

# **Die Rolle der Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in der Entwicklung sympathischer Neurone**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Dipl.-Biol. Mirko Schmidt  
geboren in Hann. Münden, Niedersachsen

Frankfurt am Main (07/2010)  
(D30)

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

Vom Fachbereich Biowissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt als Dissertation angenommen

Dekanin: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. B. Süß  
Prof. Dr. H. Rohrer

Datum der Disputation:

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGEN .....	IV
TABELLEN.....	V
ABKÜRZUNGEN.....	VII
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DAS AUTONOME NERVENSYSTEM .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 DIE ENTSTEHUNG DES PERIPHEREN NERVENSYSTEMS.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 EXTRAZELLULÄRE SIGNALE STEuern DIE INDUKTION UND DIFFERENZIERUNG DER NEURALLEISTENZELLEN .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 DIE INDUKTION DER SYMPATHISCHEN GANGLIEN DURCH DEN BMP-SIGNALWEG .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Das BMP-induzierte regulatorische Netzwerk von Transkriptionsfaktoren.....	8
<b>1.5 DIE FAMILIE DER AP-2-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN .....</b>	<b>18</b>
1.5.1 Struktur und Eigenschaften der AP-2-Familie.....	18
1.5.2 Expressionsmuster von AP-2-Genen.....	19
1.5.3 Die AP-2 $\alpha$ -defizienten Mäuse .....	20
1.5.4 Die AP-2 $\beta$ -defizienten Mäuse.....	20
1.5.5 Die Funktion von AP-2 $\alpha$ in der Entwicklung von Zebrafischembryonen.....	21
1.5.6 Die Rolle der AP-2-Gene in der Entwicklung des noradrenergen Phänotyps.....	22
<b>1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>23</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 MATERIAL.....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Herstellernachweise .....	25
2.1.2 Medien und Lösungen.....	27
2.1.3 DNA-Konstrukte .....	31
2.1.4 Oligonukleotide .....	32
2.1.5 Organismen .....	33
<b>2.2 METHODEN.....</b>	<b>34</b>
2.2.1 Histologische Präparation von embryonalem Gewebe.....	34
2.2.2 Anfertigen von Gefrierschnitten.....	35
2.2.3 <i>In situ</i> -Hybridisierung .....	35
2.2.4 Molekularbiologische Methoden .....	38
2.2.5 Histologische Färbungen .....	46
2.2.6 Mikroskopische Analyse.....	49
2.2.7 Bildbearbeitung und Statistik .....	50

<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 EXPRESSION VON AP-2<math>\alpha</math> UND AP-2<math>\beta</math> IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM DER MAUS .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 ANALYSE DER ENTWICKLUNG SYMPATHISCHER GANGLIEN IN DER AP-2<math>\beta</math><sup>-/-</sup>/AP-2<math>\alpha</math><sup>-/-</sup>-DOPPELNULLMUTANTE .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3 ANALYSE DER DIFFERENZIERUNG SYMPATHISCHER GANGLIEN IN DER AP-2<math>\alpha</math><sup>-/-</sup>-NULLMUTANTE.....</b>	<b>57</b>
<b>3.4 ANALYSE DER AP-2<math>\beta</math><sup>-/-</sup>-NULLMUTANTE.....</b>	<b>59</b>
<b>3.5 DIE FUNKTION VON AP-2<math>\alpha</math> IN AP-2<math>\beta</math><sup>-/-</sup>-SYMPATHISCHEN NEURONEN: ANALYSE DER DIFFERENZIERUNG, PROLIFERATION UND ÜBERLEBEN.....</b>	<b>62</b>
<b>3.6 DIE FUNKTION VON AP-2<math>\alpha</math> IN AP-2<math>\beta</math><sup>-/-</sup>-SYMPATHISCHEN VORLÄUFERZELLEN/NEUROBLASTEN: ANALYSE DER DIFFERENZIERUNG, PROLIFERATION UND ÜBERLEBEN .....</b>	<b>67</b>
<b>3.7 DIE EXPRESSION VON AP-2<math>\alpha</math> UND AP-2<math>\beta</math> IN VORLÄUFERZELLEN DER NEURALLEISTE .....</b>	<b>70</b>
<b>3.8 DIE ROLLE VON AP-2<math>\alpha</math> UND AP-2<math>\beta</math> IN VORLÄUFERZELLEN DER NEURALLEISTE .....</b>	<b>72</b>
3.8.1 Der Verlust von AP-2 $\beta$ führt zum Zelltod einer Subpopulation von Sox10 <sup>+</sup> -Neuralleistenzellen.....	72
3.8.2 Analyse der Effekte der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup> /AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup> -Doppelnullmutante auf Sox10 <sup>+</sup> -Neuralleistenzellen.....	74
<b>3.9 ANALYSE DER ROLLE DER AP-2-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN DER ENTWICKLUNG SENSORISCHER NEURONE DES HINTERWURZELGANGLIONS.....</b>	<b>76</b>
<b>3.10 ANALYSE DER AP-2<math>\beta</math><sup>-/-</sup>-NULLMUTANTE WÄHREND DER ENTWICKLUNG DER NORADRENERGEN NEURONE DES LOCUS COERULEUS (LC) .....</b>	<b>78</b>
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1 EXPRESSION DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AP-2<math>\alpha</math> UND AP-2<math>\beta</math> IN DEN SYMPATHISCHEN GANGLIEN WÄHREND DER NORMALENTWICKLUNG .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 ANALYSE DER NORADRENERGEN DIFFERENZIERUNG IN AP-2-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....</b>	<b>84</b>
4.2.1 Analyse der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -defizienten Maus .....	84
4.2.2 Analyse der AP-2 $\alpha$ -defizienten Maus.....	86
4.2.3 Analyse der AP-2 $\beta$ -defizienten Maus .....	87
4.2.4 Analyse der konditionellen AP-2-Doppelnullmutanten.....	89
<b>4.3 DIE ROLLE VON AP-2<math>\alpha</math> UND AP-2<math>\beta</math> IN VORLÄUFERZELLEN DER NEURALLEISTE .....</b>	<b>94</b>
4.3.1 Expression der Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in Neuralleistenzellen während der Normalentwicklung.....	94
4.3.2 Analyse der AP-2 $\beta$ -defizienten Maus .....	95
4.3.3 Analyse der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -defizienten Maus .....	99
<b>4.4 DIE ROLLE VON AP-2<math>\beta</math> WÄHREND DER ENTWICKLUNG DER NORADRENERGEN NEURONE DES LOCUS COERULEUS (LC) .....</b>	<b>102</b>
<b>4.5 AUSBLICK .....</b>	<b>104</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>106</b>

<b>6. LITERATURANGABEN .....</b>	<b>108</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>122</b>
ERKLÄRUNG.....	124

## ABBILDUNGEN

ABBILDUNG 1.1:	Zell-extrinsische und -intrinsische Faktoren kontrollieren die Entwicklung sympathischer Neurone. ....	9
ABBILDUNG 1.2:	Schematische Darstellung eines dimeren AP-2-Proteinkomplexes. ....	19
ABBILDUNG 3.1:	Expression von AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in den sympathischen und sensorischen Ganglien der Maus. ....	52
ABBILDUNG 3.2:	Expressionsnachweis von AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ an E 10.5. ....	54
ABBILDUNG 3.3:	Analyse der Genexpression in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{-/-}$ -Doppelnullmutante. ....	56
ABBILDUNG 3.4:	Untersuchung zur Genexpression und funktionellen Kompensation durch AP-2 $\alpha$ im sympathischen Ganglion der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante. ....	58
ABBILDUNG 3.5:	Der Verlust der Expression von AP-2 $\beta$ führt zu einer Reduktion der Größe der sympathischen Ganglien. ....	60
ABBILDUNG 3.6:	Proliferation und Zelltod in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante an E 10.5 und E 13.5. ....	61
ABBILDUNG 3.7:	Konditioneller Knockout von AP-2 $\alpha$ im SCG unter Verwendung der DBHCre. ...	63
ABBILDUNG 3.8:	Die generelle neuronale und noradrenerge Genexpression in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -DBHCre <sup>+</sup> -Mutante an E 13.5 und E 16.5. ....	64
ABBILDUNG 3.9:	Zelltod und Proliferation in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -DBHCre <sup>+</sup> -Mutante. ....	66
ABBILDUNG 3.10:	Konditioneller Knockout von AP-2 $\alpha$ im SCG unter Verwendung der Ascl1Cre. ...	67
ABBILDUNG 3.11:	Die generelle neuronale und noradrenerge Genexpression in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -Ascl1Cre <sup>+</sup> -Mutante an E 10.5 und E 13.5. ....	68
ABBILDUNG 3.12:	Zelltod und Proliferation in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -Ascl1Cre <sup>+</sup> -Mutante an E 13.5. .	69
ABBILDUNG 3.13:	Expression von AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in Neuralleistenzellen. ....	71
ABBILDUNG 3.14:	Zelltod von Sox10 <sup>+</sup> -Neuralleistenzellen im AP-2 $\beta^{-/-}$ -Knockout. ....	73
ABBILDUNG 3.15:	Analyse der Effekte der Doppelnullmutante auf Sox10 <sup>+</sup> -Neuralleistenzellen. ....	75
ABBILDUNG 3.16:	Die Rolle der AP-2-Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung sensorischer Neurone des Hinterwurzelganglions. ....	77
ABBILDUNG 3.17:	Analyse der Entwicklung des Locus Coeruleus (LC) in der AP-2 $\beta^{-/-}$ an E 13.5. ....	79
ABBILDUNG 3.18:	Expression der AP-2-Faktoren und DBH im LC von E 13.5 Mausembryonen. ....	80
ABBILDUNG 4.1:	Die Rolle der AP-2-Faktoren in der Entwicklung sympathischer Neurone. ....	82

---

**TABELLEN**

TABELLE 7.1:	AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup> -defiziente Mäuse: Reduktion der Fläche von TH <sup>+</sup> -, DBH <sup>+</sup> -, Phox2b <sup>+</sup> -, GATA3 <sup>+</sup> -, Hand2 <sup>+</sup> - und SCG10 <sup>+</sup> -Zellen (% der Kontrolle). ....	122
TABELLE 7.2:	AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup> /AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> -DBHCre <sup>+</sup> -Nullmutante: Reduktion der Fläche von TH <sup>+</sup> -, DBH <sup>+</sup> -, Phox2b <sup>+</sup> -, GATA3 <sup>+</sup> -, Hand2 <sup>+</sup> - und SCG10 <sup>+</sup> -Zellen (% der Kontrolle). ....	122
TABELLE 7.3:	AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup> /AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup> -Ascl1Cre <sup>+</sup> -Nullmutante: Reduktion der Fläche von TH <sup>+</sup> -, DBH <sup>+</sup> -, Phox2b <sup>+</sup> -, GATA3 <sup>+</sup> -, Hand2 <sup>+</sup> - und SCG10 <sup>+</sup> -Zellen (% der Kontrolle). ....	123

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ad	<i>Aorta dorsalis</i>
AP	Alkalische Phosphatase
Ascl1	<u>A</u> chaete- <u>s</u> cute- <u>l</u> ike homologue <u>1</u>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bHLH	basic Helix-Schleife-(Loop)-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CHS	fötales Huhn-, Pferdeserum
DBH	Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase
Hand2	<u>H</u> earth, <u>A</u> utonomic Nervous System und <u>N</u> eural Crest <u>D</u> erivatives <u>2</u>
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRG	Hinterwurzelganglion (Dorsal Root Ganglion)
DTT	Dithiotreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm/Erdbeschleunigungskonstante
HWG	Hinterwurzelganglion
Kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
n	Anzahl
NBT	Nitroblauaxolium



NLZ	Neuralleistenzellen
NR	Neuralrohr
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten (Chain) Reaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
Phox2a/b	Paired like homeodomain containing protein a/b
PNS	peripheres Nervensystem
RT	Reverse Transkriptase
SCG	Superior Cervical Ganglion
SCG10	Superior Cervical Ganglion Clone 10
SEM	Standard Abweichung des Mittelwerts
SHH	Sonic Hedgehog Homolog
Sox10	sry-box containing homoedomain protein
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TH	Tyrosinhydroxylase
U	Units
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wnt	<u>Wg</u> (Wingless)/ <u>Int</u> -Gen
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. EINLEITUNG

Das Nervensystem der Vertebraten, bestehend aus dem Zentralnervensystem (ZNS) und dem peripheren Nervensystem (PNS), besitzt eine große Vielfalt an Zelltypen. Diese sind funktionell miteinander verschaltet und kommunizieren über eine Vielzahl von Neurotransmittern miteinander. Die unterschiedlichen Neuronentypen werden während der Entwicklung aus multipotenten Vorläuferzellen gebildet. Bei allen sich entwickelnden Nervensystemen hängt die Zelldifferenzierung von einer Reihe unterschiedlicher Signale ab, welche die Transkription spezifischer Gene kontrollieren. Diese Signale können von Faktoren reguliert werden, die zellautonom wirken oder die von anderen Zellen in ihrem lokalen Umfeld stammen. Sie führen dazu, dass Neurone bestimmte neuronale Eigenschaften entwickeln können, dass auswachsende Fortsätze in die richtigen Zielzonen gelenkt werden, und dass es dort zur Ausbildung der spezifischen Synapsen kommt. Das einfach aufgebaute autonome Nervensystem ist ein geeignetes Modell, um die Signale und Faktoren, die zur Entstehung neuronaler Phänotypen führen, genauer studieren zu können.

### 1.1 Das autonome Nervensystem

Das autonome Nervensystem reguliert die Funktion der sog. inneren Organe und ist für die Homöostase der Körperfunktionen verantwortlich. Es koordiniert physiologische Funktionen unter variablen Bedingungen, wie z.B. die Adaptation an Stress, Ruhe und Kälte (Hamill und Shapiro, 2004). Es innerviert die glatte Muskulatur der Blutgefäße, die Herzmuskulatur, sowie die Organe des Verdauungs-, des Exkretions- und des Hormonsystems. Diese Steuerungsfunktionen werden nicht bewusst wahrgenommen und sind auch nur bedingt beeinflussbar, weshalb diese Untereinheit des PNS auch als vegetatives Nervensystem bezeichnet wird (Silbernagl, 2001).

Das autonome Nervensystem kann anatomisch in das parasympathische und sympathische Nervensystem, Nebennierenmark und enterische Nervensystem untergliedert werden. Die sympathischen und parasympathischen Teilsysteme können erregende oder hemmende Wirkungen auf die innervierten Zielorgane haben. Somit kann eine graduelle Feinabstimmung physiologischer Funktionen im Körper

sichergestellt werden. So wird z.B. die Herzfrequenz antagonistisch durch Stimulation von parasympathischen und sympathischen Nervenfortsätzen gesteuert (Franchini und Cowley, 2004).

Die vegetativen Zentren des Sympathikus liegen im Brust- und Lendenmark, die des Parasympathikus im Hirnstamm (für Auge, Drüsen und vom Nervus vagus versorgte Organe) und im Sakralmark (für Blase, Teile des Dickdarms, Genitalorgane). Von diesen Zentren ziehen präganglionäre Fasern zur Peripherie, wo sie in den Ganglien synaptisch auf postganglionäre Fasern umgeschaltet werden (Silbernagl, 2001).

Der parasympathische Teil beinhaltet überwiegend cholinerge Nervenzellen, die in der Nähe oder sogar am Zielorgan liegen. Diese Neurone verwenden hauptsächlich Acetylcholin als Transmitter. Neben Acetylcholin wird von parasympathischen Neuronen aber auch Stickstoffmonodioxid und Substanz P als Transmitter verwendet.

Der sympathische Teil enthält überwiegend catecholaminerge Zellen. Die sympathischen Neuronen der paravertebralen Grenzstrangganglien, der Bauch- und Halsganglien (terminale Ganglien), der prävertebralen Ganglien und die chromaffinen Zellen werden von präganglionären Neuronen innerviert, die in der intermediären Zone des Rückenmarks liegen. In den Ganglien erfolgt die synaptische Erregung der postganglionären Neuronen durch den Transmitter Acetylcholin. Das Zielorgan wird dann überwiegend noradrenerg erregt. Zusätzlich konnte die Verwendung von Somatostatin, Enkephalin und Serotonin als Transmitter beobachtet werden. Es werden von autonomen Neuronen noch weitere Kotransmitter verwendet, wie z.B. die Neuropeptide VIP und NPY (Hamill und Shapiro, 2004; Gibbins und Schemann, 1995, Landis 1988).

Im Fall der sympathischen Neurone gewährleistet die Expression der TH- und DBH-Gene, die für die Noradrenalin synthese notwendigen Enzyme kodieren, den noradrenergen Transmitterphänotyp. TH hydroxiliert die Aminosäure Tyrosin zu L-Dihydroxy-Phenylalanin (L-DOPA). TH dient als Marker für adrenerge (catecholaminerge) Zellen. Dies ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Syntheseweg. Aus L-DOPA wird durch die DOPA-Decarboxylase Dopamin gebildet. Das Dopamin wird daraufhin durch DBH zu Noradrenalin umgesetzt. Die chromaffinen Zellen der Nebenniere bilden aus Noradrenalin durch das Enzym Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase (PMNT) Adrenalin (Ernsberger und Rohrer, 1999; Goriadis und Rohrer, 2002).

Die cholinergen parasympathischen Neurone verwenden als Neurotransmitter Acetylcholin. Dieser Neurotransmitter wird aus Cholin und Acetyl-Coenzym A durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert. Das Acetylcholin wird durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in die synaptischen Vesikel transportiert. Somit stehen durch die Expression von ChAT und VACHT diagnostische Marker zur Verfügung, um den cholinergen Transmitterphänotyp von Neuronen zu identifizieren (Mallet et al., 1998; Erickson et al., 1994).

## **1.2 Die Entstehung des peripheren Nervensystems**

Der erste Schritt in der Entwicklung des Nervensystems ist die so genannte Neurulation. Während der Neurulation differenziert ein bestimmter Teil des Ektoderms zum Neuroektoderm, welches sich anschließend von rostral nach kaudal einstülpt und das Neuralrohr bildet (Kandel, 2000). Den Beginn der Neurulation erkennt man daran, dass sich auf der Oberfläche der zunächst noch kugeligen Gastrula die Neuralplatte bildet. Ihre Ränder wölben sich zuerst zur Neuralrinne auf und schließen sich später zum Neuralrohr. Dies löst sich vom übrigen Ektoderm ab und wird ins Innere des Embryos verlagert. Damit sind Gehirn und Rückenmark angelegt (Kandel, 2000).

Die Neurone und Gliazellen des ZNS entwickeln sich aus neuroepithelialen Stammzellen des Neuralrohrs. Das PNS entsteht dagegen größtenteils aus pluripotenten Zellen der Neuralleiste. Während sich das Neuralrohr schließt, lösen sich Zellen seitlich der Neuralplatte und bilden an der dorso-lateralen Grenze des Neuralrohrs die Neuralleiste (Kandel, 2000). Das PNS umfasst den Teil des Nervensystems, der außerhalb des Gehirns und Rückenmarks gelegen ist. Zum PNS gehören die Hirnnerven, die Spinalnerven (Nerven aus dem Rückenmark) und das intramurale Nervensystem (Le Douarin und Kalcheim, 1999). Es ist unterteilt in das somatische Nervensystem und das autonome oder vegetative Nervensystem, das für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse ist.

Verschiedene BMPs sind an der Entstehung der Neuralleistenzellen (NLZ) beteiligt (Gilbert, 2003). Die Neuralleiste ist eine transiente Struktur. Während der Fusion der Neuralfalten zum Neuralrohr werden Zellen der Neuralleiste von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen umgewandelt (epitheliale-mesenchymale Transition). Aus den

Zellen der Neuralleiste entsteht im Embryo nach Migration auf stereotypischen Bahnen und durch anschließende Akkumulation zu primitiven Ganglien in verschiedenen Zielgebieten das gesamte PNS.

Aus den verschiedenen Bereichen der Neuralleiste entstehen unterschiedliche Zelltypen, einschließlich der Neurone und Glia der sensorischen und autonomen Ganglien, die Melanozyten der Haut, sowie mesenchymales Gewebe von Gesicht und Schädel (Le Douarin, 1982). Das endokrin wirkende Nebennierenmark ist ebenfalls ein Abkömmling der NLZ und besteht vor allem aus Adrenalin-produzierenden Zellen, die einen wichtigen Teil des Sympathikus darstellen (Le Douarin et al., 2004). Für Vorläuferzellen der NLZ wurde einerseits eine Pluripotenz hinsichtlich ihrer Entwicklungsmöglichkeiten festgestellt (Le Douarin und Dupin, 2003). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die für eine frühe Spezifizierung der NLZ auf bestimmte Schicksale sprechen (Lo et al., 2005; White und Anderson, 1999).

Im Kopfbereich wandern die NLZ unterhalb des Ektoderms ein und differenzieren zu Zellen des parasympathischen Ziliarganglions, sowie zu Knorpel und Knochen des Kopfes, Meningen, Dermis, und Blutgefäßen. Strukturen des Herzens werden aus NLZ gebildet, die aus dem Bereich der ersten drei Somiten entstammen.

Die unterschiedlichen Zielgebiete der Rumpfnuralleistenzellen werden in rostro-kaudaler und dorsal-ventraler Abfolge bevölkert.

Zellen, die später die enterischen Ganglien bilden, stammen von der vagalen (rostraler Bereich der Somiten 1 - 7) und sakralen (kaudal des 28. Somiten) Neuralleiste ab. Die parasympathischen Ganglien werden aus der Neuralleiste gebildet, die in der kranialen und sakralen Region liegt. Die SG und die Hinterwurzelganglien (HWG; DRG, Dorsal Root Ganglia) entstehen aus den NLZ, die sich kaudal des vierten Somiten befinden. Die NLZ der Somiten 18 - 24 bilden die chromaffinen Zellen der Nebenniere (Le Douarin et al., 2004).

Die dorso-ventralen Wanderungswege der Rumpfnuralleistenzellen verlaufen zum Einen dorso-lateral und zum Anderen ventral in ihre Zielgebiete. Zellen, die den dorso-lateralen Weg einschlagen, differenzieren u.a. zu Melanozyten der Haut und der Haare bzw. Federn. Die Zellen auf dem ventralen Weg bilden im rostralen Bereich der Somiten neben dem Rückenmark die sensorischen HWG (Le Douarin und Kalcheim, 1999). Eine weitere NLZ-Subpopulation wandert zur dorsalen Aorta, um die primären SG zu bilden. In sekundären Wanderungsbewegungen von der dorsalen

Aorta zuerst in dorsaler Richtung und dann in rostraler Richtung werden die Ganglien des oberen Zervikalganglions angelegt. Zusätzlich migrieren Zellen nur nach dorsal um den sogenannten paravertebralen sekundären sympathischen Grenzstrang und in ventraler Richtung um die prävertebralen sympathischen Ganglien und Zellen des Nebennierenmarks zu bilden (Le Douarin und Kalcheim, 1999; Ernsberger et al., 1995; Kasemeier-Kulesa, 2005). Auch Zellen der vagalen Neuralleiste, die später zu den enterischen Ganglien differenzieren, wandern in ventraler Richtung bis zum Oesophagus, um von dort in kaudaler Richtung in den Verdauungstrakt hinein zu wandern (Le Douarin und Kalcheim, 1999). Neuralleistenzellen bilden außerdem die glialen Zelltypen der peripheren Nervenstränge (Le Douarin und Kalcheim, 1999; Kalcheim und Teillet, 1989).

### **1.3 Extrazelluläre Signale steuern die Induktion und Differenzierung der Neuralleistenzellen**

Studien im Vogelembryo, Amphibien, und Zebrafischen zeigen, dass Signalmoleküle wie die sekretierten (morphogenen) löslichen osteogenen Proteine (BMPs), Wnts, FGFs, PDGF, Notch und SHH, eine wichtige Rolle bei der Induktion und Spezifizierung von naiven ektodermalen Zellen zu Neuralleistenzellen (NLZ) spielen (Endo et al., 2003; LaBonne und Bronner-Fraser, 1998; Liem et al., 1995; Garcia-Castro et al., 2002, Steventon et al., 2005). Diese Signale wirken zu bestimmten Zeitpunkten vor und während der Wanderung sowie während der Spezifizierung im Bereich des Zielorgans. Sie werden in der Neuralleiste, im Notochord, in den morphogenen Zentren des Neuralrohrs und in der Umgebung der sich bildenden Ganglien exprimiert (Liem et al., 1995; Chiang et al., 1996; Schneider et al., 1999; Reissmann et al., 1996; Garcia-Castro et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder der Wnt Familie essentiell für die Induktion der Neuralleiste, für die Proliferation dieser Vorläuferzellen und für die Entstehung sensorischer Neurone sind (Ikeya et al., 1997; Garcia-Castro et al., 2002; Lee et al., 2004a). Die gliale Differenzierung wird durch Neuregulin-1 (Nrg-1) und den Notch-Signalweg gesteuert (Morrison et al., 2000; Shah et al., 1996), wohingegen die BMPs in der Induktion der Neuralleiste involviert sind und eine entscheidende Rolle in der neuronalen Differenzierung autonomer Neurone spielen

(Reissmann et al., 1996; Schneider et al., 1999; Shah et al., 1996; Varley et al., 1995).

Diese Signale sind verantwortlich für die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren. So werden schon die Transkriptionsfaktoren *Msx*, *AP-2 $\alpha$*  und *Dlx* im Ektoderm exprimiert bevor sich das Neuroektoderm ausbildet. Die überlappende ektodermale Expression dieser Faktoren wird in der weiteren Entwicklung auf das prospektive Neuroektoderm beschränkt (Luo et al., 2002; Davidson et al., 1995; Suzuki et al., 1997). Das Expressionsmuster dieser Faktoren korreliert mit dem ventro-dorsalen morphogenen BMP-Aktivitätsgradienten. Zusätzlich besitzen einige dieser Gene cis-regulatorische Elemente, die sie zu Zielgenen des BMP-Signalwegs macht (Suzuki et al., 1997; Park und Morasso, 2002; Alvarez-Martinez et al., 2002; Holzschuh et al., 2003). Durch Eliminierung dieser Gene in der Maus, Zebrafischen oder in Amphibien wurde die wichtige Rolle von *Msx*, *AP-2 $\alpha$*  und *Dlx* in der Spezifizierung der NLZ deutlich beschrieben (Tribulo et al., 2003; Meulemans und Bronner-Fraser, 2002; Knight et al., 2003; Brewer et al., 2004; Luo et al., 2003). Auf die Funktion von *AP-2 $\alpha$*  in der Spezifizierung der NLZ wird zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit eingegangen.

