., Melega, W., Wold, B. und Anderson, D. J. (2000a).** Culture in Reduced Levels of Oxygen Promotes Clonogenic Sympathoadrenal Differentiation by Isolated Neural Crest Stem Cells. *J. Neurosci.* 20, 7370-7376.
- Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G. und Anderson, D.J. (2000b).** Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 26, 101 (5), 499-510.
- Nagamoto-Combs, K., Piech, K. M., Best, J. A., Sun, B. und Tank, A. W. (1997).** Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation. *J. Biol. Chem.* 28, 272 (9), 6051-8.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. und Cooke, J. (1994).** Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264 (5160), 835-9.
- Nieto, M. A. (2001).** The early steps of neural crest development. *Mech. Dev.* 105, 27-35.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O. und Guillemot, F. (2001).** Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29 (2), 401-13.
- Ohnuma, S., Philpott, A. und Harris, W. A. (2001).** Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11 (1), 66-73.
- Osaka, H. und Sabban, E. L. (1997).** Requirement for cAMP/calcium response element but not AP-1 site in fibroblast growth factor-2-elicited activation of tyrosine hydroxylase gene expression in PC12 cells. *Mol. Brain Res.* 49 (1-2), 222-8.
- Paquette, A. J., Perez, S. E. und Anderson, D. J. (2000).** Constitutive expression of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF)/REST in differentiating neurons disrupts neuronal gene expression and causes axon pathfinding errors in vivo. *PNAS* 97 (22), 12318-23.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. und Brunet, J.-F. (1999).** The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399, 367-370.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. und Brunet, J.-F. (1997).** Expression and Interactions of the two closely related homeobox genes *Phox2a* and *Phox2b* during neurogenesis. *Dev.* 124, 4065-4075.
- Pattyn, A., Goridis, C. und Brunet, J.-F. (2000a).** Specification of the Central Noradrenergic Phenotype by the Homeobox Gene *Phox2b*. *Mol. Cell. Neurosci.* 15 (3), 235-243.
- Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C. und Brunet, J. F. (2000b).** Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene *Phox2b*. *Dev.* 127 (7), 1349-58.

- Paulsen, N.** und Matsumoto, S. G. (2000). Progenitor cells with the capacity to differentiate into sympathetic-like neurons are transiently detected in mammalian embryonic dorsal root ganglia. *J. Neurobiol.* 43 (1), 31-9.
- Perez, S. E.,** Rebelo, S., Anderson, D. J. (1999). Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo. *Dev.* 126 (8), 1715-28.
- Perez-Rueda E.** und Collado-Vides J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28 (8), 1838-47.
- Pisano, J. M.** und Birren, S. J. (1999). Restriction of developmental potential during divergence of the enteric and sympathetic neuronal lineages. *Dev.* 126 (13), 2855-68.
- Perris, R.** und Perissinotte, D. (2000). Role of the extracellular matrix during neural crest migration. *Mech. Dev.* 95, 3-21.
- Pla, P.,** Moore, R., Morali, O. G., Grille, S., Martinuzzi, S., Delmas, V. und Larue, L. (2001). Cadherins in neural crest cell development and transformation. *J Cell Physiol.* 189 (2), 121-32.
- Pujol, N.,** Torregrossa, P., Ewbank, J. J., und Brunet, J. F. (2000). The homeodomain protein CePHOX2/CEH-17 controls antero-posterior axonal growth in *C. elegans*. *Dev.* 127 (15), 3361-71.
- Rao, M. S.** und Anderson, D. J. (1997). Immortalization and controlled in vitro differentiation of murine multipotent neural crest stem cells. *J. Neurobiol.* 32 (7), 722-46.
- Reissmann, E.,** Ernsberger, U., Francis-West, P. H., Rueger, D., Brickell, P. M. und Rohrer, H. (1996). Involvement of bone morphogenetic proteins-4 and-7 in the specification of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Dev.* 122, 2079-2088.
- Riederer, B. M.,** Pellier, V., Antonsson, B., Di Paolo, G., Stimpson, S. A., Lütjens, R., Catsicas, S. und Grenningloh, G. (1997). Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *PNAS* 94, 741-745.
- Rohrer, H.,** Acheson, A. L., Thibault, J. und Thoenen, H. (1986). Developmental potential of quail dorsal root ganglion cells analyzed in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 6, 2616-2624.
- Rohrer, H.** und Thoenen, H. (1987). Relationship between differentiation and terminal mitosis: chick sensory and ciliary neurons differentiate after terminal mitosis of precursor cells, whereas sympathetic neurons continue to divide after differentiation. *J Neurosci.*, 7 (11), 3739-48.
- Roopra, A.,** Sharling, L., Wood, I. C., Briggs, T., Bachfischer, U., Paquette, A. J. und Buckley, N. J. (2000). Transcriptional repression by neuron-restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol.*, 20 (6), 2147-57.