Eine weitere Gruppe von Faktoren, die wichtig für die Entwicklung der NLZ sind, stellen *Zic*, *Pax3* und *c-myc* dar. Ihre Expression ist ausschließlich auf neuronales Gewebe, inklusiv prä-migratorische NLZ beschränkt (Bellmeyer et al., 2003; Nakata et al., 1997; Bang et al., 1999). *Pax3* wird in der Neuralfalte exprimiert. Verluststudien in der Maus und in *Xenopus* sprechen *Pax3* eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der Neuralleiste zu (Monsoro-Burq et al., 2005; Borycki et al., 1999; Wiggan et al., 2002). Monsoro-Burq et al. (2005) verdeutlichten durch eine Kombination von Überexpression und Morpholino-Knockdown, dass *Msx1* und *Pax3* notwendig für die Induktion der NLZ sind. Zusätzlich stellte sich heraus, dass die Expression von *Msx1* der von *Pax3* vorgeschaltet ist.

Nachdem die frühe Spezifizierung der NLZ abgeschlossen ist, wird ein weiteres regulatorisches Netzwerk von Genen induziert, das für das Überleben der NLZ notwendig ist. Zu diesem Netzwerk gehören die Transkriptionsfaktoren der Snail- und Sox-Genfamilie sowie die Gene *FoxD3*, *Id3* und *Twist* (Steventon et al., 2005).

Die Familie der Snail-Genfamilie besteht aus zwei Mitgliedern, Snail und Slug. Die Überexpression von dominant-negativen Konstrukten dieser Genfamilie verdeutlichte, dass diese essentiell für die Expression von *Sox9*, *Sox10*, *Twist* und *FoxD3* in NLZ sind

(LaBonne und Bronner-Fraser, 2000; Lee et al., 2004b; Honoré et al., 2003; Aybar et al., 2003). Ektopische Überexpression von Slug im Neuralrohr des Huhns bewirkte die Expression von Neuralleistenmarker wie HNK-1, RhoB und Pax3 (del Barrio und Nieto, 2002). Zusätzlich ist die Snail-Genfamilie in der Zellzykluskontrolle und in der Kontrolle der Expression des anti-apoptotischen *bcl<sub>xL</sub>*-Gens und einigen Kaspasen involviert (Vega et al., 2004; Tribulo et al., 2004).

Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die zu diesem regulatorischen Netzwerk gehören sind die Gene der Sox-Familie. Sox8, 9 und 10 sind in NLZ in verschiedenen Spezies exprimiert (Steventon et al., 2005). In der murinen Sox9-Nullmutante konnte in prä- und postmigratorischen NLZ eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen beobachtet werden. Die NLZ der homozygoten Sox10-Mutante gehen in den Zelltod bevor sie beginnen zu differenzieren. Die Ergebnisse dieser Verluststudien deuten daraufhin, dass sowohl Sox9 als auch Sox10 als ein Überlebensfaktor in NLZ angesehen werden kann (Sonnenberg-Riethmacher et al., 2001; Cheung et al., 2005; Southard-Smith et al., 1998). Zudem wurde gezeigt, dass Sox10 die Pluripotenz der Neuralleistenzellen erhält (Kim et al., 2003).

Es ist nicht auszuschließen, dass einige dieser Spezifizierungs- und Überlebensgene nicht nur während der Induktion von NLZ benötigt werden, sondern auch während oder nach der Migration in ihre Zielgebiete für die Differenzierung und das Überleben der NLZ notwendig sind.

#### **1.4 Die Induktion der sympathischen Ganglien durch den BMP-Signalweg**

Die Entstehung sympathischer Neurone in den primären sympathischen Ganglien (SG) wird durch BMPs ausgelöst, die von der dorsalen Aorta sezerniert werden. Durch *in vivo*-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von BMP-4 im Bereich der dorsalen Aorta zu vergrößerten SG führt und eine ektopische TH-Expression im Bereich des Brachialnervs induziert (Reissmann et al., 1996; Patzke et al., 2001). Weiterhin wurde bewiesen, dass die Entwicklung der SG von den BMPs abhängig ist, da nach Applikation des BMP-Antagonisten Noggin keine Differenzierung der Neuralleistenzellen (NLZ) in den primären SG beobachtet werden kann (Chen et



al, 2004; Schneider et al, 1999). Dieses Ergebnis wurde in der Arbeit von Morikawa et al. (2009) bestätigt. In dieser Arbeit wurde die BMP-Rezeptor-Typ-IA-Expression konditionell deletiert.

Die BMPs gehören der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) an. Sie binden an Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren, die aus TypI- und TypII-Untereinheiten bestehen. Sobald der Rezeptor aktiviert ist, werden die intrazellulären SMAD-Proteine phosphoryliert und in den Zellkern transloziert. Die phosphorylierten SMADs binden im Kern an den Promoter von BMP-Zielgenen oder Faktoren des Transkriptionskomplexes (Massagué 1998, 2000).

Ähnlich wie bei der Entstehung der sympathischen Neurone induzieren BMP-5 und BMP-7 auch beim Ziliarganglion die parasymphatische Differenzierung. Wenn die Wirkung der BMPs durch Noggin *in vivo* blockiert wird, entstehen keine Neurone des Ziliarganglions (Müller und Rohrer, 2002).

Die BMPs sind auch an der Entwicklung der zentralen noradrenergen Neurone des Locus Coeruleus (LC) beteiligt. Die Bedeutung der BMPs in der Entwicklung des wichtigsten noradrenergen Zentrums im ZNS konnte durch BMP-Blockierungsstudien im Huhn bewiesen werden. Nach Applikation des BMP-Antagonisten Noggin wird die Entstehung des LC verhindert (Vogel-Höpker und Rohrer, 2002). Zusätzlich zeigte eine Studie an BMP<sup>-/-</sup>-Nullmutanten im Zebrafisch, dass durch den Verlust von BMP2 keine Entwicklung des LC im ZNS induziert wird (Guo et al., 1999).

#### **1.4.1 Das BMP-induzierte regulatorische Netzwerk von Transkriptionsfaktoren**

Durch extrinsische Faktoren wie den BMPs wird in den Neuralleistenzellen der primären sympathischen Ganglien die Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren ausgelöst (Abb. 1.1). Die intrinsischen BMP-induzierten Transkriptionsfaktoren bilden ein komplexes Netzwerk von Faktoren, die in einer zeitlich genauen Abfolge exprimiert werden und ihre Expression gegenseitig kontrollieren (Howard et al., 2000; Lo et al., 1991, 1998; Stanke et al., 1999; Howard et al., 1999).

Im ersten Schritt wird die Expression des Transkriptionsfaktors *Ascl1* induziert, gefolgt von der Expression von *Phox2b* (Abb. 1.1; Reissman et al., 1996; Schneider et al., 1999). *Hand2* wird nach *Phox2b* aber vor *Phox2a* exprimiert. Die *Gata2/3*-Expression beginnt in den sympathischen Vorläuferzellen nach *Phox2a/b* und *Hand2*, jedoch vor dem Expressionsbeginn der noradrenergen Markergene (Abb. 1.1). *Hand2*, *Phox2a* und *Gata2/3* werden von *Ascl1* und *Phox2b* kontrolliert (Howard et al., 2000; Tsarovina et al., 2004; Stanke et al., 1999). Das regulatorische Netzwerk induziert direkt oder indirekt die noradrenergen Gene (*TH*, *DBH*) und die panneuronalen Gene (*SCG10*, *NF160*) (Abb. 1.1). Die Transkriptionsfaktoren sind in der Lage sich gegenseitig zu regulieren.

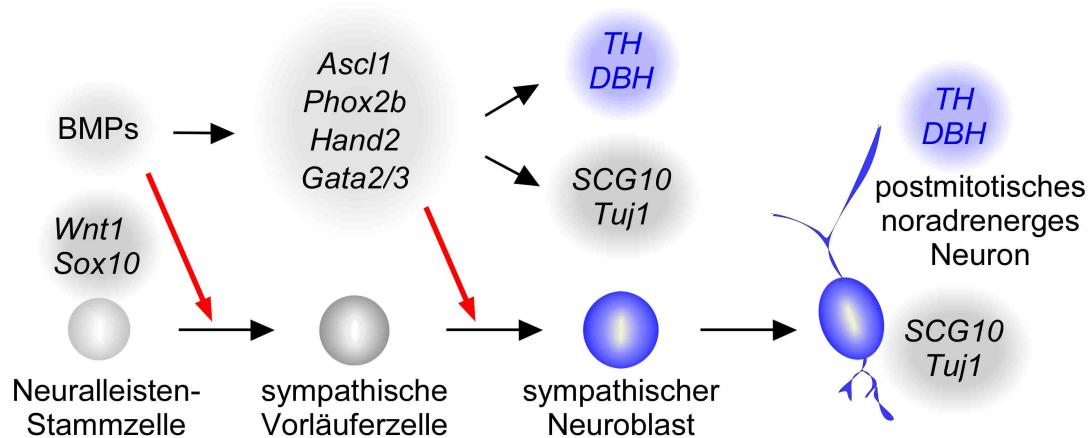


Abb. 1.1: **Zell-extrinsische und -intrinsische Faktoren kontrollieren die Entwicklung sympathischer Neurone.** Die Spezifizierung von NLZ (*Wnt1*, *Sox10*) zu noradrenergen sympathischen Neuronen wird extrinsisch durch BMPs und intrinsisch durch die Transkriptionsfaktoren *Ascl1* und *Phox2b* induziert. Weitere Transkriptionsfaktoren wie *Hand2*, *Gata2/3* bilden in sympathischen Vorläuferzellen ein regulatorisches Netzwerk, welches die Expression noradrenerger Gene (*TH*, *DBH*) und panneuronaler Gene (*SCG10*, *Tuj1*) in sympathischen Neuroblasten und postmitotischen noradrenergen Neuronen kontrolliert. Die Transkriptionsfaktoren regulieren sich gegenseitig, was durch Überexpressions- und Funktionsblockierungs-Experimente in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte (siehe Einleitung 1.4.1; modifiziert nach Goridis and Rohrer et al. 2002).

Die Rolle der einzelnen BMP-induzierten Transkriptionsfaktoren im regulatorischen Netzwerk der noradrenergen Differenzierung wird im Folgenden näher beschrieben.

### Ascl1

Die selektive Entwicklung der pluripotenten Neuralleistenzellen (NLZ) zu verschiedenen Zelltypen wird von der Aktivität regulatorischer Gene bestimmt. Mash1 (Mammalian achaete-scute homologue gene-1; Ascl1, Achaete-scute like-1) und dessen Huhn-Homolog Cash1 konnten durch Analogie- und Homologiestudien den früher beschriebenen bHLH-Genen des Achaete-Scute Komplexes (AS-C) in *Drosophila melanogaster* zugeordnet werden (Anderson, 1994). Dieser Komplex spielt in *Drosophila melanogaster* eine entscheidende Rolle bei der Entstehung proneuronaler Zellverbände. Zellen aus diesen Zellverbänden besitzen die Fähigkeit, sich zu neuronalen Vorläuferzellen zu entwickeln (Campuzano und Modolell, 1992).

In Vertebraten konnte Ascl1-Expression in Vorläuferzellen sympathischer-, parasympathischer- und enterischer Neurone, sowie in Zellen der Nebenniere nachgewiesen werden (Lo et al., 1991; Guillemot et al., 1993; Anderson, 1994). Neben dem PNS wird Ascl1 auch im ZNS und im olfaktorischen Epithelium exprimiert (Guillemot et al., 1993). Ascl1 wird jedoch sowohl im PNS als auch im ZNS nur transient exprimiert (Jasoni et al., 1994; Ernsberger et al.; 1995).

Das proneurale Gen Ascl1 steuert BMP-2-abhängig die neuronale Differenzierung von Neuralleistenzellen und hält die Antwortbereitschaft auf BMPs aufrecht (Lo et al., 1998; Shah et al., 1996). Die Blockierung von BMPs durch den BMP-Antagonisten Noggin führt *in vivo* zu einer starken Reduzierung der Ascl1-Expression in primären sympathischen Ganglien (SG) von Hühnerembryonen (Schneider et al., 1999).

Ascl1-Nullmutanten sterben postnatal nach 24h (P0/1) und weisen bei der histologischen Untersuchung starke Verluste in der Anzahl sympathischer und parasympathischer Neurone, sowie einiger enterischer Neurone auf (Guillemot et al., 1993). Ursprünglich wurde beschrieben, dass die Wanderung der Neuralleistenzellen während der Entwicklung ungestört verläuft, jedoch die terminale Differenzierung ausbleibt (Guillemont et al., 1993). Spätere Untersuchungen des Ascl1-Knockouts kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass es in Abwesenheit von Ascl1 nur zu einer verzögerten Entwicklung kommt und eine reduzierte Proliferation den Haupteffekt

darstellt (Pattyn et al., 2006; Morikawa et al., 2009).

Dieser Faktor kann *in vitro* die Phox2a-Expression in sympathischen Vorläuferzellen hervorrufen (Hirsch et al., 1998; Lo et al., 1998) und vermag bei ektopischer Überexpression im Rückenmark Phox2a/b zu induzieren (Dubreuil et al., 2002). Ebenso kann Phox2b die Expression von Ascl1 induzieren. *In vivo*-Experimente im Huhn zeigten, dass durch Phox2b-Überexpression Ascl1 ektopisch in Vorläuferzellen peripherer Nerven induziert wird, die dadurch einen noradrenergen Phänotyp annehmen. Umgekehrt führt die Überexpression von Ascl1 in Vorläuferzellen des PNS zur Induktion von ektopischen Zellen, die Phox2a/b, TH und DBH exprimieren (Stanke et al., 2004).

### Phox2a/b

Phox2a und Phox2b sind Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren, die durch paired-ähnliche Homöodomänen (paired like homeodomain) charakterisiert sind (Valarché et al., 1993; Pattyn et al., 1999). Sie gehören der Familie der Q50-paired-ähnlichen Transkriptionsfaktoren an (Galliot et al., 1999). Phox2a/b sind von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des noradrenergen Phänotyps der sympathischen Neurone. Durch Überexpressionsexperimente konnte festgestellt werden, dass Phox2a/b zusammen mit Ascl1 und Hand2 eher ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren bilden, statt linear hierarchisch reguliert zu sein (Pattyn et al., 1997; Stanke et al., 1999; Howard et al., 2000). In Hühnerembryonen, in denen Phox2a/b überexprimiert wurde, konnte in den ektopischen Neuronen alle Mitglieder des regulatorischen Netzwerks der noradrenergen Differenzierung nachgewiesen werden (Howard et al., 2000).

Die Expression der Phox2-Transkriptionsfaktoren im PNS ist in den Neuronen des sympathischen, parasympathischen und enterischen Nervensystems, sowie in den drei distalen Ganglien des facialis (VII.), des hypoglossalen (IX.) und des vagalen (X.) Hirnnervs zu finden (Pattyn et al., 1997). Phox2b wird in den SG, in den Motoneuronen im Hinterhirn und in den enterischen Neuroblasten vor Phox2a exprimiert. Dagegen findet im LC (dem größten Kern noradrenerger Nervenzellen im Gehirn), im okulomotorischen und im trochlearen Motorkern und in den kranialen sensorischen Ganglien eine Expression von Phox2b nach Phox2a statt (Pattyn et al.,

1997).

Der Verlust von Phox2a in Phox2a-Mausmutanten führt im okulomotorischen und im trochlearen Motorkern, in den kranialen sensorischen Ganglien und im LC zur einer Atrophie. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die DBH-Expression im LC Phox2a-abhängig ist. Zusätzlich fehlten die parasympathischen Ganglien im Kopfbereich in diesen Phox2a-Mutanten. In den übrigen Geweben des PNS, in denen Phox2a normalerweise exprimiert wird, konnte kein Effekt festgestellt werden, wie z.B. in den SG, in denen die Expression von TH/DBH erhalten bleibt (Morin et al., 1997; Pattyn et al., 1999, 2000).

Die Inaktivierung von Phox2b führt zu einer unvollständigen Entwicklung des LC, der kranialen sensorischen Ganglien und zum Verlust der Motorneurone im Hinterhirn. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass es zum Verlust der enterischen Neuronen, und der sympathischen und parasympathischen Ganglien des Rumpfs sowie den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks im PNS kommt (Pattyn et al., 1999, 2000). Phox2b ist somit der Transkriptionsfaktor, der für die Entstehung sämtliche autonomer Nervenzellen in der Peripherie erforderlich ist.

Um das funktionelle Verhältnis zwischen den Phox2-Transkriptionsfaktoren besser beschreiben zu können, wurden sogenannte Knockin-Versuche an Mäusen durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde die kodierende Region von Phox2a durch Phox2b und *vice versus* ausgetauscht.

Es konnte gezeigt werden, dass Phox2b den letalen Phänotyp der Phox2a-Nullmutante retten und den Verlust von Phox2a im LC im ZNS und von sensorischen und autonomen Ganglien im PNS kompensieren konnte. Dagegen konnte die Expression von Phox2a im Phox2b-Locus keine Rettung des letalen Phänotyps der Phox2b-Mausmutante bewirken. Zusätzlich zeigten diese Knockin-Versuche, dass Phox2a den Verlust von Phox2b im LC, in den kranialen sensorischen Ganglien und sympathischen Ganglien nicht ausgleichen konnte (Coppola et al., 2005).

Die Untersuchungen an den Nullmutanten zeigten, dass Phox2b für die noradrenerge Differenzierung in den SG notwendig ist. Überexpressionsexperimente von Phox2-Transkriptionsfaktoren in den HWG und im peripheren Nerv führten *in vivo* zu ektoptischer Expression der sympathischen Markergene TH und DBH, sowie der panneuronalen Genen SCG10 und Neurofilament 160 (Ernsberger et al., 1997; Stanke et al., 1999). Phox2b ist somit nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die

Induktion noradrenerger Neurone (Stanke et al., 1999, 2004).

Phox2a als auch Phox2b binden im Zusammenspiel mit dem cAMP-regulierten Transkriptionsfaktor CREB an den DBH Promoter, um eine Aktivierung des Promoters hervorzurufen (Kim et al., 1998; Yang et al., 1998; Swanson et al., 1997, 2000). CREB scheint jedoch während der Entwicklung keine bedeutende Rolle in der Regulation von DBH zu spielen (Rüdiger et al., 2009). Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass die Phox2-Proteine die Expression des *c-ret*-Gens regulieren, das für den Rezeptor der GDNF-verwandten neurotrophen Faktoren kodiert. Somit könnten die Phox2-Proteine zusätzlich eine Rolle bei dem Überleben der Neurone und beim Neuritenwachstum spielen (Morin et al., 1997; Lo et al., 1998; Pattyn et al., 1999).

### Hand-Proteine

Hand1 (eHand) und Hand2 (dHand) gehören zur Klasse B der Familie der basischen Helix-Schleife-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Die Hand-Faktoren spielen u.a. eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Herz und Darm (Firulli, 2003; McFadden et al., 2005; Cserjesi et al., 1995). Hand2 besteht aus 217 Aminosäuren, deren Sequenz innerhalb der Wirbeltiere hochkonserviert ist (Srivastava et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor besitzt am N-Terminus eine basische (b) Domäne, welche die DNA Bindung vermittelt, sowie eine Helix-Schleife-Helix (HLH) Domäne, welche Protein-Interaktion vermittelt. Das Protein wird im Herz, autonomen Nervensystem, in Neuralleistenzellderivaten und im Deciduum exprimiert (Howard et al., 1999; McFadden et al., 2002, 2005).

Hand1 und Hand2 werden in den SG nach *Ascl1* und *Phox2a/b* exprimiert (Howard et al., 1999). *Phox2a* und *Phox2b* können ektopisch die Expression der bHLH Transkriptionsfaktoren Hand1 und Hand2 in Neuralleistenzellderivaten auslösen (Howard et al., 2000). Während Hand2 zu Beginn der adrenergen Differenzierung exprimiert wird, konnte Hand1 bisher nur in differenzierten sympathischen Neuronen nachgewiesen werden. Die Rolle von Hand1 in der späten Entwicklung der SG ist bislang völlig unklar. Dagegen wurde für Hand2 eine wichtige Funktion in der transkriptionellen Kontrolle der noradrenergen Differenzierung gezeigt (Srivastava et al., 1997; Howard et al., 2000; Lucas et al., 2006; Schmidt et al., 2009; Hendershot et al., 2008).

*In vivo*-Experimente im Huhn ließen den Rückschluss zu, dass Hand2 an der

BMP-abhängigen sympathischen Differenzierung beteiligt ist (Howard et al, 2000). Es kommt durch retroviral vermittelte Überexpression von Hand2 in NLZ-Kulturen (ohne Wachstumsfaktoren) und *in vivo*, im Huhnembryo; zu einer erhöhten Anzahl catecholaminerger Zellen (Howard et al., 1999).

Durch die Zugabe des BMP-Antagonisten Noggin wurde eine Reduktion von Hand2 in den SG im Huhn beobachtet. Zusätzlich zeigten *in vitro*-Versuche, dass durch Zugabe von BMP-4 in NLZ-Kulturen die Expression von Hand2 gesteigert werden konnte (Howard et al, 2000).

Der DBH-Promoter enthält E-Box-Bindestellen, an die bHLH-Transkriptionsfaktoren binden können. Ausserdem enthält er Bindestellen für Homöodomänen-Proteine, wie zum Beispiel die Phox2-Transkriptionsfaktoren. *In vitro*-Experimente zeigten, dass sowohl Hand2 und Phox2a an die DBH-Promoterkonstrukte binden und die Induktion der Transkription einleiten können (Xu et al., 2003). Eine Koexpression von Hand2 und Phox2a führte zu einer synergistischen Verstärkung der Phox2a- und Hand2-Wirkung. Dieser Effekt ist von den Homöodomänen-Bindestellen abhängig, nicht aber von den E-Box-Motiven. Der Wirkungsmechanismus von Hand2 erfordert also nicht zwingend eine DNA-Bindung (Xu et al., 2003). Die Wirkung von Hand2 könnte durch eine Protein-Protein-Interaktion in einem Transkriptionskomplex mit den Phox2-Transkriptionsfaktoren an der DBH-Promoterregion erklärt werden (Xu et al., 2003).

Die Hand2-defizienten „hands off“-Fischembryonen zeigen einen letalen Herzphänotyp, sterben aber erst nachdem sich die autonomen Ganglien im zervikalen Bereich bereits entwickelt haben. In der Mutante ist eine stark reduzierte Expression von TH und DBH festzustellen (auf ca. 10 % der Kontrolle). In der Expression der Phox2-Transkriptionsfaktoren, Zash1a (Ascl1-Homolog im Zebrafisch) und des panneuronalen Markers HuC ist jedoch gegenüber dem Wildtyp keine signifikante Veränderung aufgetreten. Außerdem wurde ein Verlust der AP-2 $\alpha$ -Expression in den sympathischen Ganglien beobachtet (Lucas et al., 2006). Die Expression von Hand2 ist demnach essentiell für die Entstehung noradrenerger Eigenschaften. Dagegen ist Hand2 weder notwendig für das Überleben der Zellen in diesem Zeitraum noch für ihre Differenzierung zu Nervenzellen. Hand2 spielt somit eine wichtige und spezifische Rolle bei der noradrenergen Differenzierung. Der bHLH-Transkriptionsfaktor ist Mitglied des BMP-induzierten transkriptionalen Netzwerks und ist in der Expressionskaskade

unterhalb von *Ascl1* und *Phox2b* einzuordnen (Lucas et al., 2006).

Die Effekte der *Hand2*-Eliminierung auf die Entstehung des autonomen Nervensystems im Zebrafisch wurden auch in konditionellen *Hand2*-Knockouts in der Maus untersucht. *Wnt1* ist in der Neuralplatte von E 8 an exprimiert und ist zusätzlich in migrierenden NLZ nachweisbar (Echelard et al., 1994; Danielian et al., 1998). In der *Hand2<sup>Wnt1Cre</sup>*-Mutante wird das *Hand2*-Gen in NLZ durch die *Wnt1Cre* ausgeschnitten. Die *Hand2<sup>Wnt1Cre</sup>*-Mäuse zeigten, dass die Expression von TH und DBH im sympathischen Ganglion stark reduziert ist. Die generelle neuronale Expression von HuC, Tuj1 und NF160 ist kaum beeinträchtigt (Lucas et al., 2006; Hendershot et al., 2008; Morikawa et al., 2007). Zusätzlich ist *Hand2* für die Proliferation in sympathischen Vorläuferzellen und sympathischen Neurone erforderlich, da in der *Hand2<sup>Wnt1Cre</sup>*-Mutante eine starke Reduktion in der Anzahl der sich teilenden Ki67<sup>+</sup>-Neurone beobachtet wird. Außerdem zeigten Experimente mit kultivierten proliferierenden sympathischen Neuronen, dass die Proliferation durch eine antagonistische Interaktion zwischen proliferationsstimulierendem *Hand2* und antiproliferativem *Phox2b* gesteuert wird (Reiff et al., 2010).

Die *Hand2*-Verluststudien demonstrieren, dass *Hand2* für die Proliferation und noradrenerge Differenzierung in SG essentiell ist. Jedoch beweisen Untersuchungen im parasymphatischen Ziliarganglion des Huhns in dem keine *Hand2*-Expression stattfindet, dass *Hand2* für die noradrenerge Genexpression nicht unbedingt erforderlich ist. Trotz der Abwesenheit von *Hand2* findet während der initialen Differenzierung eine transiente noradrenerge Genexpression statt, bis letztendlich diese Neurone zu cholinergen Neuronen differenzieren. Nach ektopischer Überexpression von *Hand2* wurde beobachtet, dass der Verlust der noradrenergen Genexpression im Ziliarganglion verhindert werden kann (Müller und Rohrer, 2002).

Durch Knockdown-Experimente von *Hand2* in postmitotischen sympathischen Neuronen (E 12) aus dem Huhn wurde eine selektive Rolle von *Hand2* in der Aufrechterhaltung des noradrenergen Genexpression nachgewiesen. Die generelle neuronale Genexpression (Tuj1, HuC und SCG10) ist nicht betroffen. Außerdem wurde kein Unterschied in der Anzahl der Neurone nach *Hand2*-Knockdown festgestellt (Schmidt et al., 2009). Diese *in vitro*-Versuche wurden durch *in vivo*-Experimente bestätigt. In der *Hand2<sup>DBHCre</sup>*-Mutante wurde eine verminderte Anzahl von Neuronen im sympathischen Ganglion beobachtet. Dieser Effekt wurde aufgrund einer Reduktion



von Ki67<sup>+</sup>-Zellen auf einen Proliferationseffekt zurückgeführt. Es wurde aber auch eine selektive Verringerung in der TH-Expression in der restlichen sympathischen Neuronenpopulation in der Hand2<sup>DBHCre</sup>-Mutante beobachtet (Schmidt et al., 2009).

Der Transkriptionsfaktor Hand2 ist während der Entwicklung und in ausdifferenzierten postmitotischen sympathischen Neuronen exprimiert. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zeigten, dass Hand2 während der Spezifizierung und frühen Entwicklung sympathischer Neurone eine entscheidende Rolle in Kontrolle der noradrenergen Genexpression besitzt. Außerdem ist Hand2 in der Kontrolle der Proliferation der sympathischen Vorläuferzellen und frühen sympathischen Neurone beteiligt. Zusätzlich kann Hand2 auch eine Funktion in der Aufrechterhaltung der noradrenergen Genexpression in murenen postmitotischen sympathischen Neuronen zugesprochen werden.

### Gata2/3

Die Gata-Zinkfinger-Familie der transkriptionalen Regulatoren besteht in Vertebraten aus 6 Mitgliedern, wobei nur Gata1/2/3 in Zellen des hämatopoietischen Systems und in der neuronalen Abstammungslinie exprimiert werden (Nardelli et al., 1999; Weiss und Orkin, 1995). Die Transkriptionsfaktoren der Gata-Familie binden an die Konsensus-DNA-Sequenz (A/T) GATA (A/G). Diese Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der Spezifizierung des Schicksals differenzierender Zellen (Patent und McGhee, 2002). Im Nervensystem zeigen Gata2/3 ein überlappendes Expressionsmuster. Die Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die Entwicklung unterschiedlicher neuronaler Zellpopulationen. Dazu gehört das Innenohr, Mittel- und Hinterhirn, Hypophyse, Rückenmark und das sympathoadrenale System (Karis et al., 2001; Craven et al., 2004; Kala et al., 2009; van Doorninck et al., 1999; Dasen et al., 1999; Karunaratne et al., 2002; Wakil et al., 2006; Lim et al., 2000; Moriguchi et al., 2006; Tsarovina et al., 2004).

Im Innenohr ist Gata3 für das Überleben von Sinneszellen der Cochlea wichtig. Postnatale Mäuse, die ein heterozygoten Allel von Gata3 besitzen, zeigen eine fortschreitende Degeneration von äußeren und inneren Sinneszellen sowie Pillar-Zellen der Cochlea (van der Wees et al., 2004).

In der Entwicklung des sympathoadrenalen Systems ist Gata3 essentiell für die initiale Differenzierung und das Überleben der sich differenzierenden sympathischen Neuronen und der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Moriguchi et al., 2006; Tsarovina et al., 2004).

Gata2/3 in der Maus und Gata2 im Huhn sind im Netzwerk der Transkriptionsfaktoren integriert, die die sympathoadrenale Differenzierung regulieren (Tsarovina et al., 2004). Im Huhnembryo ist nur Gata2 in den sympathischen Ganglien exprimiert, nach *Ascl1*, *Phox2a/b* und *Hand2*. Die Überexpression von *Ascl1*, *Phox2b* und *Hand2* in Vorläuferzellen induziert die Expression von Gata2. Sowohl die Funktionsblockierung von Gata2 im Huhn als auch die Eliminierung von Gata3 in der Gata3-Nullmutante zeigen eine starke Reduktion in der Größe der sympathischen Ganglien. Desweiteren wird die Expression von TH in besonderem Maße beeinträchtigt (Tsarovina et al., 2004). Gata2/3 kann somit eine besondere Rolle in der noradrenergen Differenzierung und im Überleben von sympathoadrenergen Vorläuferzellen zugeschrieben werden.

Die Analyse der Gata3<sup>DBH<sup>Cre</sup></sup>-Nullmutante offenbarte, dass der Verlust von Gata3 in embryonalen differenzierten sympathischen Neuronen zu einem fast vollständigen Verlust der sympathischen Ganglien führt. Dieser Phänotyp wird durch apoptotischen Zelltod im Ganglion verursacht. Durch einen Tamoxifen-induzierbaren konditionellen Gata3-Knockout in DBH-exprimierenden Zellen wurde gezeigt, dass Gata3 auch in adulten Mäusen essentiell für das Überleben sympathischer Neurone ist (Tsarovina et al., 2010; Stubbusch et al., 2010). Gata3 ist offenbar in der Regulierung antiapoptotischer Gene wie *bcl-2* involviert (Tsarovina et al., 2010). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Gata3 nicht nur in der noradrenergen Differenzierung von sympathischen Neuroblasten wichtig ist, sondern auch ein Überlebensfaktor des embryonalen und adulten sympathischen Nervensystems ist.

## 1.5 Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren

Die AP-2-Transkriptionsfaktoren bilden eine Familie naher verwandter Faktoren, die bei höheren Vertebraten aus 5 Mitgliedern bestehen, AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , AP-2 $\delta$  und AP-2 $\epsilon$ ; beim Huhn aus 3 Mitgliedern, AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  and AP-2 $\delta$ ; und beim Zebrafisch aus 2 Mitgliedern dieser Genfamilie, AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  (Eckert et al., 2005).

### 1.5.1 Struktur und Eigenschaften der AP-2-Familie

Die „Activator Protein“ (AP)-2-Transkriptionsfaktoren enthalten drei funktionelle Domänen. Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine prolinreiche Transaktivierungsdomäne. Der C-Terminus ist charakterisiert durch eine Dimerisierungsdomäne und eine in allen untersuchten Spezies hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne. Die am C-Terminus gelegene Dimerisierungsdomäne besteht aus einem für alle Transkriptionsfaktoren der AP-2-Genfamilie beschriebenen „Helix-Span-Helix“ (HSH)-Motiv. Die Mitglieder der AP-2 Proteine sind in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden. Eine N-terminal lokalisierte basische Region vermittelt zusammen mit dem HSH-Motiv die DNA-Bindung des Proteinkomplexes (Abb. 1.2) (Williams und Tjian, 1991a, b). Über sie binden die AP-2-Transkriptionsfaktoren an die palindromische Konsensussequenz 5'-GCCN<sub>3</sub>GGC-3' und aktivieren die Transkription durch ihre Transaktivierungsdomäne. Diese ist in vielen zellulären und viralen Promotoren zu finden (Eckert et al., 2005). Für das Protoonkogen *c-erb-2* wurde gezeigt, dass sowohl ein Homo- oder Heterodimer-Proteinkomplex von AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  als auch die drei Transkriptionsfaktoren für sich an den *c-erb-2*-Promoter binden und die Transkription eines entsprechenden Reporterkonstruktes stimulieren. Es stellte sich heraus, dass durch AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  im Gegensatz zu AP-2 $\beta$  eine 3-4mal höhere Aktivität an diesem Promoter erzielt wird (Bosher et. al., 1996).

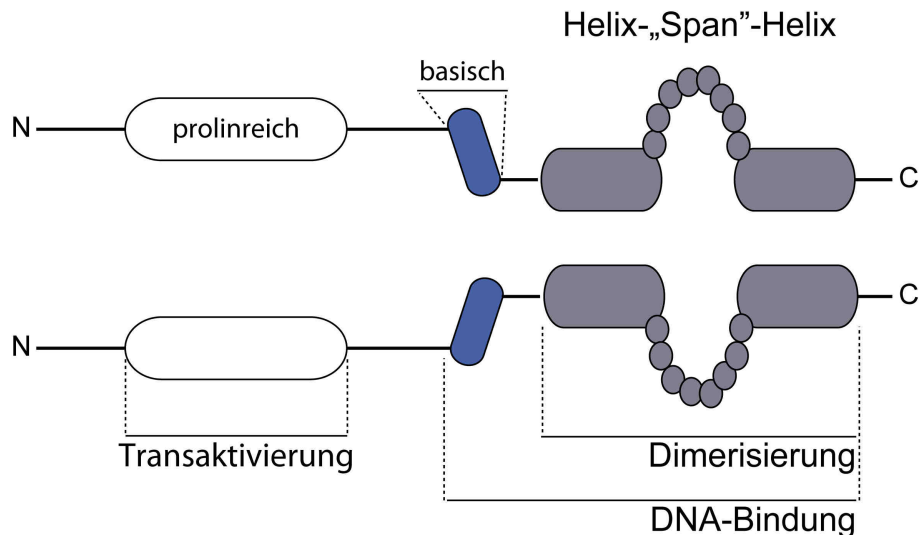


Abb. 1.2: **Schematische Darstellung eines dimeren AP-2-Proteinkomplexes.** Darstellung eines dimeren AP-2 $\alpha$ -Proteinkomplexes. Das AP-2 $\alpha$ -Protein gliedert sich in drei funktionelle Domänen. Die N-terminale prolinreiche Transaktivierungsdomäne (weiß). Die C-terminale Dimerisierungsdomäne (grau), die aus einem „Helix-Span-Helix“-Motiv besteht. Die DNA-Bindungsdomäne, die sich aus der Dimerisierungsdomäne und einer zentralen basischen Region (blau) zusammensetzt (modifiziert nach Eckert et al. 2005).

### 1.5.2 Expressionsmuster von AP-2-Genen

Am Tag 7.5 der murinen Embryonalentwicklung sind AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  im embryonalen Gewebe der apikalen Neuralfalte exprimiert (Mitchel et al., 1991). Im weiteren Verlauf der Entwicklung sind die drei AP-2-Transkriptionsfaktoren in den prä- und postmigratorischen Neuralleistenzellen (NLZ) nachweisbar, wobei allerdings AP-2 $\gamma$  nur transient exprimiert wird. Hauptsächlich werden AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  im frontonasalen Gesichtsbereich, im Spinalganglion, in sensorischen Ganglien des Gesichtsbereich und in Melanozyten exprimiert (Chazaud et al., 1996; Mitchel et al., 1991; Moser et al., 1997a,b; Eckert et al., 2005). Zusätzliche Expressionsorte sind die Epidermis und die meisten Strukturen des zentralen und peripheren Nervensystems und der Niere. Das identische AP-2-Expressionsmuster in den Gesichtsstrukturen, im ZNS und in den Neuralleistenderivaten bei Amphibien und Vögeln deutet daraufhin, dass die AP-2-Faktoren konserviert und wichtig für die Entwicklung dieser Strukturen sind (Eckert et al., 2005). Die AP-2 $\alpha$  Expression wird bei der Entstehung der sympathoadrenergen Zellen in der Maus herunterreguliert. Dagegen wurde in den

sympathischen Ganglien und in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks ab Tag 13 eine selektive AP-2 $\beta$ -Expression beobachtet (Moser et al., 1997b; Zhao et al., 2003).

### **1.5.3 Die AP-2 $\alpha$ -defizienten Mäuse**

Obwohl ein weitgehend redundantes Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  vorliegt, zeigen AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -defiziente Mäuse unterschiedliche Phänotypen. Die Eliminierung von AP-2 $\alpha$  führt zwar noch zur Ausbildung der Neuralwülste, die Fusion bleibt aber aus. Es kommt zu einer kraniofazialen Spalte (Cranioschisis). Als Konsequenz zeigt sich eine Expansion des Vorderhirns und eine Störung der fazialen Skelettstrukturen wie Nase, Maxillen und Mandibel. Zusätzlich sind in diesem Bereich auch die sensorischen Ganglien kleiner und entwickeln sich nicht korrekt. Neben der Exenzephalie konnte noch ein ventraler Schlußdefekt im Rumpfbereich beobachtet werden. Durch diesen Schlußdefekt im Bereich des Thorax und Abdomens werden die inneren Organe unvollständig umschlossen. Dieser Phänotyp zeichnet sich daher durch einen offenen Bauch- und Thoraxbereich mit freiliegenden inneren Organen aus (Abdominoschisis) (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996). Die Ursache des in der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante beobachteten kranialen Phänotyps liegt am Absterben von Neuralleistenzellen. Die Migration dieser Vorläuferzellen ist gestört und es kommt in der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante zum Absterben von Neuralleistenzellen, was zu einem Anstieg TUNEL<sup>+</sup>-Zellen im Bereich des dorsalen kranialen Neuralrohrs führt. Diese Tiere sterben postnatal an Tag 1-2 (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996).

### **1.5.4 Die AP-2 $\beta$ -defizienten Mäuse**

Im Gegensatz zur AP-2 $\alpha$ -Nullmutante scheinen sich die Neuralleistenderivate im AP-2 $\beta$ -Knockout relativ normal zu entwickeln. Dies umfasst sowohl die kranialen Strukturen als auch die neuronalen Gewebe. Dieser Phänotyp zeichnet sich aber durch eine defekte Nierenentwicklung aus, die dazu führt, dass diese Tiere postnatal an Tag 1-2 sterben (Moser et al., 1997a). AP-2 $\beta$  und AP-2 $\alpha$  werden früh in der Nierenentwicklung

im Uterusepithel koexprimiert, wobei in der weiteren Entwicklung das überlappende Expressionsmuster verloren geht. Nach der Geburt geht die Expression von AP-2 $\alpha$  dann völlig verloren. Die ersten Effekte der polyzystischen Niereninsuffizienz treten jedoch erst an E 16.5 auf. Eine Erklärung für den erst sehr spät auftretenden Phänotyp könnte eine Redundanz der beiden Faktoren sein, die erst spät während der Entwicklung der Niere verloren geht. Aus diesem Grund kann sich der Phänotyp langsam verstärken (Moser et al., 1997a). Moser et al. (1997a) weisen darauf, dass diese Niereninsuffizienz durch Absterben der Zellen im Nierenepithel verursacht wird, was in Verbindung mit einer Reduktion des antiapoptotisch wirkenden *bcl-2*-Gens gebracht wird.

### **1.5.5 Die Funktion von AP-2 $\alpha$ in der Entwicklung von Zebrafisch-embryonen**

Im Zebrafisch werden AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  im Neuralrohr, im Ektoderm und im *Ductus pronephricus* während der Entwicklung der Niere koexprimiert. In NLZ und deren Nachkommen, einschließlich der autonomen Ganglien des PNS ist nur AP-2 $\alpha$ , nicht jedoch AP-2 $\beta$  exprimiert (Knight et al., 2003, 2005; Holzschuh et al., 2003).

Hinweise auf eine Funktion von AP-2 $\alpha$  in der Entwicklung des noradrenergen Phänotyps lieferte die Studie der *mont blanc* Mutante (*mob<sup>m819</sup>*) von Holzschuh et al. (2003). In diese Mutante wurde eine Punktmutation eingeführt, die daraufhin ein trunkiertes Protein produziert, das keine DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne besitzt. Diese Mutante zeigt einen Verlust der TH- und DBH-Expression in sympathischen Ganglien und noradrenergen Zentren des ZNS. Dagegen wurden die frühen panneuronalen Marker *Hu* und *isl1* in sympathischen Ganglien detektiert. Zusätzlich zeigt die Mutante auch *Phox2a*-Expression in Zellen der sympathischen Kette. Die sensorischen Ganglien zeigten jedoch keinen Effekt. Diese Daten zeigen, dass die NLZ normal wandern, somit also auch normal proliferieren und das Differenzierungsprogramm starten können. Sie sind aber nicht in der Lage den noradrenergen Phänotyp auszubilden.

In einer weiteren *mont blanc* Mutante (*mob<sup>m610</sup>*), die von Barallo-Gimeno et al. (2003) beschrieben wurde, führt eine Mutation im Intron-Bereich des AP-2 $\alpha$ -Gens zur falschen Prozessierung der prä-mRNA. Es entsteht ebenfalls ein Protein ohne DNA-

Bindungs- und Dimerisierungsdomäne. In dieser *mont blanc* Mutante wurde auch ein Verlust der DBH-Expression in sympathischen Neuronen beobachtet. Hier zeigt sich aber zusätzlich ein starker Verlust der Neurone des Hinterwurzelganglions. Es wird spekuliert, dass die Vorläuferzellen der Neuralleiste ihre Spezifizierung normal durchlaufen, die Migration ohne Störung abläuft, sie aber nicht in der Lage sind zu differenzieren und in den programmierten Zelltod gehen.

Knight et al. (2003) untersuchten einen weiteren AP-2 $\alpha$ -deletierten Zebrafisch. Diese Mutante wird *lockjaw* (*low<sup>ts213</sup>*) genannt. Hier handelt es sich um eine Punktmutation, die zu einem Stop der Translation führt und somit ein tunkiertes Protein ohne funktionelle DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne verursacht. In dieser Zebrafisch-Mutante wurde zwar auch der selektive Verlust der TH-Expression in noradrenergen Zentren des ZNS beobachtet, nicht jedoch die Ergebnisse der beiden *mont blanc*-Mutanten in Bezug auf die trunkalen Neuralleistenzellen bestätigt. Obwohl in der *low*-Mutante die Spezifizierung der prä migratorischen Neuralleistenzellen ebenfalls normal zu verlaufen scheint, wurden im Vergleich mit den *mont blanc*-Mutanten bei der Analyse der sympathischen und sensorischen Ganglien kontroverse Ergebnisse beobachtet. Die sympathischen Neurone fehlen komplett in der *low*-Mutante während die Entwicklung der sensorischen Neurone des HWG nicht beeinträchtigt ist. Die Entstehung dieses Phänotyps beruht ebenfalls auf dem Zelltod von Vorläuferzellen, die nach ihrer Spezifizierung im Begriff sind in ihre Zielorgane einzuwandern. Durch die unterschiedlichen Auswirkungen in sensorischen und sympathischen Ganglien ist ausgeschlossen, dass die gesamte Zellpopulation dieser Vorläuferzellen davon betroffen ist. Knight et al. (2003) postuliert, dass AP-2 $\alpha$  notwendig ist, um die frühen Schritte in der Neuralleistenentwicklung zu gewährleisten und spricht AP-2 $\alpha$  eine essentielle Rolle für das Überleben von Subpopulationen der Neuralleistenderivaten zu.

### **1.5.6 Die Rolle der AP-2-Gene in der Entwicklung des noradrenergen Phänotyps**

*In vitro*-Studien haben gezeigt, dass AP-2 $\alpha$  an den DBH-Promoter bindet und eine Stimulierung der TH- und DBH-Transkription auslösen kann (Kim et al., 2001; Greco

et al., 1995). Somit könnte AP-2 $\alpha$ , wie zumindest teilweise im Zebrafisch beschrieben, eine selektive Rolle in der noradrenergen Genexpression während der Differenzierung sympathischer Neurone spielen. Die Arbeit von Hong et al. (2008), die im Verlauf der vorliegenden Untersuchung publiziert wurde, schließt dies aber kategorisch aus, weil das AP-2 $\alpha$ -Protein nur noch in wenigen Zellen der SG an E 13.5 exprimiert ist. Im Gegensatz zu AP-2 $\alpha$  ist AP-2 $\beta$  stark im SG exprimiert, ähnlich wie der autonome Marker Phox2b. Daher wird von Hong et al. (2008) postuliert, dass AP-2 $\beta$  eine Funktion in der noradrenergen Differenzierung sympathischer Neurone besitzt. Die Analyse der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Mutanten ergab, dass während der embryonalen Entwicklung die Größe der SG im PNS reduziert wird. Dies trifft auch für den Locus Coeruleus (LC) im ZNS zu. Zudem wurde ein selektiver Verlust der DBH-Expression in noradrenergen Neurone beschrieben.

Außerdem wurde gezeigt, dass die neonatale Letalität teilweise durch eine Noradrenalininsuffizienz zustande kommt. Hinweise auf eine selektive Rolle von AP-2 $\beta$  in der noradrenergen Genexpression wurden durch *in vitro*-Studien unterstrichen.

Durch Überexpression von AP-2 $\beta$  in NLZ-Kulturen wurde eine Zunahme der TH<sup>+</sup> und DBH<sup>+</sup>-Zellen, nicht jedoch der Phox2b-Expression beobachtet. Dagegen zeigte die Überexpression von AP-2 $\alpha$  nur eine signifikant erhöhte Anzahl von Melanozyten. Damit wurde AP-2 $\beta$  und nicht AP-2 $\alpha$  eine essentielle und selektive Funktion in der Differenzierung des murinen noradrenergen Phänotyps zugeschrieben (Hong et al., 2008). Eine Interpretation, die durch die vorliegende Untersuchung widerlegt wird.

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Die Signalmoleküle aus der Familie der BMPs sowie die Transkriptionsfaktoren Ascl1, Insm1, Phox2a/b, Hand2 und Gata2/3 sind essentiell für die noradrenerge Differenzierung, Proliferation und Überleben während der frühen Entwicklung von sympathischen Neuronen (Reissmann et al., 1996; Schneider et al., 1999; Stanke et al., 1999; Howard et al., 2000; Lucas et al., 2006, Tsarovina et al., 2004; Reiff et al., 2010, Hendershot et al., 2008, Morikawa et al., 2007; Schmidt et al., 2009; Wildner et al., 2008). Im Fall von Gata3 wurde sogar eine essentielle Rolle im Überleben von differenzierten sympathischen Neuronen postnatal nachgewiesen (Tsarovina et al.,



2010).

AP-2 $\alpha$  wurde durch *in vitro*-Studien in der transkriptionellen Regulation des noradrenergen Markergens DBH impliziert (Kim et al., 2001; Greco et al., 1995). Beim Zebrafisch zeigten die AP-2 $\alpha$ -Mutanten eine Reduktion der noradrenergen Differenzierung, allerdings waren bei unterschiedlichen Mutanten Differenzierung und Überleben sympathischer und sensorischer Vorläuferzellen unterschiedlich betroffen (Knight et al., 2003, 2005; Holzschuh et al., 2003; Barallo-Gimeno et al. 2003). Im Zebrafisch wird im PNS nur AP-2 $\alpha$  exprimiert während bei der Maus sowohl AP-2 $\alpha$  als auch AP-2 $\beta$  vorhanden sind und AP-2 $\beta$  präferentiell in sympathischen Ganglien exprimiert wird (Knight et al., 2003, 2005; Holzschuh et al., 2003; Hong et al., 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass die in den Zebrafischmutanten beschriebene Rolle von AP-2 $\alpha$  in der Maus durch AP-2 $\beta$  übernommen wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Funktion von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in der Entwicklung noradrenerger Neurone im PNS und ZNS aufzuklären. Dazu sollten einerseits die klassischen Einzel- und Doppelknockouts in der Maus studiert werden. Andererseits sollte eine konditionelle AP-2 $\alpha$ -defiziente Mauslinie verwendet werden, die, nach Verpaarung mit einer *Ascl1Cre*- oder *DBHCre*-Maus, eine Inaktivierung des AP-2 $\alpha$ -Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung sympathischer Ganglien ermöglicht. Die konditionellen AP-2 $\alpha$ -defizienten Mauslinien sollten mit der AP-2 $\beta$ -Nullmutante verkreuzt werden, wodurch eine vermutete Redundanz beider Gene genauer untersucht werden kann. Dies umfasste auch die kritische Überprüfung der Ergebnisse zum AP-2 $\beta$ -Knockout, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit publiziert wurden. Durch die Untersuchung wurde ein grundlegendes Verständnis der Funktion von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  während der Entstehung noradrenerger Neurone angestrebt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Herstellernachweise

<b>Hersteller</b>	<b>Ausrüstung</b>
<b>Biomol,</b> Hamburg, Deutschland	IPTG
<b>Difco,</b> Detroit, Michigan USA	Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton, Bacto-Agar
<b>Eurogentec,</b> Köln, Deutschland	Bakterien-Elektroporationsküvetten
<b>Gibco BRL,</b> <b>Life Technologies.,</b> Eggenstein, Deutschland	Agarose, fötales FCS, Hühnerserum, Ziegenserum, 1kb DNA-Größenstandard
<b>Hoechst,</b> Frankfurt Deutschland	4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)
<b>Invitrogen,</b> Karlsruhe, Deutschland	Taq DNA Polymerase Kit, T7 RNA Polymerase, 1 kb plus DNA Ladder, dNTP Set (PCR), Hühnerserum (CHS), M-MLV Reverse Transkriptase Kit
<b>Leica</b>	Kryostat (Leica CM 3050S)
<b>Mallinckrodt Baker B. V.,</b> Deventer, Holland	Formamid

<b>Menzel,</b> Braunschweig, Deutschland	SuperFrostPlus Objektträger
<b>Merck, Darmstadt,</b> Deutschland	Bromphenolblau, Borsäure, $MgCl_2$ , $CaCl_2 \times 2 H_2O$ , $NaCl$ , $NaHCO_3$ , $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , Kaisers Glycerin Aceton, Saccharose, Tween20, Gelatine, Natriumcitrat, $Na_2HPO_4$ , Glucose, $KCl$ , $KH_2HPO_4$ , $LiCl$
<b>Millipore,</b> Schwalbach, Deutschland	MilliQ Filtersystem, Sterivex-GS 0,22 $\mu m$ - Filtereinheiten (Glockenfilter)
<b>MP Biomedicals,</b> Illkirch, Frankreich	L-Phenylepinephrine Hydrochlorid, L-Isoproterenol Hydrochlorid
<b>Nalgene Nunc Inter.,</b> Rochester, USA	Flaschenaussatzfilter 0,45 $\mu m$ Porenweite
<b>Polysciences,</b> Warrington, USA	Aqua Poly/Mount
<b>Qiagen,</b> Hilden, Deutschland	Plasmid Purification Mini Kit, Plasmid Purification Midi Kit, PCR Purification Kit; Gel Elution Kit, RNeasy Mini Kit, Effectene, Qias shredder-Säulchen (50), HotstarTaq
<b>Riedel-de-Haen,</b> Seelze, Deutschland	Ethanol, $NaOH$ , $HCl$ , Trinatriumcitrat

<b>Roche Diagnostics,</b> Heidelberg, Deutschland	Ampicillin, Restriktionsendonukleasen mit den zugehörigen Puffern, Pferdeserum (HS), DIG-Nucleinsäure-Detektionskit, DIG-RNA-Labeling-Kit, Proteinase K, RNase-Inhibitor, Quick-Spin Säulchen G-50 Sephadex RNA
<b>Roth,</b> Karlsruhe, Deutschland	Glycerin, Triton-X-100
<b>Sakura,</b> Zoeterwoude, Niederlande	Tissue-Tek
<b>Serva,</b> Heidelberg, Deutschland	Paraformaldehyd, Bromphenolblau, Silicon
<b>Sigma-Aldrich-Chemie,</b> Taufkirchen Deutschland	Ethidiumbromid (EtBr), Isopropanol, Tween-20, Tris-Base (Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat), HEPES, Dimethylsulfoxid, Tris-Base, Hefe RNA, Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA), Maleinsäure, Levamisol, $\beta$ -Mercaptoethanol, Xylencyanol, Polyvinylpyrillidon (PVP), Ascorbinsäure, PAP-Pen
<b>Stratagene,</b> La Jolla, Kalifornien	XL-1 Blue (elektrokompetente Bakterien)

### 2.1.2 Medien und Lösungen

Alle Medien und Lösungen werden, wenn nicht anders erwähnt, mit hochgereinigtem H<sub>2</sub>O (MilliQ- Filtersystem der Firma Millipore) angesetzt.