Rudel, C. und Rohrer, H. (1992). Analysis of glia cell differentiation in the developing chick peripheral nervous system: sensory and sympathetic satellite cells express different cell surface antigens. *Development*, 115 (2), 519-26.

Ruiz-Gomez, M. und Ghysen, A. (1993). The expression and role of a proneural gene, *achaete*, in the development of the larval nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 12, 1121-30

Saxena, M., Williams, S., Tasken, K. und Mustelin, T. (1999). Crosstalk between cAMP-dependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase. *Nat Cell Biol.*, 1 (5), 305-11.

Schemann, M., Schaaf, C. und Mader, M. (1995). Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *Comp. Neurol.* 353 (2), 161-78.

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

Schoenherr, C. J. und Anderson, D. J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267 (5202), 1360-3.

Schuchardt, A., Srinivas, S., Pachnis, V. und Costantini, F. (1995). Isolation and characterization of a chicken homolog of the *c-ret* proto-oncogene. *Oncogene*, 10 (4), 641-9.

Shah, N. M., Groves, A. K. und Anderson, D. J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85 (3), 331-43.

Skeath, J. B. und Carroll, S. B. (1994). The *achaete-scute* complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J.* 8 (10), 714-21.

Sommer, L., Shah, N., Rao, M. und Anderson, D. J. (1995). The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. *Neuron* 15 (6), 1245-58.

Sommer, L., Ma, Q. und Anderson, D. J. (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 8 (4), 221-41.

Srivastava, D., Cserjesi, P. und Olson, E. N. (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science*, 270 (5244), 1995-9.

Srivastava, D., Thomas, T., Lin, Q., Kirby, M. L., Brown, D. und Olson, E. N. (1997). Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, *dHAND*. *Nat Genet.*, 16 (2), 154-60.

- Stanke, M., Junghans, D., Geissen, M., Goridis, G., Ernsberger, U. und Rohrer, H. (1999).** The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons. *Dev.* 126, 4087-4094.
- Stein, R., Mori N., Matthews, K., Lo, L. C. und 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 (6), 463-76.
- Stern, C. D., Artinger, K. B. und Bronner-Fraser, M. (1991).** Tissue interactions affecting the migration and differentiation of neural crest cells in the chick embryo. *Dev.* 113, 207-216.
- Stork, P. J. und Schmitt, J. M. (2002).** Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.*, 12 (6), 258-66.
- Stuart, J. Newfeld, S. J., Wisotzkey, R. G. und Kumar, S. (1999).** Molecular Evolution of a Developmental Pathway: Phylogenetic Analyses of Transforming Growth Factor- β Family Ligands, Receptors and Smad Signal Transducers. *Genetics* 152, 783–795.
- Swanson, D. J., Zellmer, E. und Lewis, E. J. (1997).** The homeodomain protein Arix interacts synergistically with cyclic AMP to regulate expression of neurotransmitter biosynthetic genes. *J Biol Chem.*, 272 (43), 27382-92.
- Swanson, D. J., Adachi, M. und Lewis, E. J. (2000).** The homeodomain protein Arix promotes protein kinase A-dependent activation of the dopamine beta-hydroxylase promoter through multiple elements and interaction with the coactivator cAMP-response element-binding protein-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275 (4), 2911-23.
- The C. elegans Sequencing Consortium (1998)** Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282, 2012-2018.
- Tian, H., Hammer, R. E., Matsumoto, A. M., Russell, D. W. und McKnight, S. L. (1998).** The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.*, 12 (21), 3320-4.
- Tiveron, M.-C., Hirsch, M.-R. und Brunet, J.-F. (1996).** The Expression Pattern of the Transcription Factor Phox2 Delineates Synaptic Pathways of the Autonomic Nervous System. *J. Neurosci.* 16 (23), 7649-7660.
- Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. und Kageyama, R. (2000).** Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J.* 19 (20), 5460-72.
- Trocme, C., Sarkis, C., Hermel, J. M., Duchateau, R., Harrison, S., Simonneau, M., Al-Shawi, R. und Mallet, J. (1998).** CRE and TRE sequences of the rat tyrosine hydroxylase promoter are required for TH basal expression in adult mice but not in the embryo. *Eur J Neurosci.*, 10 (2), 508-21.

Tsuzuki, T., Takahashi, M., Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M. und Asai, J. (1995). Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene*, 10 (1), 191-8.

Valarché, I., Tissier-Seta, J. -P., Hirsch, M. -R., Martinez, S., Goridis, C. und 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. *Dev.* 119, 881-896.

Varley, J. E., Wehby, R. G., Rueger, D.C. und 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 (4), 434-47.

Varley, J. E. und 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 (1), 84-94.

Varley, J. E., McPherson, C. E., Zou, H., Niswander, L. und Maxwell G. D. (1998). Expression of a constitutively active type I BMP receptor using a retroviral vector promotes the development of adrenergic cells in neural crest cultures. *Dev. Biol.* 1, 196 (1), 107-18.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G. et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* 291, 1304-1351.

Vetter, M. (2001). A turn of the helix: preventing the glial fate. *Neuron* 29 (3), 559-62.