**Medien für die Bakterienkultur**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
LB (Luria Bertani)	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl in 1 l H <sub>2</sub> O lösen; autoklavieren
LB- (Luria Bertani) Selektionsagarplatten	LB-Medium + 15 g Agar in 1 l H <sub>2</sub> O lösen; autoklavieren und unter Rühren auf 37 °C im Wasserbad abkühlen lassen und Ampicillin (50 mg/ ml) hinzugeben, Platten gießen und bei 4 °C lagern

**Lösungen für die Molekularbiologie**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
0,5 M EDTA	186,12 g Ethylendiamintetraacetat in H <sub>2</sub> O lösen, pH 8,0 mit NaOH einstellen, mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen
50 x TAE	40 mM Tris Acetat, 2 mM EDTA (pH 8,0)
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % (v/v) Bromphenolblau, 0,25 % (v/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol, nicht autoklavieren
3% BSA in PBS	3% (w/v) in 1xPBS
0,25% Triton-X-100 in PBS	0,25% (v/v) Triton-X-100 in 1 x PBS
Citratpuffer	100mM Na <sub>3</sub> -Citrat, 100mM Zitronensäure, H <sub>2</sub> O

**Lösungen für die histologischen Färbungen**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10 x PBS	1,3 M NaCl, 40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 24 mM KCl, pH 7,3
PBST	PBS + 0,1 % Triton
PBS /Glycerin	PBS/Glycerin 1:1
Blocklösung	10% (v/v) Ziegenserum 0,25% (v/v) Triton-X-100 in 1xPBS

**Immunologische Reagenzien**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti-Tyrosinhydroxylase (TH)	1:1000	Huhn	Aves Labs, Portland, USA
anti-Tyrosinhydroxylase (TH)	1:1000	Maus	Rohrer et al., 1986
anti-βGal	1:500	Ziege	Biotrend, Köln, Deutschland
anti-AP-2β	1:500	Hase	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Maus IgG (Alex 488)	1:500	Esel	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

anti-Maus IgG (Alex 488)	1:500	Esel	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
anti-Hase IgG (Cy3)	1:500	Esel	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Ziege IgG (Alexa 488)	1:500	Esel	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
anti-DIG	1:3000	Schaf	Roche, Mannheim, Deutschland

### **Lösungen für die In situ-Hybridisierung**

#### **Lösung**

0,1 M Natriumphosphat-  
Puffer

4% Paraformaldehyd in  
Natriumphosphatpuffer

20 x SSC

10 x Salz

0,5 M EDTA

50 x Denhardts

#### **Zusammensetzung**

0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  und 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4

4 g Paraformaldehyd in 100 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)

3 M NaCl, 0,3 M Trisnatriumcitrat in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0

126 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,85 M NaCl, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mM EDTA, autoklavieren

186,12 g EDTA in  $\text{H}_2\text{O}$  lösen, pH 8,0 mit NaOH einstellen, mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml auffüllen

1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Ficoll, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP), bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern

Hybridisierungspuffer	1 x Salz, 50 % Formamid, 10 % Hefe RNA (10 mg/ml), 10 % (w/v) Dextransulfat, 1 x Denhardtts
PBT	PBS + 0,1 % Tween 20
Waschlösung	1 x SSC, 50 % Formamid, 0,1 % Tween 20
MAB (5 x) (Maleinsäurepuffer)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5; mit NaOH einstellen, autoklavieren
MABT	MAB + 0,1 % Tween 20
Blocklösung	MABT + 20 % CHS
AP-Puffer	0,1 M Tris; 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, 0,024 % Levamisol, pH 9,5, sterilfiltrieren

### 2.1.3 DNA-Konstrukte

#### Plasmid für die Sondensynthese

<b>Insert</b>	<b>Insertgröße/Linearisierung/Transkription</b>	<b>Hersteller</b>
mmDBH	987bp/ EcoRI /T7	J.F. Brunet
mmTH	430bp/ EcoRI /T7	J.F. Brunet
mmPhox2b	1.6kbp/ EcoRI /T3	J.F. Brunet
mmPhox2a	588bp/ SacI /T3	U. Ernsberger
mmSCG10	541bp/ NcoI /Spe6	G. Grenningloh
mmHand2	1.1kbp/ SpeI /T7	K. Tsarovina
mmGATA3	1.1kbp/ XbaI /Spe6	C. Goidis
rSox10	2.3kbp/XbaI /T7	K. Kuhlbrodt
mmAP-2 $\alpha$	1.0kbp/ HindIII /T7	T. Williams
mmAP-2 $\beta$	450bp/ HindIII /T7	T. Williams



## 2.1.4 Oligonukleotide

### Primer

#### **AP-2 $\alpha$ loxP**

ALFLP 5'-cct gcc ttg gaa cca tga ccc tca g-3'  
ALFSCSQ 5'-gaa tct agc ttg gag gct tat gtc-3'

#### **AP-2 $\beta$**

PKG-POLY A DW 5'-ctg ctc ttt act gaa ggc tct tt-3'  
MAP-2 $\beta$  4 EXON REV 5'-ttc tga gga cgc cgc cca gg-3'  
MAP-2 $\beta$  4 EXON DW 5'-cct ccc aaa tct gtg act tct-3'

#### **AP-2 $\alpha$**

ALPHA 3'KO 5'-cgt gtg gct gtt ggg gtt gtt gct gag gta c-3'  
ALPHA 6/7F 5'-gaa agg tgt agg cag aag ttt gtc agg gc-3'  
IRESUP 5'-gct aga cta gtc tag cta gag cgg ccc ggg-3'

#### **DBHCre**

DBHCre anti 5'-cag acc agg cca ggt atc-3'  
DBHCre sense 5'-gtg agg gac tac ctc ctg-3'

#### **Ascl1Cre**

Ascl1-5'UTR 5'-aac ttt cct ccg ggg ctc gtt tc-3'  
GFP-3' 5'-tgg ctg ttg tag ttg tac tcc agc-3'

#### **AP-2 $\alpha$**

mmAP-2 $\alpha$  anti 5'-ccc-aag cca tag ctc gag act c-3'  
mmAP-2 $\alpha$  sense 5'-gaa gtc aca gat ttg gga ggg a-3'

mmGAPDH anti 5'-cta-ggc-ccc-tcc-tgt-tat-3'  
mmGAPDH sense 5'-tac ccc-caa-tgt-gtc-cgt-3'

## 2.1.5 Organismen

### *Mus musculus (Maus)*

<b>Stamm</b>	<b>Bezugsquelle</b>
C57/Bl6	Charles River Deutschland GmbH, Deutschland
AP-2 $\beta^{+/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$	T. Williams, Yale University, USA; (Brewer et al., 2004; Moser et al., 1997a)
AP-2 $\alpha^{+/-}$	T. Williams, Yale University, USA; (Brewer et al., 2002, 2004)
DBHCre	G. Schütz, DKfz, Heidelberg, Deutschland; (Stanke et al., 2006)
Ascl1Cre	J. E. Johnson, Dallas, USA (Battiste et al., 2007; Helms et al., 2005)

### *Escherichia coli Bakterienstämme*

<b>Stamm</b>	<b>Genetischer Marker</b>	<b>Bezugsquelle</b>
XL1- Blue	Genetische Marker: RecA1, end A1, gyrA96, thi- 1, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F'proAB, lacqZDM15, Tn10, (tet))	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Histologische Präparation von embryonalem Gewebe

#### **Präparation von Mausembryonen**

Tragende Mausweibchen werden durch Inhalation des Anästhetikums Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Die Uteri werden freipräpariert und die Mausembryonen entnommen. Das Entwicklungsstadium der Embryonen wird nach Theiler bestimmt (Kriterien gemäß <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/atlas/intro.html>). Zur Genotypisierung wird die Mausschwanzspitze entnommen. Die Fixierungsdauer für E 9.5, E 10.5 und E 13.5 beträgt 4 Stunden bei 4°C in 4% (w/v) Paraformaldehyd in Natriumphosphatpuffer. Die Fixierung von E 14.5 und E 16.5 alten Mausembryonen erfolgt über Nacht. Vor dem Einbetten wird in 30% (w/v) Saccharose in 0,1 M Natriumphosphatpuffer für mindestens 4 bis 48h inkubiert. Zum Schneiden wird das Gewebe in einem Einbettungsförmchen in Tissue Tek eingebettet. An einem Kryostat der Firma Leica (Leica CM 3050 S) werden 12-14 µm dicke Parallelschnitte angefertigt und auf Objektträger überführt. Die Schnitte werden bei -20°C aufbewahrt.

#### **Präparation des oberen Zervicalganglions (SCG) und des Stellarganglions aus embryonalen und adulten Mäusen**

12.5, 13.5, 16.5 und 18.5 Tage alte Mausembryonen (E 12, 13) werden aus den Uteri entfernt und präpariert. Der Brustkorb wird mit einer feinen Schere geöffnet und die inneren Organe entfernt. Außerdem wird die Trachea bis zum Kopfbereich entnommen. Die dorsale Aorta wird in posteriorer-anteriorer Richtung abgezogen, dadurch werden sowohl die Zervical- als auch die Stellarganglien im Brust- und Halsbereich sichtbar. Mit einer Pinzette werden die Ganglien herausgenommen (Higgins et al., 1991) und in Glukoselösung (2mg/ml PBS) gesammelt und anhaftendes Gewebe entfernt. Das Gangliengewebe wird mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette in ein Eppendorf-Reaktionröhrchen überführt.

Adulte Mäuse (P90) werden durch Inhalation des Anästhetikums Isofluran

betäubt und durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Der Brustkorb wird mit einer feinen Schere geöffnet, das Herz perforiert und das ausströmende Blut mit Papiertüchern aufgesaugt. Die Haut im Halsbereich wird aufgeschnitten und die Speicheldrüsen freigelegt. Durch entfernen der Speicheldrüse und Muskelgewebe werden rechts und links der Luftröhre die Halsschlagadern (*Arteria carotis communis*) freigelegt. Dorsal der Verzweigungsstelle der Halsschlagader liegt das obere Zervicalganglion. Mit einer Pinzette wird die Halsschlagader zur Seite geklappt, die drei abgehenden Nerverfasern des Ganglions mit einer zweiten Pinzette gekappt und das Ganglion herausgenommen (Higgins et al., 1991). Die zwei Zervicalganglien werden in Glukoselösung (2 mg/ml PBS) gesammelt, anhaftendes Gewebe entfernt und in ein Eppendorf-Reaktionröhrchen überführt.

### **2.2.2 Anfertigen von Gefrierschnitten**

Die in TissueTek eingebetteten Embryonen werden mit einem Kryostat (Jung Frigocut 2800E, Leica) bei ca. -13-16°C geschnitten. Die 12-14 µm dicken Schnitte werden auf die unbeschichteten Objektträger aufgenommen, eine Stunde bei 37°C getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.2.3 *In situ*-Hybridisierung**

#### **Herstellung von RNA-Hybridisierungssonden**

Die RNA-Hybridisierungssonden werden für die *In situ*-Hybridisierung durch *in vitro*-Transkription nach Protokoll des DIG (Digoxigenin)-Markierungs-Kits synthetisiert. Es werden folgenden Reagenzien (Menge jeweils pro 20 µl Ansatz) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsröhrchen zusammengegeben:

- 1 µg linearisiertes Plasmid
- 2 µl DIG-RNA-Markierungs Mix
- 2 µl 10 x Transkriptionspuffer
- x µl H<sub>2</sub>O.

Nachdem die Lösungen vermengt wurden, werden 0,5 µl RNase-Inhibitor hinzugefügt. Die Transkription erfolgt durch Zugabe von 10 U RNA-Polymerase und einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C. Die transkribierte RNA wird mit 3,5 µl 4 M LiCl und 100 µl 100 %igem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach einer halbstündigen Zentrifugation bei 13.000 U/min und 4 °C wird der Überstand abgenommen und mit 100 µl 70 %igem Ethanol 15 min bei 13.000 U/min und 4 °C in der Zentrifuge gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde und das Pellet bei RT getrocknet wurde, wird es in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **Sondenaufreinigung**

Zum Aufreinigen der Synthesereaktion werden Sephadex Gefiltrationsäulen G-50 verwendet. Die Säulen trennen Transkripte von Protein, freien Nukleotiden und Polymerisationsprodukten kleiner als 70 Nukleotiden ab. Die Gelfiltrationssäulchen werden gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Gelmatrix wird zunächst durch Schütteln aufgelockert, und überschüssige Pufferlösung durch Zentrifugieren für 2min bei 1100g im Ausschwingrotor abgetrennt. Der Reaktionsansatz wird mit 100µl Wasser versetzt und auf die Säulenmatrix pipettiert. Zentrifugieren für 4min bei 1100g dient der Elution der gereinigten Sonde. Die aufgereinigte Säule wird bei -20°C gelagert.

### **RNA-Sondenquantifizierung durch Dot-Blot**

Zur Quantifizierung der Sondensynthese werden Proben der zu testenden Sonde auf eine Nylonmembran (Hybond) aufgetropft. Durch Bestrahlung mit 2000kj UV-Licht

im Stratalinker (Stratagene, Programm „Autocrosslink“) wird die synthetisierte RNA kovalent mit der Membran verknüpft. Nach Inkubation der Membran mit MABT-Puffer mit 20% Hühnerserum für 20min wird der mit Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelter anti-DIG-Antikörper unverdünnt und in Verdünnung 1:10, 1:100, 1:1000 dazugegeben. Es wird für weitere 20min inkubiert. Überschüssiger Antikörper wird durch Waschen mit MABT-Puffer entfernt. Dieser Puffer wird gegen AP-Puffer ausgetauscht. Durch Zugabe des AP-Substrates NBT/BCIP startet eine Farbreaktion, deren Intensität im Vergleich zu einer bekannten Sonde Aufschluß über die Menge der an die Membran gebundene RNA gibt.

### **In situ-Hybridisierung auf Gewebeschnitten**

Zum Nachweis der Expression verschiedener Gene in Gewebeschnitten wird endogene RNA *in situ* markiert und angefärbt. Dabei hybridisiert eine genspezifische Gegenstrang-DIG-RNA-Sonde an die endogene RNA. Das DIG wird mit Hilfe eines Antikörpers, der mit dem Enzym der alkalische Phosphatase gekoppelt ist, erkannt werden (Höltke et al., 1990, 1992). Dieses Enzym wird dann durch Zugabe von NBT/BCIP einen unlöslichen lichtmikroskopisch detektierbaren Farbstoff umsetzen, der im Gewebe ausfällt und sich daher nicht durch Diffusion verteilt.

Hybridisierungsschritt: Die Gewebeschnitte werden auf Raumtemperatur angeglichen. Die Sonde wird währenddessen in Hybridisierungspuffer (v/v) 1:100 verdünnt und 10 min bei 70°C denaturiert. Auf jeden Objektträger werden 120-140 µl Sondenlösung gegeben, mit einem sterilen Deckglas abgedeckt und über Nacht in einer mit Waschpuffer benetzten Kammer bei 65°C inkubiert.

Antikörperschritt: Die Gewebeschnitte werden danach zunächst eine Stunde bei 65°C in Waschpuffer und schließlich 15 min, 4 x je eine halbe Stunde in MABT (0,1% (v/v) Tween20 in Maleinsäurepuffer) gewaschen. 120 µl der Antikörperlösung (Anti-DIG 1:3000 in MABT/20% (v/v) Hühnerserum) werden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Die Schnitte werden 1x 15 min, 4 x je eine halbe Stunde in MABT gewaschen.

Farbreaktion: Die Gewebeschnitte werden 2 x 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 über mehrere Stunden, gegebenenfalls auch über Nacht, im Dunkeln bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Objektträger werden dabei mit Deckgläsern abgedeckt. Die Reaktion wird durch Waschen in PBS beendet und die Schnitte in Wasser gewaschen. Die Schnitte werden getrocknet und schließlich in Kaisers Glyceringelatine eingebettet.

### **2.2.4 Molekularbiologische Methoden**

#### **Transformation von Bakterien**

Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. 40 µl auf Eis aufgetaute transformationskompetente Bakterien werden mit 1 µl Plasmidlösung (2 - 50 ng/µl) gemischt und in einem Genepulser II (Bio-Rad) bei 2,5 kV, 200 W, 25 µF elektroporiert. Anschließend werden die Bakterien zügig in 800 µl LB-Medium aufgenommen. Der Ansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird ein Vereinzelausstrich auf LB/Selektions-Agarplatten durchgeführt. Die Platten werden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **Kultivierung transformierter Bakterien und Isolation der DNA aus Bakterienkultur**

Nach der Transformation und dem Ausplattieren der Bakterien auf LB/Selektions(Ampicillin)-Platten werden resistente Kolonien mittels einer sterilen Impfnadel von der Platte in 2 - 5 ml (Mini-DNA-Präparation) oder 50 ml (DNA-Midi-Präparation) LB/ Selektions(Ampicillin)-Medium überführt. Die Kulturlösung wird über Nacht bei 37 °C im Rundschüttler inkubiert.

Mengen zwischen 100 - 200 µg Plasmid-DNA werden aus Bakterienkulturen mittels Qiagen Midi Prep Kits (Qiagen) oder 100 - 200 ng Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

mittels Qiagen Mini Prep Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Das Bakterienpellet wird dabei mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, die Proteine gefällt und anschließend die DNA über eine Säule gereinigt und konzentriert. Die DNA wird mit H<sub>2</sub>O eluiert (Birnboim und Doly, 1979).

### **Fällung von Nukleinsäuren**

Durch die Ethanol-Fällung lassen sich Nukleinsäuren aufreinigen und konzentrieren. Die nukleinsäurehaltige Lösungen wurden mit 1/10 Volumen 3 M LiCl versetzt und mit dem 2,5 fachen Volumen 100 %igen Ethanol vermischt. Nach ca. 2 h bei -20 °C oder ca. 20 min bei -70 °C wird für 30 min bei 4 °C und 25.000 x g zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Bei der Isopropanol-Fällung wird das Eluat mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol vermischt und bei 4 °C bei 12.000 x g für 30 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 4 °C bei 12.000 x g für 10 min zentrifugiert. Nach dem Trocknen wird das Pellet in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **Photometrische Konzentrationsbestimmungen**

Die optische Dichte wird mit einem Spektrometer NanoDrop der Firma Nanodrop ermittelt. Die Spektrophotometrie liegt im Meßbereich von 220 nm bis 750 nm, so dass unter anderem Messungen von RNA-, DNA- und Proteinkonzentrationen durchgeführt werden können. Es verlangt nur 1,5 - 2 µl Probenvolumen und benötigt keine Küvetten. Bei der Analyse von Proben gehen dadurch nur minimale Mengen verloren. Dies gilt insbesondere bei Standardmessungen von DNA und RNA.



### **Restriktionsanalyse von DNA**

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA für die Sondensynthese kann die DNA durch Endonukleasen an definierten Stellen gespalten werden. Bei 20 µg zu spaltender DNA werden 40 - 100 U Restriktionsenzym in dem von Hersteller empfohlenem Puffer bei 37 °C für 1 - 5 h zum Verdau eingesetzt. Zur Überprüfung der Reaktion entnimmt man dem Verdau eine Probe und trennt sie elektrophoretisch auf.

### **Agarosegelelektrophorese**

Zur Analyse der PCR-Reaktionen und Restriktionsverdaus wird eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, bei der DNA ihrer Länge nach elektrophoretisch aufgetrennt wird. Agarose wird in TAE-Puffer mit einer Endkonzentration von 1 % (jeweils w/v) unter Erhitzen gelöst. Die flüssige Agarose-Lösung wird in einen horizontalen Gelschlitten gegossen, in die ein Kamm zur Ausbildung von Probenaschen eingesetzt wurde. Die Elektrophoresekammer wird mit TAE-Puffer gefüllt und nach Erkalten der Lösung wird der Gelschlitten eingesetzt. Das Agarosegel muss vollständig mit TAE-Puffer bedeckt sein, bevor der Kamm entfernt werden kann. Die Proben werden mit DNA-Probenpuffer (6x) im Verhältnis von 1:6 vermischt und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Als Größenmarker wird eine Leiter aus DNA-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen (1 kb plus DNA Ladder). Die Elektrophorese wird bei 5V/cm durchgeführt. Nach genügender Auftrennung wird das Gel aus der Kammer herausgenommen und für 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml TAE) inkubiert. Zur Visualisierung und Analyse wird das Agarosegel unter UV-Licht fotografiert.

### **Gelelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Elution von DNA-Fragmenten (linearisierte Plasmide für die Sondensynthese) werden Säulen und Puffer aus dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Quiagen verwendet. Es wird nach deren Vorschrift verfahren. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wird mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsröhrchen überführt und mit Elutionspuffer

bei 50 °C für 10 min inkubiert. Dabei löst sich die Agarose und wird anschließend mit Hilfe einer Säule aus Kieselgelmatrix von der DNA getrennt. Nach einigen Waschschritten wird die DNA mit Wasser eluiert.

### **RNA-Isolierung**

Zur Isolierung der RNA wird das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Isolation erfolgt nach Herstelleranweisung. Zu Beginn wird der RLT-Lysispuffer mit 2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Für die RNA-Isolation werden die Zellen in Suspension genommen. Die Suspension wird in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen abzentrifugiert (150 x g, 10 min, RT). Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wird in 350  $\mu$ l RLT-Puffer resuspendiert, auf ein QIAshredder-Säulchen (zum Aufschließen der Zellen) gegeben und 2 min bei 16.000 x g zentrifugiert.

Der Durchfluss wird mit 350  $\mu$ l 70 % Ethanol (in DEPC behandeltem Wasser) versetzt und durch Umschwenken gemischt. Das Gemisch wird auf eine Qiagen-Säule gegeben, dann 1 min abzentrifugiert (immer 16.000 x g, RT), und der Durchlauf verworfen. Es folgt ein Waschschriff mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer und Zentrifugation. Der Durchlauf wird verworfen, die Säule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt und mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Durchlauf abermals verworfen. Dieser Waschschriff wird wiederholt. Nach diesem Schriff wird noch einmal trocken zentrifugiert, um im nächsten Schriff die Säule in ein Reaktionsgefäß zu überführen und 30  $\mu$ l RNase-freies Wasser direkt auf die Membran zu pipettieren. Nach einer Inkubation von 1 min wird die RNA durch abschließende Zentrifugation eluiert. Die isolierte RNA wird bei -20 °C gelagert.

### **Reverse Transkription**

Bei der Reversen-Transkriptase-Reaktion wird aus einzelsträngiger RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) - aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus - ein doppelsträngiges RNA-/DNA-Hybrid angefertigt. Die RT wird mit dem M-MLV Reverse Transkriptase Kit von Invitrogen durchgeführt. Als Startmoleküle für die Reverse-Transkriptase werden oligo dT Primer eingesetzt. Es werden folgenden Reagenzien

(Menge jeweils pro Ansatz) in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zusammengegeben:

3 µg total RNA  
1 µl oligo dT Primer  
1 µl dNTP Mix  
x µl H<sub>2</sub>O (das Volumen muss mit H<sub>2</sub>O  
auf 13 µl gebracht werden).

Danach wird der Ansatz bei 65 °C für 5 min inkubiert, um zu gewährleisten, dass sich die Primer anlagern. Am Ende der Inkubationszeit wird der Ansatz sofort auf Eis gegeben. Im nächsten Schritt werden pro Ansatz folgende Reagenzien hinzugegeben:

2 µl 0,1 M DTT  
4 µl 5 x Puffer

Der Ansatz wird nun auf eine Temperatur von 37 °C gebracht. Diese Temperatur ist die ideale Arbeitstemperatur für die verwendete RT. Es wird 1 µl der Reversen Transkriptase hinzugefügt und nochmals alles gut gemischt. Danach werden die Proben in ein Eppendorf Mastercycler (Fa. Eppendorf) platziert. Das Programm beinhaltet folgende Schritte:

50 min bei 37°C  
15 min bei 72°C.

Durch den letzten Schritt wird die RT inaktiviert. Die Proben können nun bei -20 °C eingefroren oder auf Eis für folgende Reaktionen gelagert werden.

### **Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1987)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation eines bestimmten, durch zwei begrenzende Oligonukleotide definierten DNA-Bereichs. Für diese Synthesemethode wird eine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) verwendet, die eine besondere Thermostabilität aufweist. Sie stammt aus dem thermophilen Mikroorganismus *Thermus aquaticus*. (daher Taq-Polymerase) und können Temperaturen bis zu 110 °C überstehen. Ein PCR-Ansatz umfasst folgende Lösungen und Reagenzien, die auf Eis in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt werden. Als Matrize dient hier der RNA-/DNA-Hybrid-Strang aus der Erststrangsynthese.

#### 50 µl Ansatz:

- 38 µl H<sub>2</sub>O
- + 5 µl 5 x PCR-Puffer
- + 1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- + 1 µl 10 mM dNTP-Mix
- + 1 µl Primer antisense (10µM)
- + 1 µl Primer sense (10µM)
- + 0,5 µl Taq-Polymerase
- + 2 µl Matrize

Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Im ersten Schritt werden die zu amplifizierenden DNA-Moleküle (Matrize) bei 95 °C denaturiert und somit in Einzelstränge getrennt. Im nächsten Schritt verbinden sich die Primer mit der DNA - ein Vorgang, den man „Hybridisierung“ nennt. Durch das Herabsetzen der Temperatur sind die Primer in der Lage, sich an die DNA anzulagern. Diese Verbindung ist nur dann stabil, wenn Primer und DNA-Abschnitt komplementär sind, sich also zwischen ihren Bausteinen Basenpaare bilden können. Die Taq-Polymerasen beginnen am freien 3'-Ende des Primers den Strang zu verlängern. Die Temperatur wird wieder erhöht, diesmal auf 72 °C. Das ist die ideale Arbeitstemperatur für die verwendete Polymerase, die weitere Nukleotide an die entstehenden DNA-Stränge anbaut (Elongation).

Der Syntheszyklus wird während einer PCR mehrfach wiederholt, so dass sich die Anzahl des gewünschten DNA-Moleküls bei einer PCR exponentiell erhöht. Die hier verwendeten Zyklen lagen in einem Bereich, in dem das Amplifikat exponentiell anstieg. Das PCR-Produkt wurde entnommen, um im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Zur semiquantitativen Analyse wurden die Gele digitalisiert und die Intensität der einzelnen Banden mit Hilfe eines speziellen Programms (Scion Image v1.6.3, Fa. Scion) quantifiziert. Die Intensität der Banden werden relativ zur Intensität der Bande eines GAPDH-PCR-Produktes aus dem gleichen PCR-Ansatz gesetzt. Damit werden mögliche Ungenauigkeiten bei der RNA-Bestimmung herausgerechnet. Die Temperaturen und die Inkubationszeiten richten sich nach der Annealing-Temperatur der Primer und der Länge der erwarteten PCR-Fragmente. Ein fünfminütiger Elongationsschritt bei 72 °C schließt die Amplifikation ab. Für GC-reiche PCR-Produkte kann vor dem ersten Denaturierungsschritt ein fünfminütiger Schritt bei 95°C eingefügt werden, um die potentiellen Sekundärstrukturen zu lösen.

### **Polymerasekettenreaktion zur Genotypisierung von Mäusen**

Mäuse mit gezielten genetischen Mutationen in den Genen AP-2 $\alpha$  [LoxP (Brewer et al., 2004); Knockin, (Brewer et al., 2002)] und AP-2 $\beta$  (Moser et al., 1997) werden durch PCR mit der Qiagen Hotstar Polymerase gemäß den Angaben des Herstellers genetisch charakterisiert. Bereits publizierte Bedingungen (Brewer et al., 2002, 2004; Moser et al., 1997a) werden verwendet:

Einmalig fünf Minuten zur Aktivierung der Polymerase, danach 40 Zyklen: 30 sec 95°C; 30 sec  $T_m$ -Oligonukleotide; 1 min 72°C. Folgende Oligonukleotide werden verwendet (Synthese durch MWG, Ebersberg):

Nachweis des wildtypischen, deletierten und mit LoxP integrierten AP-2 $\alpha$ -Allels: ALFLP, ALFSCSQ und ALFLOX4: Produktionsprodukte von 490bp (Wildtypallel), 560bp (LoxP-Allel) und 185bp (deletiertes Allel).

Nachweis des wildtypischen und Knockin AP-2 $\alpha$ -Allels:

ALPHA 3'KO, ALPHA 6/7F und IRESUP: Produktionsprodukte von 500bp (Wildtypallel) und 300bp (Knockin-Allel).

Nachweis des wildtypischen und Knockout AP-2 $\beta$ -Allels:

PKG-POLY A DW, MAP-2 $\beta$  4 und EXON REV: Produktionsprodukte von 221bp (Wildtypallel) und 380bp (Knockout-Allel).

Nachweis der DBHCre:

ICre anti und ICre sense: Produktionsprodukte von 652bp.

Nachweis der Ascl1Cre:

Ascl1-5'UTR und GFP-3: Produktionsprodukte von 550bp.

### **Präparation von genomischer DNA zur Genotypisierung von Mäusen**

Zur Genotypisierung von genetisch veränderten Mäusen werden von den Tierpflegern des Max Planck Instituts für Hirnforschung (Frankfurt/M) Mausschwanzspitzen der Mäuse angefertigt. Die Schwanzspitze wird in 100 $\mu$ l Lysispuffer bei 55°C über Nacht mit Proteinase K verdaut. Die DNA wird dadurch freigesetzt. Nach Inaktivierung des Enzyms bei 95°C für 10min kann die Lösung bei 20°C eingefroren werden oder direkt in der PCR-Reaktion zur Genotypisierung verwendet werden.

### **Applikation von Noradrenalin-Agonisten**

Durch die Phox2b- und Gata3-Nullmutante konnte veranschaulicht werden, dass Gene aus dem regulatorischen Netzwerk der sympathischen Differenzierung für die Aufrechterhaltung der noradrenergen Genexpression verantwortlich sind. Der Verlust dieser Gene führt zu einer Noradrenalin-Insuffizienz und somit zu einem letalen

Phänotyp. Es kann sein, dass die zu untersuchenden AP-2-Nullmutanten sehr früh im Uterus absterben und somit eine Analyse unmöglich ist. Es wird vermutet, dass die AP-2-Gene in der noradrenergen Entwicklung beteiligt sind und ihr Verlust eine Störung in der Noradrenalin-Synthese verursacht. Aus diesem Grund wird die Applikation von Noradrenalin-Agonisten als präventive Maßnahme durchgeführt. Wie bereits in Pattyn et al. (2000) beschrieben, wird in das Trinkwasser jedes tragenden Weibchens 100 µg/ml L-Phenylepinephrin, 100 µg/ml Isoproterenol und 2 mg/ml Ascorbinsäure verabreicht. Dadurch werden die zu analysierenden Embryonen mit möglicher letaler Noradrenalin-Insuffizienz bis zum gewünschten Stadium der Analyse gerettet.

### 2.2.5 Histologische Färbungen

**Nachweis von Apoptose durch terminales Desoxynukleotidyl-Transferase vermitteltes Markieren von DNA-Strangbrüchen mit dUTP („Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling“, TUNEL) (Gavrieli, 1992).**

Die TUNEL-Methode stellt eine Standardmethode zum Nachweis von Apoptose bei Zellen aus den unterschiedlichsten Geweben dar. Die TUNEL-Färbung ist eine Markierung der Zellkerne, die die typischen doppelsträngigen, niedermolekularen DNA-Fragmente und Einzelstrangbrüche („nicks“) enthalten. Jede TUNEL-positive Markierung wurde auf die Anfärbung mit DAPI überprüft, um die rote Markierung eindeutig einem Zellkern (oder Zellkern-Bruchstücke) zuzuordnen. Die DNA-Strangbrüche können durch eine enzymatische Reaktion angefärbt werden, in dem freie 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden markiert werden. Im „Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 488 Imaging Assay“ (Invitrogen) wird dazu das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) benutzt, welches Alkin-modifizierte Nukleotide matrizenunabhängig an freie 3'-OH-Enden anheftet. Diese Alkin-dUTPs können von der TdT schneller und effizienter eingebaut werden als Fluorescein-dUTPs. Die Erkennung dieser Nukleotide basiert auf der sogenannten Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Klick-Reaktion (Wang et al., 2003). Die Azide sind in dieser Nachweismethode mit einem Alexa-Fluoreszein 594 gekoppelt. Somit kann die Auswertung am

Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

Für diese TUNEL-Färbung wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren. Es werden Objektträger mit den zu untersuchenden Gewebeschnitten auf Raumtemperatur (RT) angeglichen. Als nächstes folgte eine 20minütige Inkubation in 0,25% Triton-X-100 in PBS, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Anschließend werden die Objektträger für 10min bei RT im TdT-Reaktionspuffer inkubiert. Die Gewebeschnitte werden dann für 1 h bei 37°C mittels TdT-Reaktions-Cocktail (TdT-Reaktionspuffer, EdUTP Nukleotid Gemisch, TdT) behandelt und 2 x für 2min in 3% BSA in PBS gespült. Für die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Klick-Reaktion werden 100µl „Click-iT®“-Reaktions-Cocktail („Click-iT®“-Reaktionpuffer, „Click-iT®“-Reaktionpuffer-Zusatz) für 30min lichtgeschützt bei RT auf die Gewebeschnitte gebracht. Die Proben werden dann wieder für 3 x 5min in 3% BSA in PBS gespült. Anschließend wird eine TUJ1-Immunfluoreszenzfärbung angeschlossen, um die sympathischen Ganglien lokalisieren zu können. Die TUNEL<sup>+</sup>-Zellen werden im TUJ1-positiven sympathischen Ganglion gezählt und auf die Fläche des *In situ*-Signals von Phox2b von Parallelschnitten bezogen.

### **Proliferationsnachweis**

Gefrierschnitte werden auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht (Hendershot et al., 2008). Hierfür wird ein anti-Ki67 Kaninchen-Antikörper verwendet. Es wird eine immunhistologische Doppelfärbung mit anti-TUJ1 aus der Maus angefertigt, um die sympathischen Ganglien zu erkennen. Alexa-594 anti-Kaninchen und Alex488 anti-Maus werden als Zweitantikörper benutzt. Die Ki67<sup>+</sup>-Zellen werden im TUJ1-positiven sympathischen Ganglion gezählt und auf die Fläche des *in situ*-Signals von Phox2b von Parallelschnitten bezogen.



### **Antigendemaskierung für immunhistologische Färbungen**

Die Antigendemaskierung durch Kochen dient der Verbesserung der Immunfärbung mit bestimmten fixierungssensitiven Epitopen. Die Objektträger werden mit 1 x PBS gewaschen. 500ml 10mM Zitratpuffer (pH6) wird frisch angesetzt und in einer Küvette auf 95°C gebracht. Die zu behandelnden Schnitte werden in diese Lösung gestellt, um für weitere 5-20 Minuten bei 95°C zu inkubieren. Schließlich lässt man die Schnitte in Wasser für 1 min abkühlen und spült dann 3 x 5min mit 1 x PBS.

### **Immunfluoreszenzfärbung auf Gewebeschnitten**

Die auf Raumtemperatur angeglichenen Gewebeschnitte ggf. nach TUNEL werden zunächst mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrundet, um ein Abfließen der Färbelösung vom Objektträger zu verhindern. Die zu färbende Gewebeschnitte werden mit PBS gespült. Das Gewebe wird mit 300 µl einer Lösung aus 10% (v/v) Serum in PBS/0,25% Triton-X-100 eine Stunde blockiert, um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Der erste Antikörper wird in derselben Lösung in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert, dabei werden die Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt. Bei Doppelfärbungen werden in gleicher Weise mit zwei primären Antikörpern aus unterschiedlichen Herkunftsspezies durchgeführt. 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 und DAPI (1:1000) werden für 1h bei RT in PBS/10% Serum/0,25 % Triton-X-100 in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Färbung der Zellkerne wird durch die Markierung mit DAPI ermöglicht. Abschließend werden die Schnitte 3 x je 10 min in PBS gewaschen. Die Objektträger werden in etwa 50 µl 50% (v/v) Glycerin/PBS oder mit Aquapolymount eingedeckelt.

## 2.2.6 Mikroskopische Analyse

### **Planimetrische Messung**

Die quantitative Analyse von Signalen der *In situ*-Hybridisierung erfolgte durch eine planimetrische Analyse von Gewebeschnitten. Am Mikroskop (Zeiss Axiophot) werden in Durchlichtkonfiguration bei entsprechender Vergrößerung digitale schwarzweiß Bilder aufgenommen. Mittels der Metamorph-Bildanalyse-Software wird ein zu vermessender Bildausschnitt markiert, und die zu messende Färbung durch einen Intensitätsschwellenwert definiert. Die Software errechnet die Fläche ( $\mu\text{m}^2$ ) des Signals. Es wird pro Embryo mindestens die Werte von 20 Ganglienquerschnitte gemittelt.

### **Epi-Fluoreszenzmikroskopie**

Die Auswertung der Fluoreszenzpräparate wurde an einem Fluoreszenzmikroskop »AXIO Imager.Z1« (Zeiss) mit den Öl-Immersionsobjektiven Plan-Apochromat 63x/1,40 und EC Plan-Neofluar 100x/1,30 (Zeiss) durchgeführt. Als Lichtquelle benutzt dieses Mikroskop eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 100 W, Osram), die verwendeten Fluoreszenzfilter sind # 10 (Anregung:  $\lambda = 450\text{-}490\text{nm}$ ; Emission:  $\lambda = 515\text{-}565\text{nm}$ ; Konjugat, Alexa Fluor 488), # 31 (Anregung:  $\lambda = 550\text{-}580\text{nm}$ ; Emission:  $\lambda = 590\text{-}650\text{nm}$ ; Konjugat, Cy3) und # 26 (Anregung:  $\lambda = 575\text{-}625\text{nm}$ ; Emission:  $\lambda = 660\text{-}710\text{nm}$ ; Konjugat, Alexa Fluor 594). Dieses Mikroskop war mit einem ApoTome (Zeiss) ausgestattet, dessen im Fluoreszenzstrahl oszillierendes Gitter für eine Reduktion des Streulichts in der Fokus-Ebene sorgte. Die Bildaufnahme an diesem Mikroskop erfolgte mit einer gekühlten CCD-Kamera AxioCam MRm (Zeiss) und der Software AxioVision v4.6 (Zeiss).

### **2.2.7 Bildbearbeitung und Statistik**

Alle durch die zuvor beschriebenen Methoden gewonnenen Ergebnisse und die in den Ergebnissen gezeigten Abbildungen wurden mit Hilfe der Software Photoshop CS4 (Adobe Systems) und Canvas 9 erstellt bzw. nachbearbeitet. Die statistische Auswertung der Rohdaten wird am Computer durch die Programme Microsoft Excel XP und InStat durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Die Signifikanz der Datensätze wurde mit einem zweiseitigen, ungepaarten T-Test untersucht.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Expression von AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ im peripheren Nervensystem der Maus

Um die AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -Expression während der Entwicklung des PNS in der Maus zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von Mausembryonen bei Embryonaltag (E) 10.5, E 13.5 und E 16.5 mittels *in situ*-Hybridisierung analysiert. Es stellte sich heraus, dass AP-2 $\beta$  in den sympathischen Ganglien an allen untersuchten Embryonaltagen exprimiert ist (Abb. 3.1, B-B''), während AP-2 $\alpha$  nur bei E 10.5 nachzuweisen ist (Abb. 3.1, D-D''). Die Quantifizierung der Fläche von AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -exprimierenden Zellen im sympathischen Ganglion ergab keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.1, G). Folgedessen kann davon ausgegangen werden, dass jedes Neuron im sympathischen Ganglion bei E 10.5 sowohl AP-2 $\alpha$  als auch AP-2 $\beta$  exprimiert. Durch RT-PCR-Analyse wurde AP-2 $\alpha$ -Expression im sympathischen Ganglion auch bei E 12.5 und E 13.5 nachgewiesen, während bei E 16.5 nur noch eine sehr schwache Expression beobachtet wurde (Abb. 3.1, H). Das Expressionsniveau bei E 12.5 und E 13.5 liegt somit unterhalb der Nachweisgrenze der *in situ*-Hybridisierung.

Das sensorische Hinterwurzelganglion (HWG) wurde ebenfalls auf die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  untersucht (Abb. 3.1, A-A'', C-C''). AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  werden im HWG an E 10.5 exprimiert, wobei für AP-2 $\alpha$  ein stärkeres *in situ*-Hybridisierungssignal detektiert werden konnte. Zwischen E 13.5 und 16.5 wurde ein Rückgang in der Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  beobachtet. An E 16.5 konnte im Fall von AP-2 $\beta$  kein *in situ*-Hybridisierungssignal festgestellt werden, wohingegen AP-2 $\alpha$  nachweisbar, aber nur sehr schwach exprimiert ist. Zum Vergleich wurde die Expression des neuronalen Markers SCG10 während der Entwicklung des PNS analysiert (Abb. 3.1, E-F''). In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten wurde AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$  eindeutig im Rückenmark detektiert (Moser et al., 1997b). Diese Ergebnisse zur Expression im PNS zeigen, dass sowohl AP-2 $\alpha$  als auch AP-2 $\beta$  eine Rolle in der sympathischen und sensorischen Entwicklung spielen können.

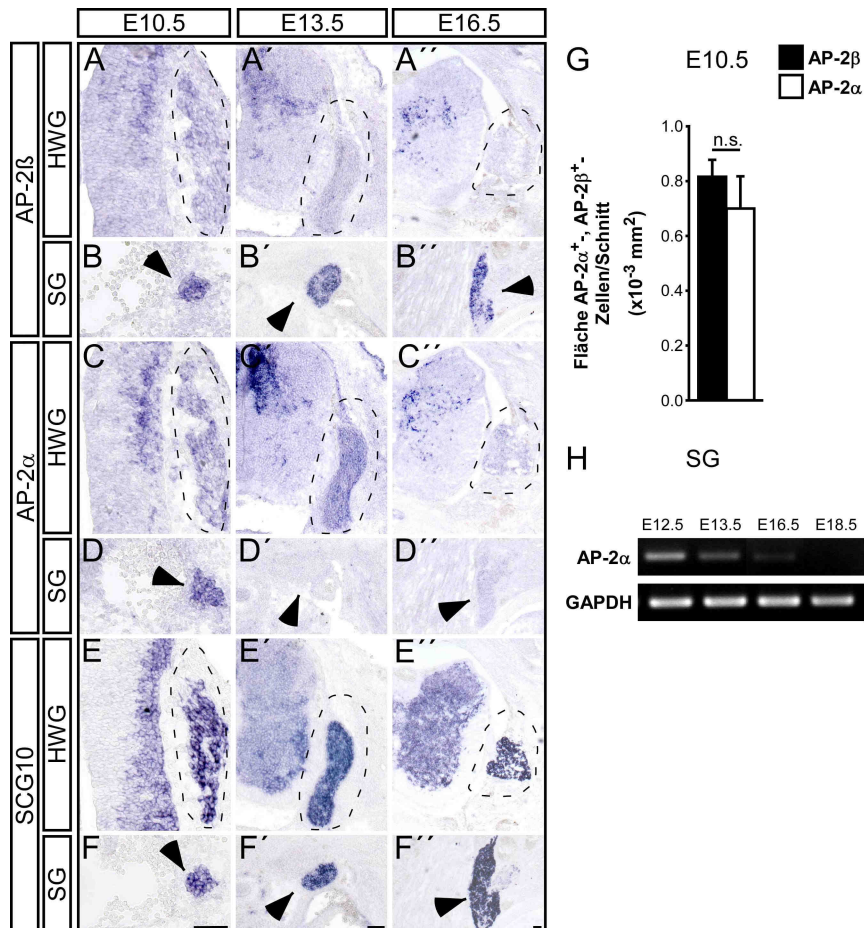


Abb. 3.1: **Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in den sympathischen und sensorischen Ganglien der Maus.** In Parallelschnitten von homozygoten Wildtypmausembryonen ( $n=3$ ) im Rumpfbereich an E 10.5, E 13.5 und E 16.5 wurde die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  durch *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen.

Die SG zeigen eine starke AP-2 $\beta$ -Expression (B, B', B''; schwarze Pfeilspitzen). AP-2 $\alpha$  konnte in den SG nur an E 10.5 detektiert werden (D, D', D''; schwarze Pfeilspitzen). H: Exemplarische Darstellung der RT-PCR-Banden von SG (SCG und Stellarganglien) zweier verschiedener E 12.5, E 13.5, E 16.5 und E 18.5 alten Wildtypmausembryonen. AP-2 $\alpha$  (nach 45 x Zyklen) ist an E 12.5, E 13.5 exprimiert, zusätzlich wurde eine sehr schwache Expression an E 16.5 festgestellt. GAPDH (nach 20 x Zyklen) ist an allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert.

Im HWG sind beide Transkriptionsfaktoren an E 10.5 exprimiert (A, C, gestrichelter Kreis), wobei mit der Sonde gegen die mRNA von AP-2 $\alpha$  ein stärkeres Signal zu beobachten war (C). Die Expression von AP-2 $\alpha$  wird während der Entwicklung herunterreguliert (C', C''), sodass an E 16.5 nur noch wenige Zellen ein AP-2 $\alpha$  Signal zeigten (C''). AP-2 $\beta$  Expression konnte ab E 13.5 nicht mehr detektiert werden (A', A'').

Im Rückenmark sind AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  koexprimiert. Zusätzlich wurde die Expression des neuronalen Markers SCG10 analysiert (E-F''). Die Quantifizierung der Flächen der AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -Expression im SG an E 10.5 (G). SG, sympathische Ganglien; HWG, Hinterwurzelganglion; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu\text{m}$ .

Die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  wurde außerdem durch immunohistologische Verfahren auf Proteinebene analysiert (Abb. 3.2, A-M'). Durch Verwendung einer Mauslinie, in der ein Allel im AP-2 $\alpha$ -Lokus durch ein  $\beta$ -Galaktosidase-kodierendes Konstrukt ( $\beta$ -Gal) ersetzt wurde, kann die Expression von AP-2 $\alpha$  indirekt durch den Nachweis der immunohistologischen *LacZ*-Expression detektiert werden (Brewer et al., 2002). Die Immunfärbung gegen  $\beta$ -Gal zeichnet sich durch eine punktartige Verteilung im Zytoplasma der Zellen aus (Young et al., 2008). Die Expression von AP-2 $\beta$  wurde direkt durch einen Antikörper gegen AP-2 $\beta$  analysiert.

Es konnte sowohl im dorsalen Bereich des Neuralrohrs (Abb. 3.2, B-E), im HWG (Abb. 3.2, F-I) als auch im sympathischen Ganglion (Abb. 3.2, J-M') eine Koexpression von *LacZ* und AP-2 $\beta$  in Zellen dieser neuronalen Gewebe beobachtet werden (Abb. 3.2, weiße Pfeilspitzen). Außerdem zeigte sich, dass im sympathischen Ganglion die Expression beider Gene am stärksten ist.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten *in situ*-Hybridisierungs-Ergebnisse wurden somit auf Proteinebene bestätigt (Abb. 3.2, A-M').

Diese Ergebnisse legen nahe, dass AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  an E 10.5 in Zellen der sympathischen Ganglien koexprimiert werden. Somit gibt es keine unterschiedlichen Subpopulationen von AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -exprimierenden Zellen, zumindest bei diesem Alter.

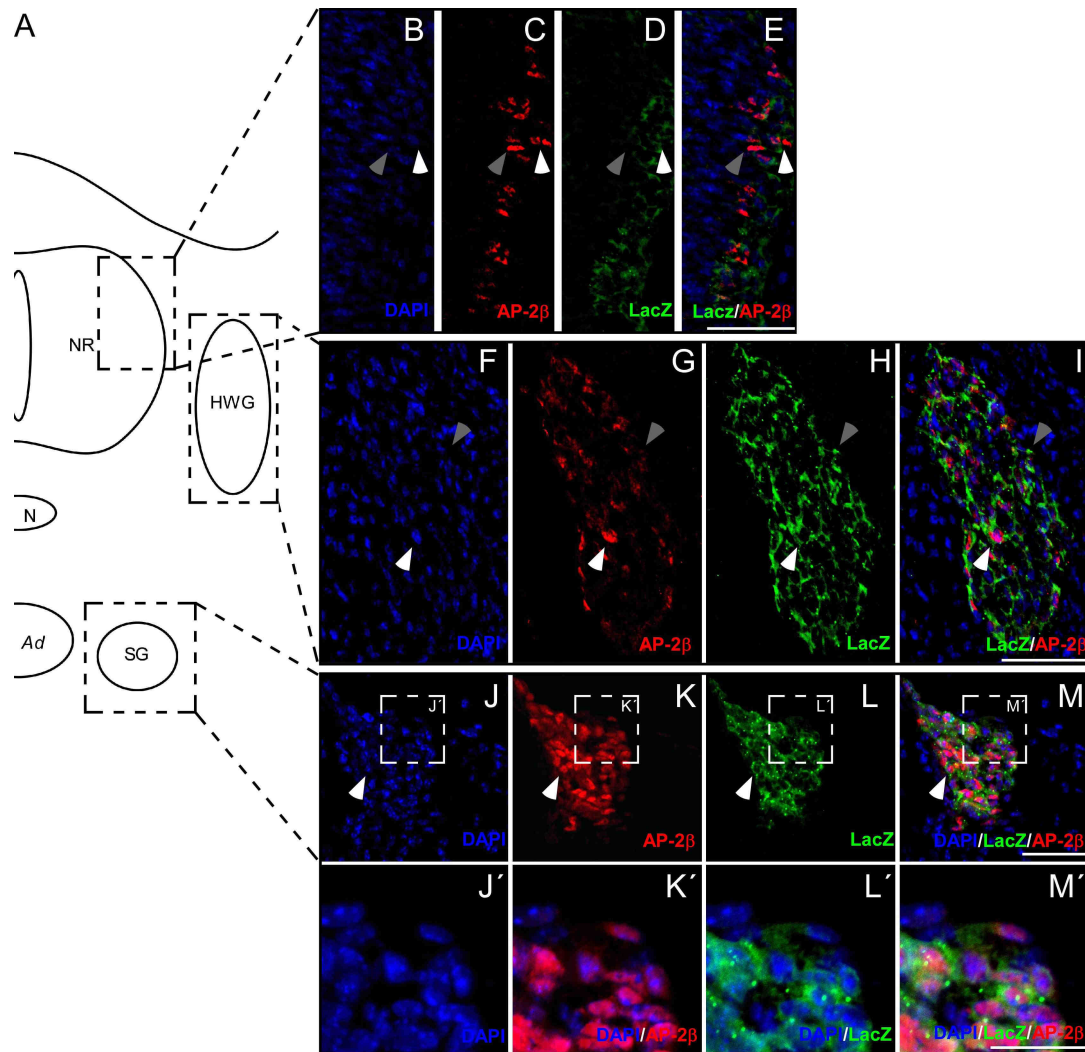


Abb. 3.2: **Expressionsnachweis von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  an E 10.5.** In Parallelschnitten von heterozygoten AP-2<sup>+LacZ</sup>-Mausembryonen (n=2) im Rumpfbereich an E 10.5 wurde die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  auf Proteinebene nachgewiesen. Die Expression von AP-2 $\alpha$  wird indirekt durch *LacZ*-Färbung dargestellt. AP-2 $\beta$  wird durch Immunfärbung nachgewiesen. Die SG zeigen eine starke Koexpression von AP-2 $\alpha$  (*LacZ*) und AP-2 $\beta$  (J-M'; weiße Pfeilspitzen). Im HWG sind beide Transkriptionsfaktoren an E 10.5 mehrheitlich koexprimiert (F-I), wobei ein schwächeres Signal beider Gene zu beobachten war. Im dorsalen Rückenmark sind AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  auch größtenteils koexprimiert (B-E). In beiden Fällen sind vereinzelt Zellen zu sehen, die nur AP-2 $\alpha$  oder AP-2 $\beta$  exprimieren (B-I, graue Pfeile). Das wurde im SG nicht beobachtet. NR, Neuralrohr; N, Notochord; Ad, Aorta dorsalis; SG, sympathisches Ganglion; HWG, Hinterwurzelganglion; Längenstandard 50 $\mu$ m

### 3.2 Analyse der Entwicklung sympathischer Ganglien in der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Doppelnullmutante

Die für die Analyse verwendeten AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -transgenen Mäuse wurden im Labor von T. Williams hergestellt. In der AP-2 $\beta$ -Nullmutante wurde die im Exon 4 liegende Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne entfernt (Moser et al., 1997a). In einer zweiten transgenen Mauslinie wurde im AP-2 $\alpha$ -Allel die für die Dimerisierungs- und Bindedomäne kodierenden Bereiche durch ein für  $\beta$ -Galaktosidase-kodierendes Konstrukt ersetzt.