Vogel-Höpker, A und Rohrer, H. (2002). The specification of noradrenergic locus coeruleus (LC) neurones depends on bone morphogenetic proteins (BMPs). *Development*, 129 (4), 983-91.

Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S. und Stork, P. J. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, 89 (1), 73-82.

Wakamatsu, Y. und Weston, J. A. (1997). Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Dev.* 124, 3449-3460.

White, P. M. und Anderson, D. J. (1999). In vivo transplantation of mammalian neural crest cells into chick hosts reveals a new autonomic sublineage restriction. *Dev.* 126 (19), 4351-63.

White, P. M., Morrison, S. J., Orimoto, K., Kubu, C. J., Verdi, J. M. und Anderson, D. J. (2001). Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. *Neuron* 29 (1), 57-71.

Whitman, M. und Mercola, M. (9 Jan 2001). TGF- β Superfamily Signaling and Left-Right Asymmetry. *Science's STKE*: http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2001/64/re1

- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. und Hogan, B. L. (1995).** Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9 (17), 2105-16.
- Wu, X. und Howard, M. J. (2001).** Two signal transduction pathways involved in the catecholaminergic differentiation of avian neural crest-derived cells in vitro. *Mol Cell Neurosci.*, 18 (4), 394-406.
- Wuenschell, C. W., Mori, N., und Anderson, D. J. (1990).** Analysis of SCG10 gene expression in transgenic mice reveals that neural specificity is achieved through selective derepression. *Neuron* 4 (4), 595-602.
- Yamagishi, H., Olson, E. N. und Srivastava, D. (2000).** The basic helix-loop-helix transcription factor, dHAND, is required for vascular development. *J. Clin. Invest.* 105 (3), 261-70.
- Yang, C., Kim, H. S., Seo, H., Kim, C. H., Brunet, J. F. und Kim, K. S. (1998).** Paired-like homeodomain proteins, Phox2a and Phox2b, are responsible for noradrenergic cell-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J. Neurochem.* 71 (5), 1813-26.
- Yip, J. W. (1986).** Migratory patterns of sympathetic ganglioblasts and other neural crest derivatives in chick embryos. *J. Neurosci.* 6 (12), 3465-73.
- Yokoyama, M., Watanabe H. und Nakamura, M. (1999).** Genomic Structure and Functional Characterization of NBPhox (PMX2B), a Homeodomain Protein Specific to Catecholaminergic Cells That Is Involved in Second Messenger-Mediated Transcriptional Activation. *Genomics* 59, 40–50.
- Young, H. M., Ciampoli, D., Hsuan, J. und Canty, A. J. (1999).** Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev. Dyn.* 216 (2), 137-52.
- Young, H. M. und Newgreen, D. (2001).** Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. *Anat. Rec.* 262 (1), 1-15.
- Zechbauer, U. (1995).** Entwicklungsabhängige cholinerge Differenzierung sympathischer Nervenzellen des Huhnembryos: Zeitliche Korrelation mit der Innervation peripherer Zielgebiete und der Expression cholinergischer Differenzierungsfaktoren. Diplomarbeit im Fach Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Zellmer, E., Zhang, Z., Greco, D., Rhodes, J., Cassel, S. und Lewis, E. J. (1995).** A Homeodomain Protein Selectively Expressed in Noradrenergic Tissue Regulates Transcription of Neurotransmitter Biosynthetic Genes. *J. Neurosci.* 15 (12), 8109-8120.
- Zhou, Q., Wang, S. und Anderson, D. J. (2000).** Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25 (2), 331-43.

Bedanken möchte ich mich bei den Personen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

den Herren Hermann Rohrer und Uwe Ernsberger für Betreuung und Inspiration, Frau Brigitte Stanke für Unterstützung und der Arbeitsgruppe für dieses und jenes.

Lebenslauf

Name Matthias Stanke

Geboren am 23.06.1966 in Gomadingen/Offenhausen.

Schulbildung: 1972-75 Besuch der Grundschule in Gammertingen
 1975-76 Besuch des Gymnasiums in Gammertingen
 1976-85 Besuch des Gymnasiums Pfullendorf.
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium: SS 1988-WS1990 Studium der Germanistik an der J.
 W. Goethe-Universität Frankfurt.
 WS 1992-WS 1996 Studium der Biologie an der J. W.
 Goethe-Universität Frankfurt.
 Oktober 1996: Diplomhauptprüfung im FB16

Diplomarbeit: Dezember 1996-Dez. 1997 im MPI für Hirnforschung
 (Abt. Neurochemie).

Seit Juni 1998: Anstellung als Doktorand in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rohrer
der Abt. Neurochemie des MPI für Hirnforschung.

Die Implantation der Fibroblastenaggregate und die Präparation der Hinterwurzelganglien wurden von H. Rohrer vorgenommen. Die Neuralleistenskulturrexperimente wurden gemeinsam mit C. Schneider und A. Scheidig durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, den