Durch Verkreuzung von Mäusen, die sowohl heterozygot für die AP-2 $\alpha$ -Mutation als auch für die AP-2 $\beta$ -Mutation sind, wurden Embryonen erhalten, die homozygote Träger des AP-2 $\beta$ -Knockout-Locus und AP-2 $\alpha$ -Knockin-Locus sind, sprich Doppelnullmutanten. Es wurden zwei Zeitpunkte, E 10.5 und E 13.5, für die Analyse der Wirkung der AP-2-Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung sympathischer Ganglien festgelegt (Abb. 3.3, A-K).

Zur Analyse des Entwicklungszustandes soll die Expression von Genen, die die Spezifizierung und Differenzierung sympathischer Neurone charakterisieren, dargestellt und analysiert werden. Durch *in situ*-Nachweis der mRNA des Transkriptionsfaktors Phox2b wird die Population von Zellen dargestellt, die für autonome neuronale Differenzierung spezifiziert ist (Abb. 3.3, C, C', H, H'). Die Expression der für den Syntheseweg des Transmitters Noradrenalin notwendigen Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) definiert die bereits noradrenergen Neurone (Abb.3.3, A, A', F, F', B, B', G, G'). Um die generelle neuronale Differenzierung gegenüber der noradrenergen Transmittereigenschaft zu untersuchen, wurde eine antisense Sonde gegen die mRNA von SCG10 verwendet (Abb. 3.3, D, D', I, I'). Der Embryonaltag 10.5 (Theilerstadium (TS) 17; Theiler, 1989) ist der früheste Zeitpunkt, an dem die sympathischen Ganglien im Rumpfbereich sich ausgebildet haben und die Expression der noradrenergen Zielgene untersucht werden kann. Um die weitere Entwicklung der sympathischen Ganglien zu überprüfen, wurden die Doppelmutanten zusätzlich bei E 13.5 (TS 21 und 22) analysiert.



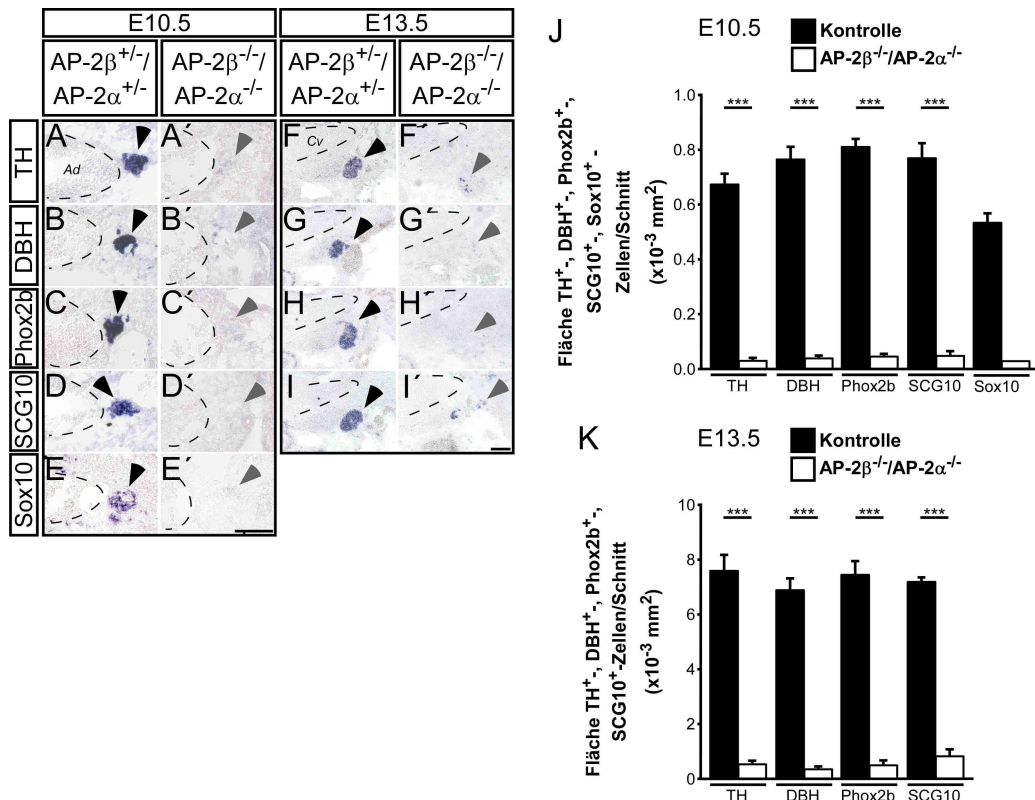


Abb. 3.3: **Analyse der Genexpression in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{-/-}$ -Doppelnullmutante.**

In der Doppelnullmutante ist sowohl die noradrenerge als auch die generelle neuronale Genexpression an E 10.5 und E 13.5 stark betroffen. Die Expression von TH (A, A', F, F'; J, K,  $p < 0,001$ ;  $n=3$ ), DBH (B, B', G, G'; J, K,  $p < 0,001$ ;  $n=3$ ), Phox2b (C, C', H, H'; J, K,  $p < 0,001$ ;  $n=3$ ), SCG10 (D, D', I, I'; J, K,  $p < 0,001$ ;  $n=3$ ) und Sox10 (E, E', J;  $n=1$ ) ist gegenüber der Kontrollen signifikant reduziert. Ad: *Aorta dorsalis*; Cv: *Corpus vertebrae*; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu\text{m}$

Da sich die Morphologie der sympathischen Ganglien in Serienschnitten ändert, wurde das *in situ*-Signal der jeweiligen Sonde über eine große Anzahl von Schnitten (siehe Material und Methoden) quantitativ erfasst und das arithmetische Mittel gebildet.

Die Quantifizierung der homozygoten AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{-/-}$ -Doppelmutanten bei E 10.5 und E 13.5 zeigte, dass gegenüber den genetisch wildtypischen oder heterozygoten Vergleichstieren die Expression von Phox2b $^{+}$ -Zellen bei E 10.5 auf  $7 \pm 1\%$  bzw. bei E 13.5 auf  $7 \pm 2\%$  reduziert war. Der neuronale Marker SCG10 war bei E 10.5 auf  $7 \pm 2\%$  bzw. bei E 13.5 auf  $12 \pm 4\%$  reduziert. Auch die Expression der noradrenergen Marker TH und DBH war in den Doppelnullmutanten bei E 10.5 und E 13.5 stark reduziert. Für TH ergab die Flächenmessung eine Reduktion bei E 10.5 auf  $8 \pm 1\%$  bzw. bei E 13.5 auf  $6 \pm 1\%$  und für DBH bei E 10.5 bzw. E 13.5 auf  $8 \pm 3\%$  bzw.  $4 \pm 1\%$  (Abb. 3.3, J, K). Parallel wurde auch die Expression des Neuralleistenmarkers Sox10 untersucht, der bei E 10.5 in sowohl neuronalen und glialen Vorläuferpopulationen exprimiert ist. Die

Sox10-Expression wurde in der Doppelmutante an E 10.5 ebenfalls beeinflusst und ist im Vergleich zur den Kontrollversuchstieren auf 11% reduziert (Abb. 3.3, E, E', J).

Ein kombinierter Verlust von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  hat somit einen dramatischen Effekt auf die generelle Entwicklung der sympathischen Ganglien. Die zusätzliche Analyse der Doppelmutanten an E 13.5 verdeutlichte, dass es sich bei dem Effekt des AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{-/-}$ -Doppelknockouts nicht um eine Verzögerung der Entwicklung handelt, wie z.B. für den Ascl1-Knockout beschrieben wurde (Pattyn et al., 2006), sondern um eine permanente Reduzierung der Zellzahl.

### **3.3 Analyse der Differenzierung sympathischer Ganglien in der AP-2 $\alpha^{-/-}$ -Nullmutante**

Die Eliminierung von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in der Maus führte zu einer starken Reduzierung der Größe der sympathischen Ganglien. Es zeigte sich, dass sowohl die generelle neuronale als auch die noradrenerge Genexpression im vergleichbaren Ausmaß signifikant reduziert waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  essentiell für die Entwicklung sympathischer Neurone sind. Aber welche Rolle spielt der einzelne Transkriptionsfaktor in der Differenzierung sympathischer Neurone? Beeinflussen sie unterschiedliche Aspekte der Entwicklung oder wirken sie kompensatorisch auf die gleiche Weise? Durch die Analyse der AP-2 $\alpha$ - bzw. AP-2 $\beta$ -Nullmutanten sollte die spezifische Rolle von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in der Differenzierung sympathischer Neurone charakterisiert werden.

Zunächst wurde untersucht, ob in der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante bei E 10.5 die Expression von TH oder DBH im sympathischen Ganglion reduziert ist (Abb. 3.4, A-F'). Die Analyse ergab eine unveränderte Expression von TH und DBH (Abb. 3.4, A-B'). Zusätzlich wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren Phox2b, Gata3 und Hand2 als auch die Expression des neuronalen Markers SCG10 überprüft (Abb. 3.4, C-F'). Es zeigte sich, dass die Expression aller untersuchten Gene sowohl bei E 10.5 als auch bei E 13.5 nicht beeinträchtigt war (Abb. 3.4, A-L'). Somit ist die Größe der sympathischen Ganglien in der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante unverändert (Abb. 3.4, M, N).

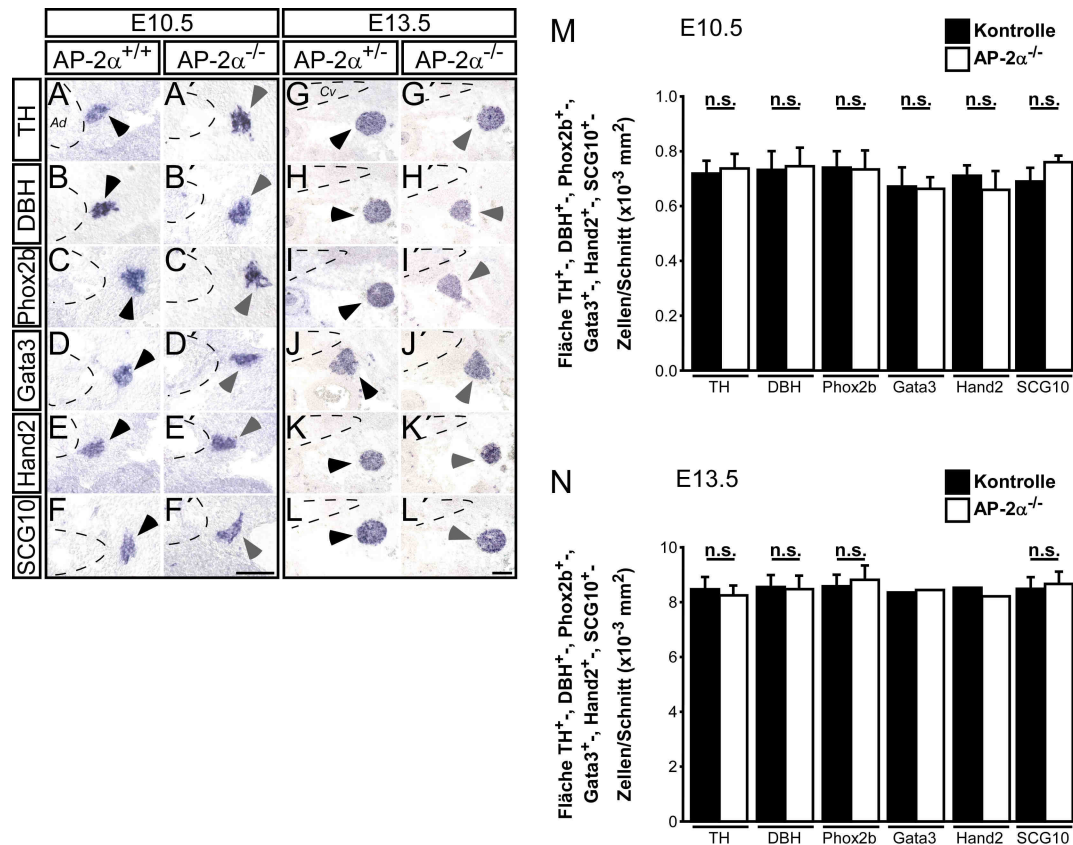


Abb. 3.4: **Untersuchung zur Genexpression und funktionellen Kompensation durch AP-2 $\alpha$  im sympathischen Ganglion der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante.** Die Expression von TH (A, A', G, G'; n=3), DBH (B, B', H, H'; n=3), Phox2b (C, C', I, I'; n=3), Gata3 (D, D', J, J'; E 10.5, n=3; E 13.5, n=1), Hand2 (E, E', K, K'; E 10.5, n=3; E 13.5, n=1) und SCG10 (F, F', L, L'; n=3) ist an E 10.5 und E 13.5 im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Der Vergleich der gemittelten Flächen zeigte kein statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und AP-2 $\alpha$ -Nullmutante (M, N). *Ad*: Aorta dorsalis; *Cv*: Corpus vertebrae; n.s., nicht signifikant; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu$ m

Da der Verlust von AP-2 $\alpha$  keinen Effekt auf die Entwicklung sympathischer Ganglien hat, stellt sich die Frage, ob die Entwicklung noradrenerger Neurone sympathischer Ganglien ausschließlich von AP-2 $\beta$  abhängt. Dies soll durch die Analyse der AP-2 $\beta$ -Nullmutante geklärt werden.

### 3.4 Analyse der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Nullmutante

Die Expression von Transkriptionsfaktoren, noradrenergen und neuronalen Markern wurde durch *in situ*-Hybridisierung auf seriellen Schnitten von Kontrollembryonen und AP-2 $\beta$ -Nullmutanten untersucht. An E 10.5 ist im AP-2 $\beta$ -Knockout die Expression von Phox2b, Gata3, Hand2 und SCG10 reduziert. Der Verlust der Expression von AP-2 $\beta$  führt außerdem zu einer Reduktion der TH- und DBH-Expression (Abb. 3.5, A-F', S; siehe Anhang 7.1 für Detaildaten). Somit zeigte die AP-2 $\beta$ -Nullmutante zusammenfassend eine generelle Reduktion der Größe der sympathischen Ganglien (62±1% der Kontrolle).

Um zu untersuchen, ob die Größe der Ganglien im weiteren Verlauf der Entwicklung zusätzlich abnimmt, wurden sympathische Ganglien bei E 13.5 und E 16.5 in gleicher Weise analysiert (Abb. 3.5, G-R'). Die Quantifizierung ergab an E 13.5 und E 16.5 eine Reduktion der Flächen von TH, DBH, Phox2b, Gata3, Hand2 und SCG10 (Abb. 3.5, T, U; siehe Anhang 7.1 für Detaildaten) im selben Ausmaß wie bei E 10.5 (E 13.5 auf 55±3% bzw. E 16.5 auf 59±2%). Die initial bei E 10.5 beobachtete relative Abnahme der Größe der sympathischen Ganglien in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante bleibt in den untersuchten späteren embryonalen Stadien konstant. Die Gangliengröße nimmt also nach E 10.5 bei der Mutante und im Wildtyp im selben Ausmaß zu (ca. 40x).

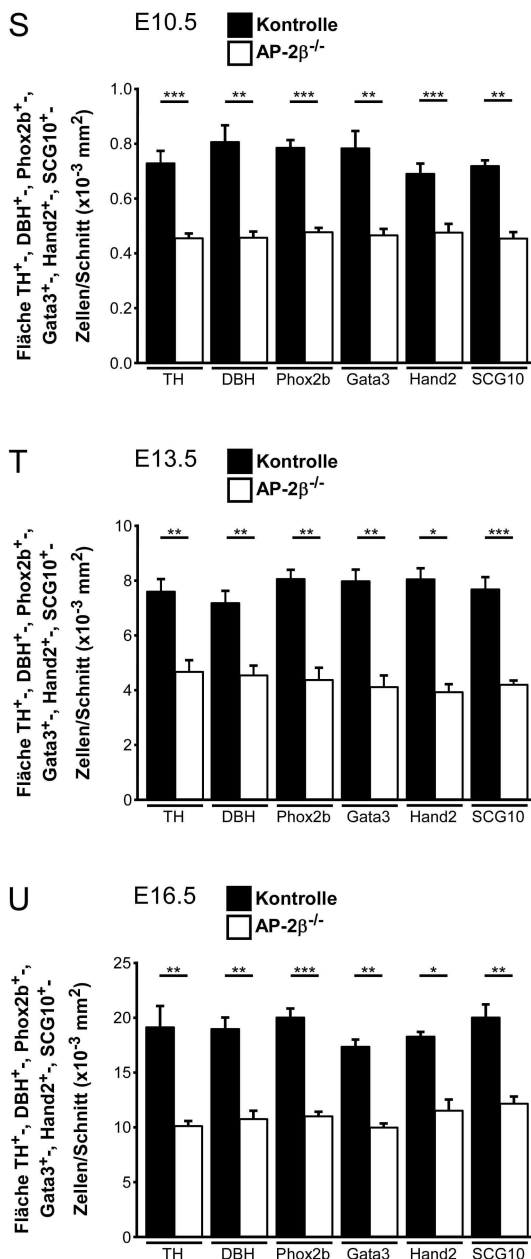
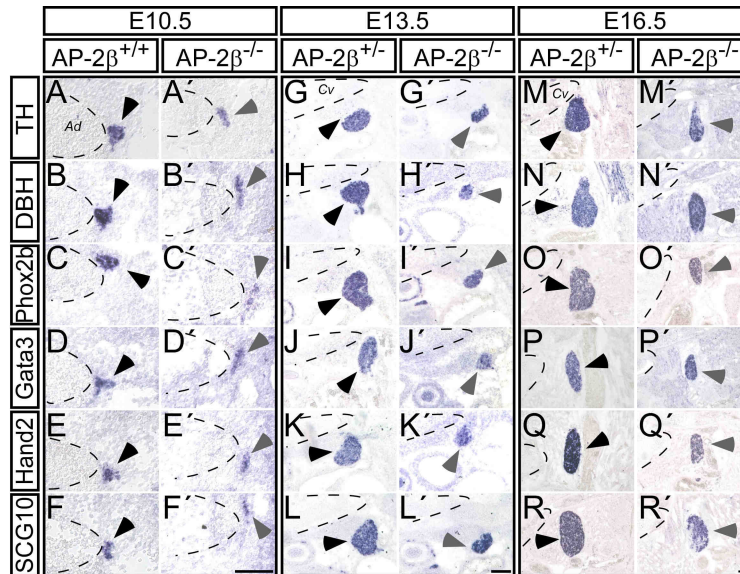


Abb. 3.5: Der Verlust der Expression von AP-2β führt zu einer Reduktion der Größe der sympathischen Ganglien. In 10.5, 13.5 und 16.5 Tagen alten Wildtyp- oder AP-2β<sup>+/-</sup>-heterozygoten-Mäusen sind neuronale (SCG10; F, n=3; L, n=4; R, n=6), autonome (Phox2b: C, n=5; I, n=4; O, n=5; Gata3: D, n=5; J, n=2; P, n=3; Hand2: E, n=5; K, n=2; Q, n=3) und noradrenerge (TH: A, n=5; G, n=4; M, n=5; DBH: B, n=5; H, n=4; N, n=6) Gene in den sympathischen Ganglien (schwarze Pfeilspitzen) exprimiert. In der AP-2β-Nullmutante ist die Fläche der Expression von TH (A', n=3; G', n=4; M', n=3), DBH (B', n=3; H', n=4; N', n=3), Phox2b (C', n=3; I', n=4; O', n=3), Gata3 (D', n=3; J', n=2; P', n=3), Hand2 (E', n=3; K', n=2; Q', n=3) und SCG10 (F', n=3; L', n=3; R', n=4) reduziert (graue Pfeilspitzen). Quantifizierung der Genexpression der AP-2β-Nullmutante im Vergleich mit den Kontrollversuchstieren (S, T, U). Die AP-2β-Nullmutante führte im Vergleich zu Kontrollen zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Population von TH<sup>+</sup>, DBH<sup>+</sup>, Phox2b<sup>+</sup>, Gata3<sup>+</sup>, Hand2<sup>+</sup>- und SCG10<sup>+</sup>-Zellen (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längensstandard 50µm

Es stellt sich die Frage, ob der Verlust von AP-2 $\beta$  ein Effekt auf programmierten Zelltod oder Proliferation zur Folge hat. Durch Proliferation- und TUNEL-Methoden sollte diese Frage beantwortet werden (Abb. 3.6).

Zur Quantifizierung der Proliferation wurde eine Doppel-Immunfärbung von Tuj1 und Ki67 und zusätzlich auf Parallelschnitten eine *in situ*-Hybridisierung gegen die mRNA von Phox2b durchgeführt. Die Anzahl der Ki67<sup>+</sup>- bzw. TUNEL<sup>+</sup>-Zellen wurden in Kontrollen und AP-2 $\beta$ -Nullmutanten auf die Phox2b-Fläche normalisiert (Abb. 3.6).

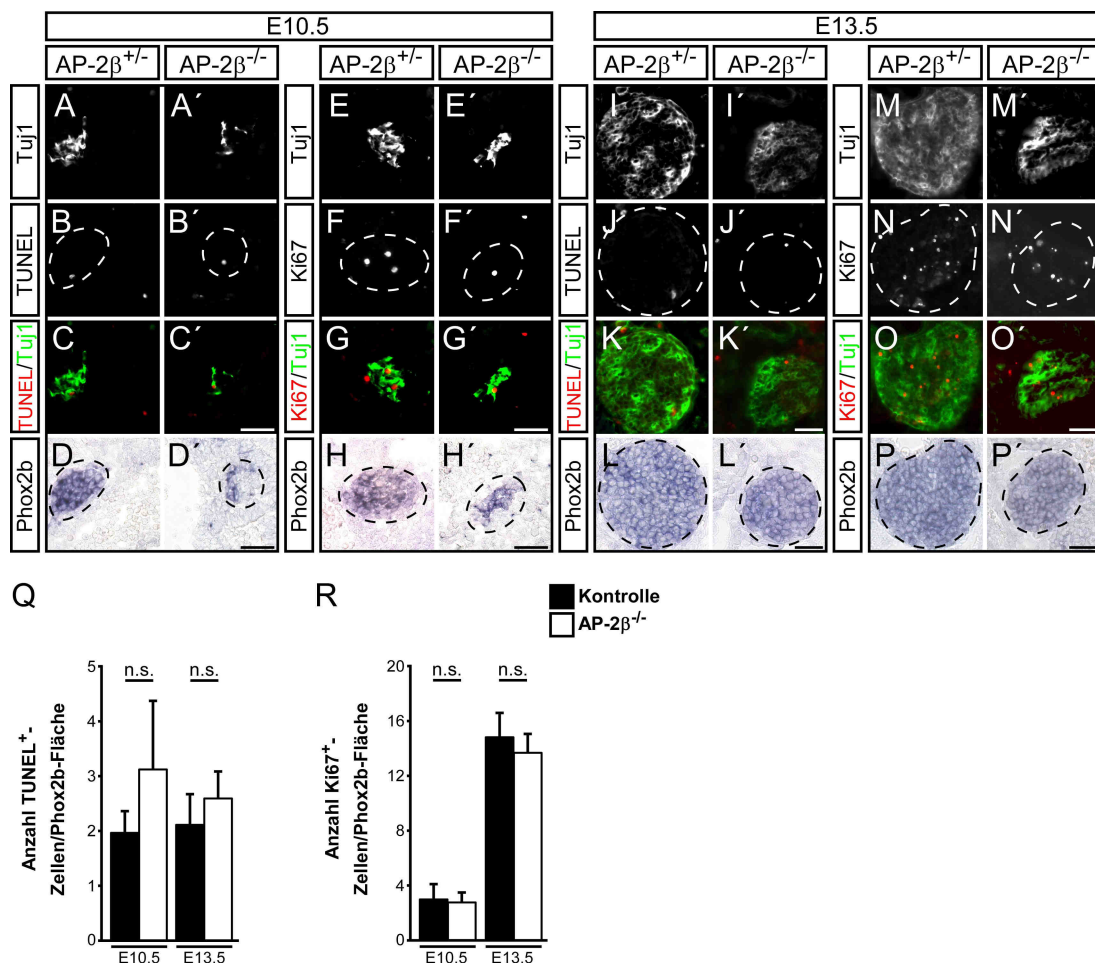


Abb. 3.6: **Proliferation und Zelltod in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante an E 10.5 und E 13.5.** Tuj1- und Phox2b-Expression ist in beiden Stadien in der Nullmutante reduziert (C', G', K', O', D', H', L', P'; n=3). Nach Normalisierung der TUNEL<sup>+</sup>- und Ki67<sup>+</sup>-Zellen der Nullmutante auf die jeweilige Phox2b-Fläche (n=3) wurde keine Veränderung in der Zahl apoptotischer und proliferierender Zellen im AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout festgestellt (Q, R). Die Anzahl der apoptotischen Zellen bleibt zwischen E 10.5 und E 13.5 konstant (Q), wohingegen ein klarer Anstieg von proliferierenden Zellen zu beobachten war (R). n.s., nicht signifikant; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu$ m

Die Ergebnisse der Proliferations- und TUNEL-Analysen zeigen, dass sowohl bei E 10.5 als auch bei E 13.5 der Verlust von AP-2 $\beta$  keinen erhöhten Zelltod oder erniedrigte Proliferation zur Folge hat. Da sowohl Proliferation als auch Zelltod bei E 10.5 und E 13.5 nicht signifikant verändert sind, muss die Entwicklung der sympathischen Ganglien bereits zu einem früheren Zeitpunkt gestört sein und auf diese Weise zum Zellverlust im AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Ganglien führen.

Die in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante erzielten Ergebnisse ergaben somit keinen Phänotyp, der der Doppelmutante vergleichbar ist. Dies kann darauf beruhen, dass AP-2 $\beta$  teilweise durch AP-2 $\alpha$  kompensiert wird. Um die Rolle von AP-2 $\alpha$  im Kontext der AP-2 $\beta$ -Nullmutante zu klären, wurde AP-2 $\alpha$  konditionell im AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-genetischen Hintergrund ausgeschaltet.

### **3.5 Die Funktion von AP-2 $\alpha$ in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-sympathischen Neuronen: Analyse der Differenzierung, Proliferation und Überleben**

Zunächst wurde die Frage untersucht, ob die zusätzliche Eliminierung von AP-2 $\alpha$  in noradrenergen, DBH-exprimierenden AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Neuronen zu einer weiteren Reduzierung der Gangliengröße führt, ähnlich wie im Doppelknockout. Hierfür wurde eine Cre-Rekombinase verwendet, deren Expression durch die Aktivierung des DBH-Promotors gewährleistet ist. Nach Induktion der Expression der Cre-Rekombinase wird der Bereich zwischen den LoxP-Nukleotidsequenzen deletiert und somit Exon 5 und 6 des AP-2 $\alpha$ -Gens entfernt. Dadurch wird kein funktionelles AP-2 $\alpha$ -Protein translatiert. Die DBHCre-Expression startet an E 10.5. Am Beispiel der konditionellen Gata3<sup>DBHCre</sup>-Nullmutante konnte gezeigt werden, dass die ersten Effekte eines DBHCre-medierten Knockouts an E 11.5 auftreten und bei E 13.5 eine Art von Plateau erreicht wird (Tsarovina et al, 2010).

Die Analyse der konditionellen AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Nullmutante wurde an E 13.5 und E 16.5 durchgeführt. Zunächst wurde die Aktivität der Cre-Rekombinase und somit das erfolgreiche Ausschneiden von Exon 5 und 6 überprüft. Zu diesem Zweck wurden AP-2 $\beta$ <sup>+/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Mäuse gezüchtet und analysiert. Um die Aktivität der DBHCre-Rekombinase nachzuweisen, wurden sympathische Ganglien des SCG

aus 90 Tage alten Mäusen präpariert. Das SCG besteht aus Gliazellen und DBH-exprimierenden sympathischen Neuronen. Als Kontrolle wurde die Schwanzspitze der jeweiligen Maus verwendet in der kein DBH exprimiert wird.

Das Flox Allel (560 Basenpaare), das rekombinante deletierte (del) Allel (185 Basenpaare) und das *DBHCre*-Gen wurden durch PCR nachgewiesen (Abb. 3.7).

Es zeigte sich, dass in  $AP-2\beta^{+/-}/AP-2\alpha^{fl/fl}$ -*DBHCre*<sup>+</sup>-Mäusen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des DBH-Promotors aktiv ist, und ein rekombinantes deletiertes *AP-2 $\alpha$* -Allel produziert (185 Basenpaare). Es ist anzunehmen, dass die nicht deletierten Allele von DBH-negativen Gliazellen verursacht werden. In DBH-negativen Gewebe (Mausschwanz) kommt es nicht zur Eliminierung von Exon 5 und 6 im *AP-2 $\alpha$* -Allel.

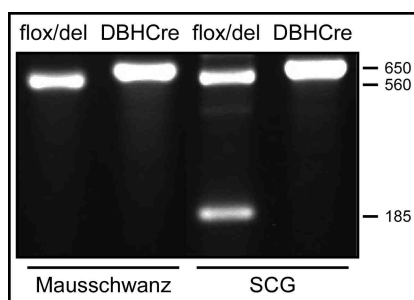


Abb. 3.7: **Konditioneller Knockout von *AP-2 $\alpha$*  im SCG unter Verwendung der *DBHCre*.** Aus adulten Mäusen (P90) wurde sowohl das SCG als auch die Mausschwanzspitze präpariert und lysiert. Durch PCR sollte nachgewiesen werden, dass die *DBHCre*-Rekombinase im *AP-2 $\alpha$* -Lokus ein deletiertes Allel produziert. Mit dem Nachweis des 185 Basenpaar großen Fragments wurde der Beweis erbracht, dass eine Eliminierung von Exon 5 und 6 im *AP-2 $\alpha$* -Gen stattgefunden hat. Das 560 Basenpaar große Fragment deutet daraufhin, dass sich neben DBH-exprimierenden Neuronen auch Gliazellen im SCG befinden, die kein deletiertes *AP-2 $\alpha$* -Allel tragen. Die PCR auf die DNA der Mausschwanzspitze dient als Negativkontrolle, da dort keine DBH-exprimierenden Neurone angesiedelt sind.

Die Analyse der sympathischen Ganglien der  $AP-2\beta^{-/-}/AP-2\alpha^{fl/fl}$ -*DBHCre*<sup>+</sup>-Mäuse erfolgte durch *in situ*-Hybridisierung, um die Expression von *Phox2b*, *Gata3*, *Hand2*, *SCG10*, *TH* und *DBH* an E 13.5 und E 16.5 nachzuweisen (Abb. 3.8, A-L'). Die Analyse der Flächen ergab eine gleichmäßige Reduktion für alle untersuchten Gene bei E 13.5 und E 16.5 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.8, M, N; siehe Anhang 7.2 für Detaildaten). Somit ist die Größe der sympathischen Ganglien in der konditionellen Doppelmutante bei E 13.5 auf  $67\pm 2\%$  reduziert. Dies entspricht der Situation in der *AP-2 $\beta$* -Nullmutante bei E 13.5.



Um auszuschließen, dass das Resultat nur deshalb die Effekte des AP-2 $\beta$ -Knockouts darstellt, weil die DBHCre-Rekombinase zu diesem Zeitpunkt nur einen Teil der Allele eliminiert hat, wurde die Analyse zusätzlich bei E 16.5 durchgeführt. Es zeigte sich im Vergleich zu E 13.5, dass sowohl die noradrenerge als auch die generelle neuronale Genexpression an E 16.5 stärker reduziert war (Abb. 3.8, N; siehe Anhang 7.2 für Detaildaten). Die Größe der Ganglien betrug bei E 16.5 nur noch 36 $\pm$ 1% der Kontrollen und war damit deutlich kleiner als die Ganglien in E 16.5 AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tieren.

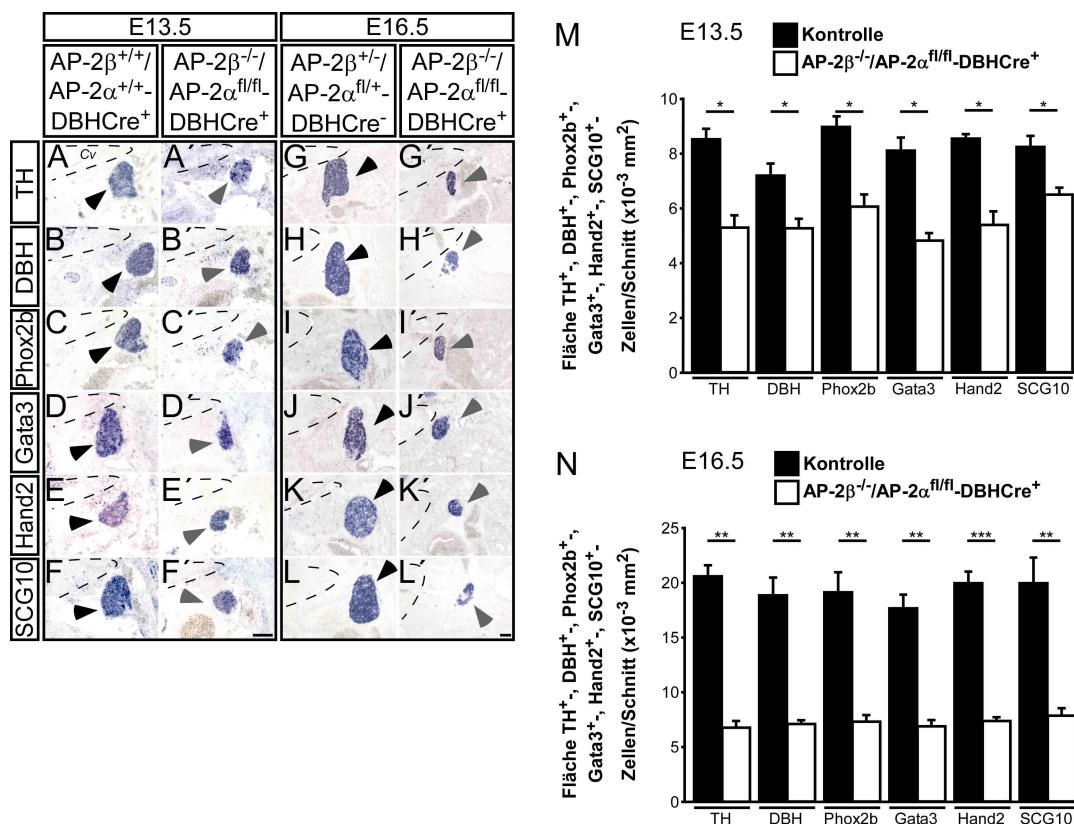


Abb. 3.8: **Die generelle neuronale und noradrenerge Genexpression in der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Mutante an E 13.5 und E 16.5.** In der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Mutante ist im Vergleich zu den Kontrollembryonen die Größe der sympathischen Ganglien reduziert. Bei E 13.5 ist die Größenreduktion in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>- und AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Tieren vergleichbar. An E 16.5 zeigt sich jedoch zum Einen, dass die Größenreduktion im Vergleich zu E 13.5 signifikant ansteigt und zum Anderen, dass eine stärkere Reduktion im Vergleich zum AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout bei E 16.5 auftrat. E 13.5: Kontrollen und Mutanten, TH, DBH, Phox2b, SCG10, n=3, Hand2, Gata3, n=2; E 16.5: Kontrollen, n=3; Mutanten, n=4; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu$ m

Der konditionelle AP-2 $\alpha$ -Knockout im Kontext der AP-2 $\beta$ -Nullmutante zeigt somit eine zellautonome Funktion von AP-2 $\alpha$  in differenzierten sympathischen Neuronen. Es stellen sich jedoch verschiedene Fragen zum Wirkungsmechanismus: Worauf beruht der verzögerte Effekt der Eliminierung von AP-2 $\alpha$ , der erst bei E 16.5 zu einer verringerten Zellzahl führt? Welche Funktion hat AP-2 $\alpha$  in differenzierten sympathischen Neuronen?

Da in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante kein Effekt bei E 10.5 und E 13.5 auf die Proliferation und Zelltod beobachtet wurde, kann es durchaus sein, dass der zusätzliche Verlust von AP-2 $\alpha$  im AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout zu Zelltod oder veränderter Proliferation führt.

Es wurde für diese Analyse E 14.5 ausgewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt noch proliferierende Zellen im sympathischen Ganglien befinden (Potzner et al., 2009). Zunächst wurde eine *in situ*-Hybridisierung gegen Phox2b durchgeführt. Die Analyse ergab, dass bei E 14.5 die Fläche von Phox2b auf 46 $\pm$ 3% reduziert war und somit im Vergleich zu den Phox2b-Flächen im AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout bei E 13.5 und E 16.5 stärker reduziert war. Der Verlust von AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ -negativen noradrenergen Neuronen zeigt also zwischen E 13.5 und E 14.5 erste Effekte. Dies wird durch die eigene Expressionanalyse unterstützt, die zeigt, dass Transkripte von AP-2 $\alpha$  bei E 13.5 in sympathischen Neuronen vorhanden sind. Die E 14.5 AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Mutante wurde durch Immunfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 und die TUNEL-Methode analysiert und zeigte, dass sich zwar die Zahl proliferierender Zellen nicht signifikant verändert, aber ein signifikanter Anstieg in der Anzahl von apoptotischen Zellen stattfindet (Abb. 3.9).

Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob der verzögerte Effekt durch eine ineffiziente Eliminierung von AP-2 $\alpha$  durch die DBHCre zustande kommt.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass AP-2 $\alpha$  eine späte Funktion im Überleben DBH-exprimierender differenzierter AP-2 $\beta$ -negativer sympathischer Neurone hat. Der Verlust von AP-2 $\alpha$  verstärkt somit den Effekt der AP-2 $\beta$ -Nullmutante.

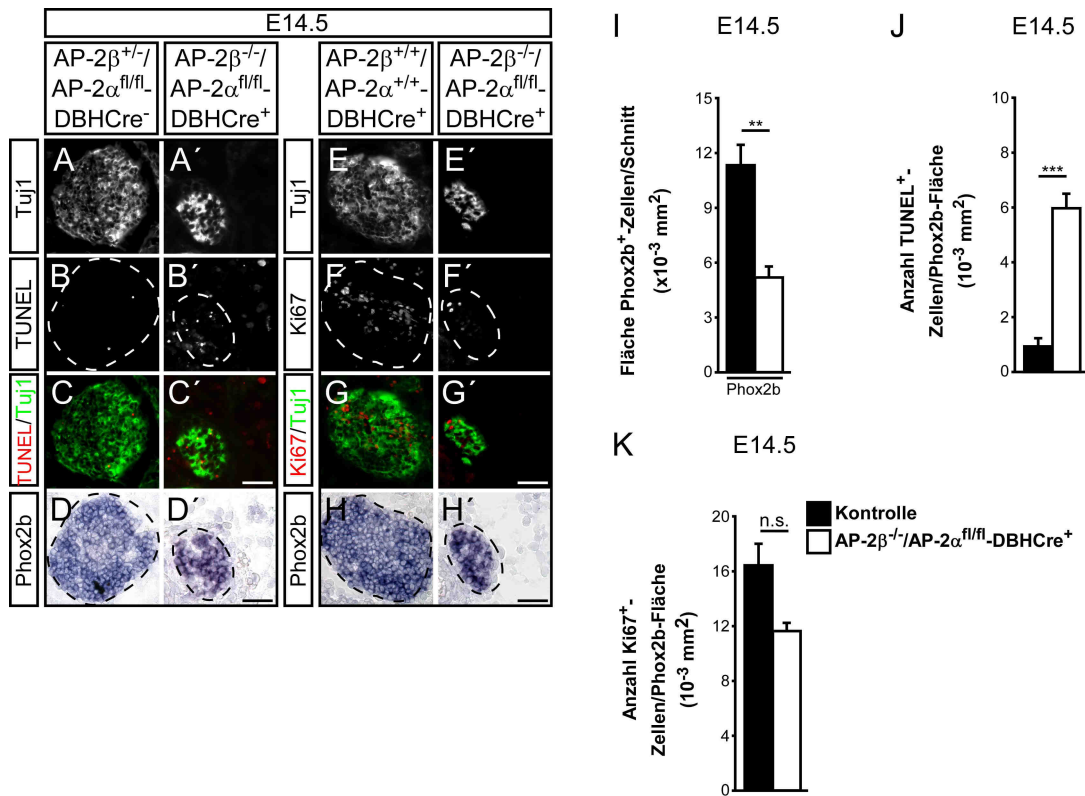


Abb. 3.9: **Zelltod und Proliferation in der AP-2β<sup>-/-</sup>/AP-2α<sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Mutante.** Die Anzahl der apoptotischen bzw. proliferierenden Zellen im sympathischen Ganglion wurde durch TUNEL und Immunohistochemie mit einem Antikörper gegen Ki67 durchgeführt. Die TUNEL<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup>-Zellen wurden auf die Fläche der Phox2b<sup>+</sup>-Zellen bezogen. Die *in situ*-Hybridisierung von Phox2b wurde auf parallelen Serienschnitten durchgeführt (D, D', H, H', gestrichelter Kreis). An E 14.5 ist das Ganglion in der AP-2β<sup>-/-</sup>/AP-2α<sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Mutante im Vergleich zu Kontrolle verkleinert. Die Quantifizierung ist in I dargestellt (n=3). Nach Normalisierung auf die Phox2b-Flächen zeigte sich, dass an E 14.5 die Anzahl der TUNEL<sup>+</sup>-Zellen im verkleinerten Ganglion der AP-2β<sup>-/-</sup>/AP-2α<sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Mutante erhöht ist (A-C', gestrichelter Kreis). Die Anzahl der Ki67<sup>+</sup>-Zellen ist reduziert (E-G', gestrichelter Kreis). Die Quantifizierung ist in J und K dargestellt (n=3; n.s., nicht signifikant). \* = p ≤ 0,05, \*\* = p ≤ 0,01, \*\*\* = p ≤ 0,001; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50µm

### 3.6 Die Funktion von AP-2 $\alpha$ in AP-2 $\beta^{-/-}$ -sympathischen Vorläuferzellen/Neuroblasten: Analyse der Differenzierung, Proliferation und Überleben

Um die Rolle von AP-2 $\alpha$  in der frühen Entwicklung sympathischer Neurone zu untersuchen, sollte AP-2 $\alpha$  im Kontext des AP-2 $\beta^{-/-}$ -Knockouts zu einem möglichst frühen Zeitpunkt eliminiert werden. Die initiale Differenzierung der sympathoadrenalen Zellen wird durch ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert, welches aus den Transkriptionsfaktoren *Ascl1*, *Phox2b*, *Hand2*, *Insm1* und *Gata2/3* besteht und durch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) induziert wird (Goridis und Rohrer, 2002). Das proneurale *Ascl1*-Gen wird als erstes sympathoadrenerges Gen in den Vorläuferzellen der peripheren Ganglien induziert.

Die Verwendung eines Modells in dem die Expression der Cre-Rekombinase durch den Promoter von *Ascl1* kontrolliert wird, erlaubt die konditionelle Eliminierung von AP-2 $\alpha$  zu dem frühest möglichen Zeitpunkt der Entwicklung sympathischer Neurone. Es konnte erfolgreich die Aktivität der *Ascl1Cre*-Rekombinase nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Eliminierung der beiden Exons 5 und 6 im AP-2 $\alpha$ -Allel gezeigt (Abb. 3.10). Die unvollständige Deletion kann dadurch erklärt werden, dass Exon 5 und 6 des AP-2 $\alpha$ -Allels in *Ascl1*-negativen Gliazellen des Ganglions nicht ausgeschnitten wurden.

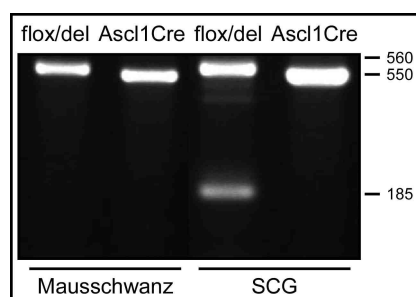


Abb. 3.10: **Konditioneller Knockout von AP-2 $\alpha$  im SCG unter Verwendung der *Ascl1Cre*.** Aus adulten Mäusen (P90) wurde sowohl das SCG als auch die Mausschwanzspitze präpariert und lysiert. Durch PCR wurde nachgewiesen, dass die *Ascl1Cre*-Rekombinase im AP-2 $\alpha$ -Lokus ein deletiertes Allel produziert (185 Basenpaar großes Fragment). Ebenfalls deutet das 560 Basenpaar große Fragment daraufhin, dass sich neben sympathischen Neuronen auch Gliazellen im SCG befinden, die kein deletiertes AP-2 $\alpha$ -Allel tragen. Die PCR auf die DNA der Mausschwanzspitze dient als Negativkontrolle (n=3).

Die Analyse der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -Ascl1Cre $^{+}$ -Embryonen an E 10.5 ergab, dass die Expression von TH, DBH, Hand2, Gata3, Phox2b und SCG10 im Vergleich zu den Kontrollen reduziert war (Abb. 3.11, A-F', M; siehe Anhang 7.3 für Detaildaten). Der Verlust des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ -defizienten Mausembryonen führte somit zu einer Reduktion aller untersuchten Gene auf 63 $\pm$ 3%. Da dies dem Effekt der AP-2 $\beta$ -Nullmutante bei E 10.5 entspricht, führt also die zusätzliche Eliminierung von AP-2 $\alpha$  zu keiner Verstärkung des Phänotyps.

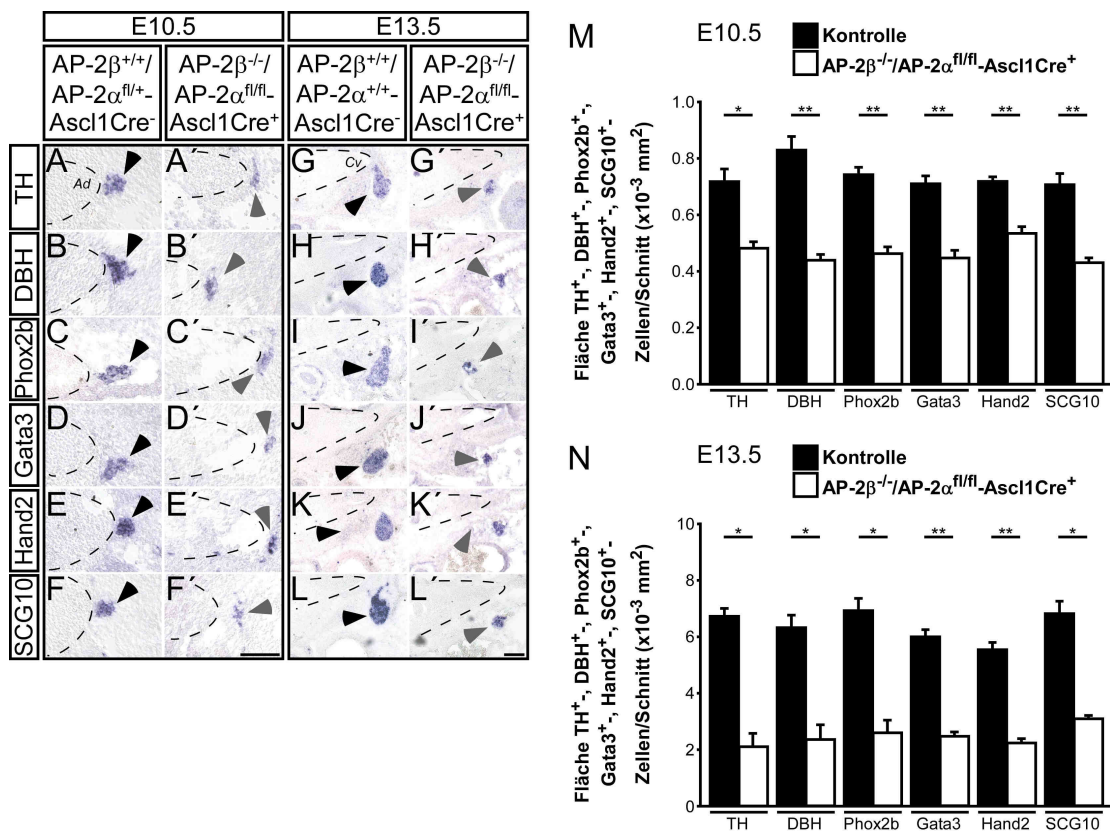


Abb. 3.11: Die generelle neuronale und noradrenerge Genexpression in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -Ascl1Cre $^{+}$ -Mutante an E 10.5 und E 13.5. In der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -Ascl1Cre $^{+}$ -Mutante ist im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A-L, schwarze und graue Pfeile) eine generelle Reduktion in der Größe der sympathischen Ganglien an E 10.5 und E 13.5 festgestellt worden. An E 10.5 wurde kein Unterschied zwischen den AP-2 $\beta^{-/-}$ - und AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -Ascl1Cre $^{+}$ -Mutanten beobachtet (A-F', M, graue Pfeile). Im Stadium E 13.5 zeigte sich jedoch, dass sowohl die noradrenerge als auch die generelle neuronale Genexpression in den Mutanten stärker reduziert war. E 10.5: M; TH ( $p \leq 0,05$ ); DBH, Phox2b, SCG10, Gata3, Hand2, ( $p \leq 0,01$ ),  $n=3$ ; E 13.5: N; TH, DBH, Phox2b, SCG10 ( $p \leq 0,05$ ); Gata3, Hand2, ( $p \leq 0,01$ ),  $n=3$ ; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu\text{m}$

Dagegen wurde bei E 13.5 eine im Vergleich zum AP-2 $\beta^{-/-}$ -Knockout (Abb. 3.5) deutlich verringerte Gangliengröße von 34 $\pm$ 1% der Kontrolle beobachtet (Abb. 3.11, G-L, N, siehe Anhang 7.3 für Detaildaten).

Durch die TUNEL-Analyse konnte zudem gezeigt werden, dass in den Ganglien der konditionellen Nullmutante bei E 13.5 im Vergleich zur Kontrolle und dem AP-2 $\beta$ -Knockout der Anteil apoptotischer Zellen ansteigt (Abb. 3.12, A-C', I). Die frühest mögliche konditionelle Eliminierung von AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ -negativen Neuronen zeigt somit, im Gegensatz zum AP-2 $\beta^{-/-}$ -Knockout einen Effekt auf das Überleben sympathischer Neurone. Zusätzlich demonstrierten die Resultate aus der Immunfärbung gegen Ki67, dass auch weniger Zellen im Ganglion der konditionellen Nullmutante bei E 13.5 proliferieren (Abb. 3.12, E-G', J). Dieses Resultat stellt somit einen zusätzlichen wesentlichen Unterschied zur AP-2 $\beta$ -defizienten Nullmutante dar, die keine Proliferationseffekte bei E 13.5 zeigte.

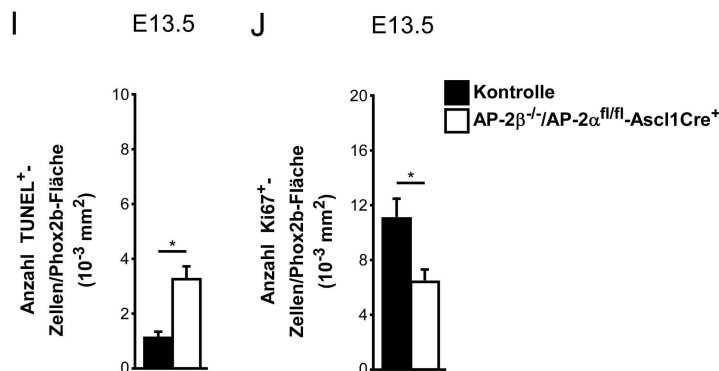
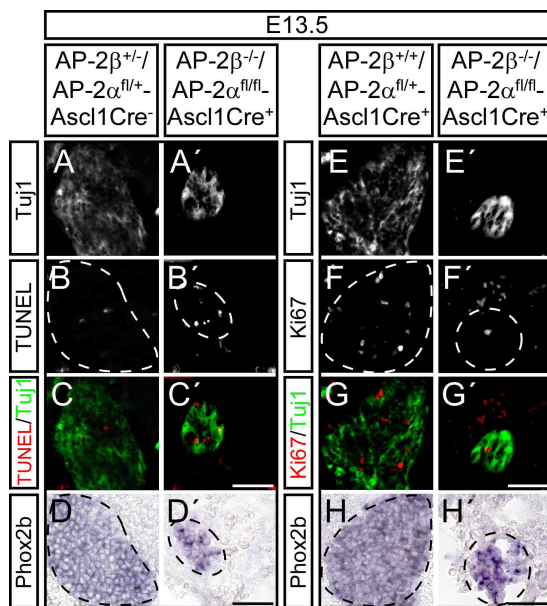


Abb. 3.12: **Zelltod und Proliferation in der AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ -Ascl1Cre<sup>+</sup>-Mutante an E 13.5.** Phox2b- und Tuj1-Expression sind in der konditionellen Nullmutante reduziert (A, A', C, C', D, D', E, E', G, G', H, H'). Die TUNEL-Färbung zeigt einen Anstieg von apoptotischen Zellen (B, B', gestrichelter Kreis). Die Quantifizierung verdeutlichte eine singifikant erhöhte Apoptose in der Mutante (I, p $\leq$ 0,05, n=3). Die Immunfärbung von Ki67 im sympathischen Ganglion ergab eine reduzierte Anzahl von proliferierenden Zellen (G, G', gestrichelter Kreis; J, p $\leq$ 0,05, n=3). Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu$ m

Die Resultate der beiden konditionellen AP-2 $\alpha$ -Knockouts in der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Mutante zeigen deutlich, dass sich der Effekt auf die generelle Entwicklung der sympathischen Ganglien gegenüber dem AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout verstärkt. AP-2 $\alpha$  kontrolliert Überleben und Proliferation in AP-2 $\beta$ -negativen sympathischen Neuronen sowohl während der frühen als auch späten Entwicklung sympathischer Neurone.

Es stellen sich die Fragen, warum es in den beiden konditionellen Doppelnulmutanten zu einem verzögerten Effekt kommt und weshalb durch die zusätzlich Eliminierung von AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ -negativen noradrenergen sympathischen Neuronen nicht ein der Doppelmutante vergleichbarer Phänotyp erzielt wird? Eine naheliegende Erklärung ist, dass eine geringe Cre-Aktivität zu einer verzögerten Eliminierung von AP-2 $\alpha$  führt.

### **3.7 Die Expression von AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in Vorläuferzellen der Neuralleiste**

Die Analyse der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -Doppelmutante in der Maus zeigte, dass die gemeinsame Funktion von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  für die Differenzierung sympathischer Neurone *in vivo* essentiell ist. Die Analyse des AP-2 $\beta$ -Knockouts ergab dagegen nur eine Reduktion in der Größe der sympathischen Ganglien um etwa 40%. Da dieser Effekt bereits bei E 10.5 vorhanden war, kann davon ausgegangen werden, dass AP-2 $\beta$  bereits zu einem frühen Zeitpunkt für die Entwicklung der Vorläuferzellen sympathischer Neuronen erforderlich ist.

Um die Rolle von AP-2 $\beta$  in Vorläuferzellen der Neuralleiste zu charakterisieren sollte zunächst die Expression analysiert werden. Die Vorläuferzellen der Neuralleiste sind durch eine Expression von Sox10 gekennzeichnet (Southard-Smith et al., 1998). Durch frühere Studien in der Maus wurde gezeigt, dass AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  bei E 8 in der Neuralfalte und ab E 10 im PNS exprimiert werden (Moser et al., 1997b; Mitchel et al., 1991; Brewer et al., 2004). Jedoch wurden für diese Analysen hauptsächlich „Whole-Mount“-Färbungen durchgeführt, die keine genaue Aussage über die Expression beider Gene während der Wanderung von Neuralleistenzellen (NLZ) im Rumpfbereich zulassen. Es gibt vor allem keine Daten darüber, welcher Anteil der Sox10-positiven NLZ AP-2 $\alpha$ <sup>+</sup> und/oder AP-2 $\beta$ <sup>+</sup> ist.

In E9.5 Wildtyp-Mäusen wurde auf Parallelschnitten durch *in situ*-Hybridisierungen die Expression von AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und Sox10 nachgewiesen (Abb. 3.13, A-C').

Diese Resultate zeigen, dass AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$  in wandernden NLZ exprimiert werden. Zu dem untersuchten Zeitpunkt ist AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in  $58\pm 9\%$  und  $34\pm 8\%$  der NLZ nachzuweisen (Abb. 3.13, D).

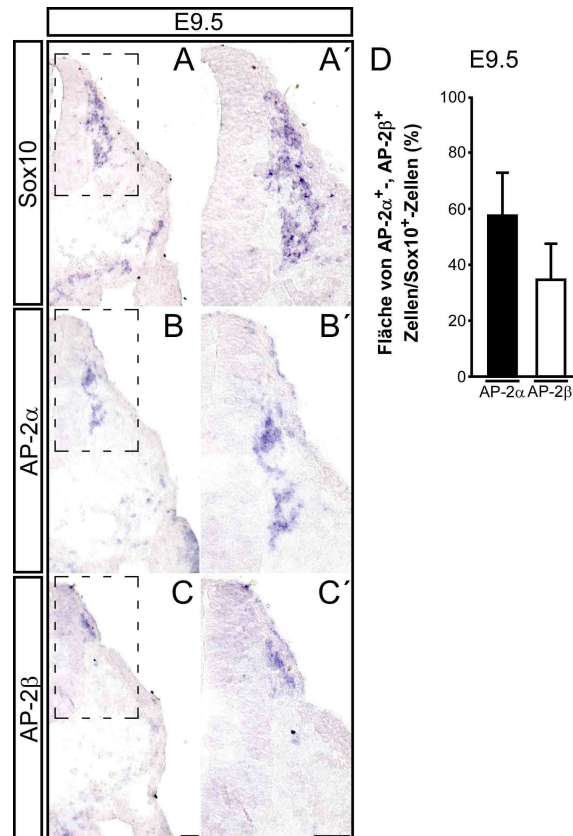


Abb. 3.13: **Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in Neuralleistenzellen.** Auf parallelen Gewebequerschnitte des Rumpfes von E 9.5 Mausembryonen wurde die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  durch *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen (B, B', C, C'). Durch die *in situ*-Hybridisierung gegen Sox10 wurden die migrierenden NLZ lokalisiert (A, A'). Der Bereich der Ausschnittsvergrößerung (A') ist in A durch ein gestricheltes Rechteck dargestellt. Quantifizierung (D): AP-2 $\alpha$ <sup>+</sup>- und AP-2 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen stellen  $58\pm 9\%$  bzw.  $35\pm 8\%$  der Sox10<sup>+</sup>-Zellen dar (n=3). Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu$ m



### **3.8 Die Rolle von AP-2 $\beta$ und AP-2 $\alpha$ in Vorläuferzellen der Neuralleiste**

#### **3.8.1 Der Verlust von AP-2 $\beta$ führt zum Zelltod einer Subpopulation von Sox10<sup>+</sup>-Neuralleistenzellen**

Die Eliminierung beider Transkriptionsfaktoren in der Doppelnullmutante führte zu einem fast vollständigen Verlust der sympathischen Ganglien. Die Eliminierung von AP-2 $\beta$  resultierte dagegen in einem schwächeren Phänotyp. Sowohl in der Doppelnullmutante als auch in der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Nullmutante war die Größe der initialen sympathischen Ganglien bereits bei E 10.5 reduziert. Deshalb wurden Effekte der Eliminierung von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  auf wandernde Neuralleistenzellen (NLZ) untersucht, d.h. frühe Effekte vor der Ausbildung der sympathischen Ganglien.

Die wandernden NLZ wurden durch die angefärbte Fläche der Sox10-Sonde in aufeinanderfolgenden Schnittenserien quantitativ erfasst und gemittelt. Die Analyse durch die TUNEL-Methode ergab eine signifikante, 3.7fache Erhöhung der apoptotischen Zellen in dem Gebiet, in dem sich die migrierenden NLZ befinden (Abb 3.14, P). Es zeigte sich bei E 9.5 jedoch keine signifikante Veränderung in der Fläche Sox10-positiver NLZ (Abb. 3.14, A, B, O). Die unveränderte Anzahl Sox10<sup>+</sup>-Zellen in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante kann damit erklärt werden, dass nur eine kleine Subpopulation von Neuralleistenvorläuferzellen betroffen ist (siehe Abb. 3.13), oder dass die TUNEL<sup>+</sup>-Zellen noch ein Sox10-Signal in der *in situ*-Hybridisierung verursachen. Interessanterweise sind die apoptotischen Zellen in einem dorsalen Bereich lokalisiert, sodass der Zelltod kurz nach der Delamination der NLZ eintritt. Dagegen wurden in der Nähe der dorsalen Aorta kein Anstieg TUNEL<sup>+</sup>-Zellen in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante beobachtet (Abb 3.14, F, G, H, L, M, N).

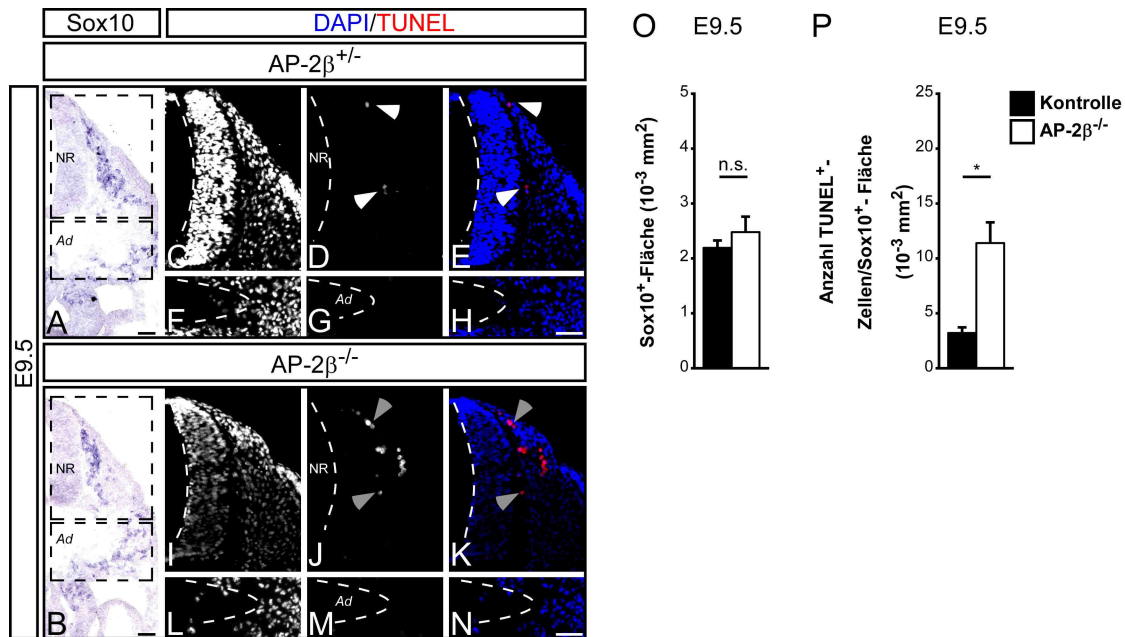


Abb. 3.14: **Zelltod von Sox10<sup>+</sup>-Neuralleistenzellen im AP-2 $\beta^{-/-}$ -Knockout.** Auf parallelen Querschnitten des Rumpfes von E 9.5 alten AP-2 $\beta$ -Nullmutanten und AP-2 $\beta$  wildtypischen oder heterozygoten Mausembryonen wurde die Expression von Sox10 (A, B) durch *in situ*-Hybridisierung und Zelltod durch TUNEL nachgewiesen (Kontrolle: C-H, weiße Pfeile; Mutante: I-N, graue Pfeile). Die Zellkerne sind durch DAPI-Färbung dargestellt (C, E, F, H, I, K, L, N). Der Bereich der Ausschnittsvergrößerungen (C-H bzw. I-N) ist in A bzw. B durch ein gestricheltes Rechteck dargestellt. Die Quantifizierung der Fläche des *in situ*-Hybridisierungssignal von Sox10 wird in O gezeigt (n.s., nicht signifikant, n=3). Die Quantifizierung von TUNEL<sup>+</sup>-Zellen ist in P dargestellt und zeigt einen signifikanten Anstieg von sterbenden Zellen. In der Mutante liegt die Zahl der TUNEL<sup>+</sup>-Zellen bei  $11 \pm 2$  und in den Kontrollen bei  $3 \pm 1$  ( $p < 0,05$ , n=3). NR: Neuralrohr; Ad: Aorta dorsalis; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50 $\mu\text{m}$

Dieses Ergebnis zeigt, dass in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante eine Subpopulation von Sox10<sup>+</sup>-NLZ vom Zelltod betroffen ist. Dies könnte die Reduktion der Gangliengröße um 30-40% bei E 10.5 erklären. Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei um eine Subpopulation von sympathischen Vorläuferzellen/Neuroblasten handelt, oder ob weitere Neuronpopulationen, die ihren Ursprung in den NLZ haben, auch betroffen sind. Da die Entstehung des Hinterwurzelganglions (HWG) im AP-2 $\beta$ -Knockout nicht betroffen ist (siehe Abb. 3.16), ist von einer Präspezifizierung sympathischer Vorläuferzellen auszugehen, die zu einer selektiven Abhängigkeit von AP-2 $\beta$  führt.

### **3.8.2 Analyse der Effekte der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Doppelnullmutante auf Sox10<sup>+</sup>-Neuralleistenzellen**

Durch die Analyse der AP-2 $\beta$ -Nullmutante wurde gezeigt, dass der Verlust des Transkriptionsfaktors zum Absterben einer Subpopulation von Sox10-exprimierenden Neuralleistenzellen (NLZ) führt. Es stellt sich die Frage, wie sich der Verlust beider Transkriptionsfaktoren auswirkt.

Zunächst wurden die Effekte auf Sox10<sup>+</sup>-NLZ untersucht. Der Verlust beider Faktoren führt zu einer Reduktion der Sox10<sup>+</sup>-Zellen in der Doppelmutante bei E 9.5 (Abb. 3.15 A, B, O,  $p \leq 0,01$ ,  $n=3$ ). Die TUNEL-Analyse zeigt einen starken, 7,5fachen Anstieg von TUNEL<sup>+</sup>-Zellen im Bereich der Sox10<sup>+</sup>-migrierenden NLZ im Vergleich zur Kontrolle und zum AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup> (Abb. 3.15 P,  $p < 0,05$ ,  $n=3$  und Abb. 3.14).

Der Zelltod wandernder NLZ in der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Doppelnullmutante erklärt somit den kompletten Verlust der sympathischen Ganglien. Eine weitere Analyse sollte zeigen, ob weitere Neuralleistenderivate ebenfalls von einem Verlust der AP-2-Transkriptionsfaktoren betroffen sind. Aus diesem Grund wurde das sensorische HWG untersucht.

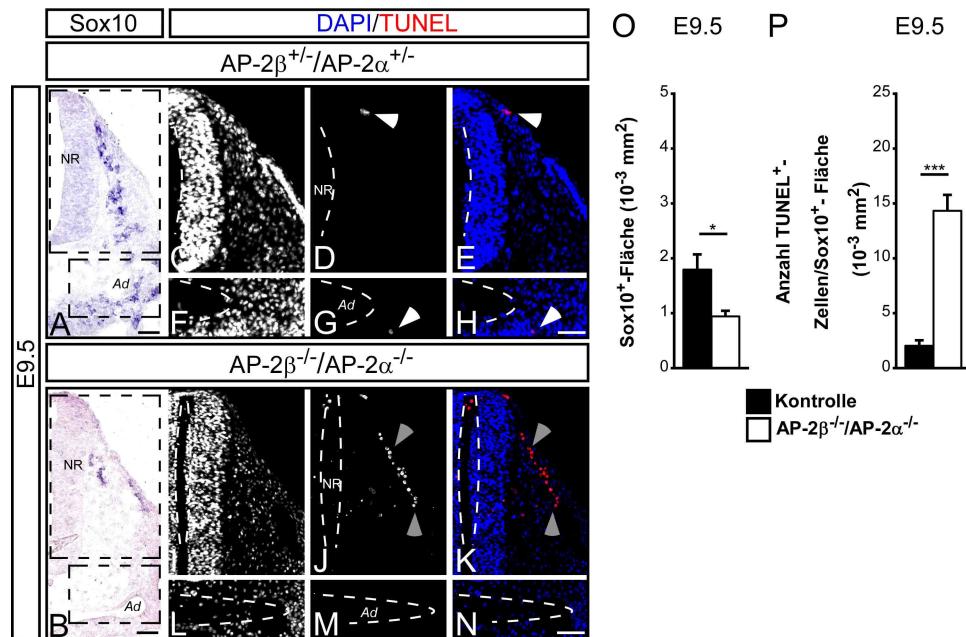


Abb. 3.15: **Analyse der Effekte der Doppler nullmutante auf Sox10<sup>+</sup>-Neuralleistenzellen.** In Parallelschnitten von E 9.5 alten Doppelnullmutanten und AP-2 wildtypischen oder heterozygoten Mausembryonen wurde die Expression von Sox10 durch *in situ*-Hybridisierung und Zelltod durch TUNEL nachgewiesen. In A, B ist die Expression von Sox10 zu sehen. TUNEL<sup>+</sup>- und DAPI<sup>+</sup>-Zellen sind in der Kontrolle in C-H durch weiße Pfeile und in der Mutante in I-N durch graue Pfeile dargestellt. Der Bereich der Ausschnittsvergrößerungen (C-H bzw. I-N) ist in A bzw. B durch ein gestricheltes Rechteck dargestellt. Die Quantifizierung der Fläche des *in situ*-Hybridisierungssignal von Sox10 (O) zeigt eine signifikante Reduktion der Fläche von Sox10<sup>+</sup>-Zellen ( $p < 0,01$ ,  $n = 3$ ). Die Quantifizierung von TUNEL<sup>+</sup>-Zellen (P) zeigt nach Normalisierung auf die Sox10-Fläche der Kontrollen einen erhöhten Anstieg von sterbenden Zellen auf  $15 \pm 2$  Zellen gegenüber  $2 \pm 1$  Zellen in den Kontrollen ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ). Im Bereich der dorsalen Aorta sind keine TUNEL<sup>+</sup>-Zellen beobachtet worden, was bedeuten könnte, dass der Zelltod während der Migration der NLZ stattfindet. NR: Neuralrohr; Ad: Aorta dorsalis; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50µm

### 3.9 Analyse der Rolle der AP-2-Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung sensorischer Neurone des Hinterwurzelganglions

AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  sind in Neuronen des Hinterwurzelganglions (HWG) exprimiert. Deshalb stellte sich die Frage, in welchem Ausmaß sensorische Ganglien durch den Zelltod von Neuralleistenzellen (NLZ) in AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup> und AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Tieren betroffen sind.

Durch *in situ*-Hybridisierung gegen SCG10 wurde die Größe des HWG in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>, AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mausembryonen im Vergleich zur Kontrolle analysiert.

In AP-2 $\beta$ - und AP-2 $\alpha$ -Nullmutanten wurde kein Effekt auf die Größe der Fläche von SCG10<sup>+</sup>-Zellen im HWG gegenüber den Kontrollen an E 10.5, E 13.5 und E 16.5 festgestellt (Abb. 3.16 A-E', H, I, J).

Dagegen wurde in der Doppelnullmutante ein fast vollständiger Verlust der sensorischen Neurone des HWG festgestellt (Abb. 3.16 F-G', H, I). Die Größe des HWG wurde auf 7 $\pm$ 1% (E10.5) und 14 $\pm$ 4% (E 13.5) der Kontrolle reduziert.

Es zeigte sich, dass nur ein kombinierter Verlust beider Transkriptionsfaktoren einen Phänotyp nach sich zieht. In der Doppelnullmutante lassen sich in dem Bereich, wo sich normalerweise das HWG befindet, kaum SCG10<sup>+</sup>-Zellen finden. Der Grund hierfür liegt sehr wahrscheinlich im massiven Zelltod von NLZ. Der Verlust der NLZ in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante übt keinen Effekt auf die Entstehung sensorischer Ganglien aus, im Gegensatz zur reduzierten Größe sympathischer Ganglien. Somit kann AP-2 $\beta$  eine selektive Überlebensfunktion in einer Subpopulation sympathischer Neuralleistenvorläuferzellen zugesprochen werden.

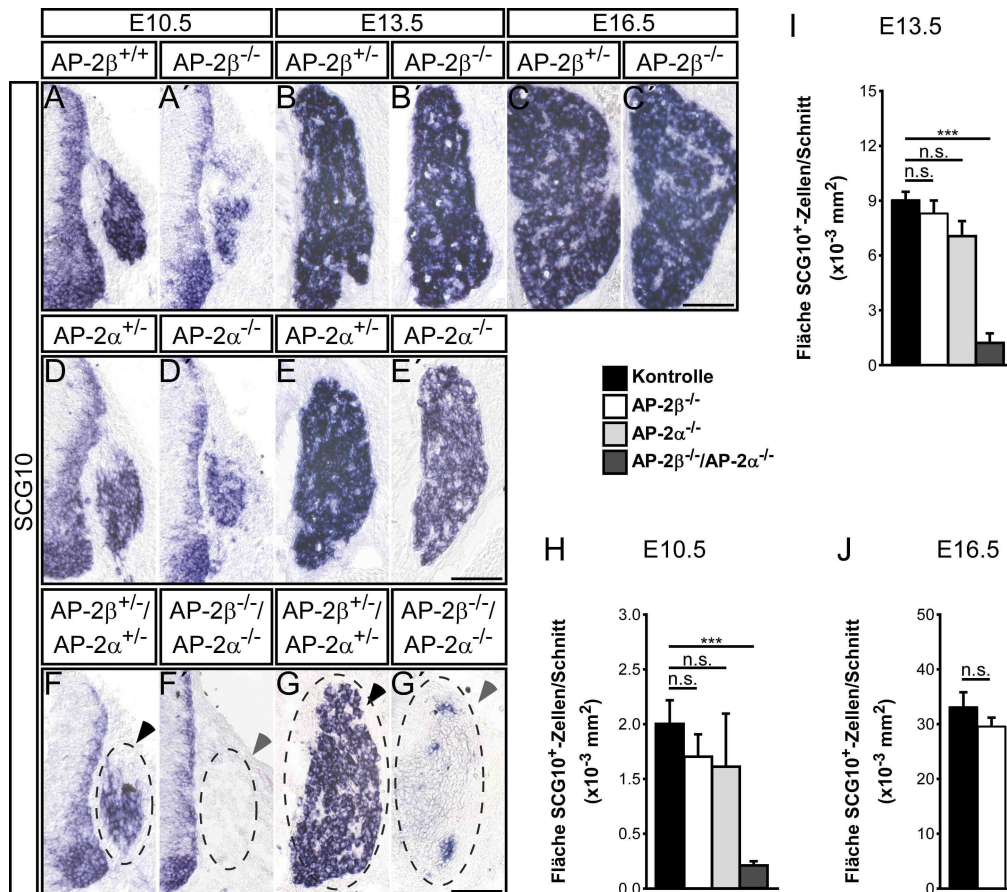


Abb. 3.16: **Die Rolle der AP-2-Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung sensorischer Neurone des Hinterwurzelganglions.** *In situ*-Hybridisierung gegen SCG10 auf Gewebsschnitten von AP-2β<sup>-/-</sup> (E 10.5, E 13.5 und E 16.5; A', B', C'), AP-2α<sup>-/-</sup> (E 10.5 und E 13.5; D', E'), Doppel-Nullmutanten (E 10.5 und E 13.5; F', G') und Kontrollmausembryonen (alle Stadien; A, B, C, D, E, F, G.). Die Quantifizierungen zeigen die Fläche SCG10<sup>+</sup>-Zellen pro Schnitt in x10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup> (H, E 10.5; I, E 13.5; J, E 16.5). Sowohl die AP-2β-Nullmutanten (E 10.5, n=3; E 13.5, n=4; E 16.5, n=3) als auch die AP-2α-Nullmutanten (E 10.5, n=3; E 13.5, n=4) zeigen gegenüber den Kontrollen kein signifikanten Unterschied in der Größe der Fläche der SCG10<sup>+</sup>-Zellen des HWG. In der Doppelnullmutante ist jedoch ein massiver Verlust von SCG10<sup>+</sup>-Hinterwurzelganglionzellen festzustellen. Der gestrichelte Kreis verdeutlicht den Bereich in dem sich normalerweise das HWG befindet (p<0,001, n=3). n.s., nicht signifikant; Fehlerbalken ist SEM; ungepaarter zweiseitiger t-Test; Längenstandard 50μm

Aus dieser Studie geht hervor, dass beiden AP-2-Transkriptionsfaktoren in Kombination und AP-2β eine Überlebensfunktion während der Migration der NLZ zugesprochen werden kann. Dies trifft nicht für AP-2α zu. Zusätzlich wurde durch die beiden konditionellen Doppelnullmutanten gezeigt, dass AP-2α in AP-2β-negativen sympathischen Vorläuferzellen und Neuronen eine Funktion in der Kontrolle von Überleben und Proliferation besitzt.

### 3.10 Analyse der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Nullmutante während der Entwicklung der noradrenergen Neurone des Locus Coeruleus (LC)

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass sowohl AP-2 $\alpha$  als auch AP-2 $\beta$  in Neuronen des noradrenergen Zentrums Locus Coeruleus (LC) exprimiert werden (Kim et al., 2001). Dieses Zentrum liegt im Hirnstamm in der Nähe des vierten Ventrikels (Pattyn et al., 2000). Durch Immunfärbung wurde gezeigt, dass AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  im LC von adulten Mäusen exprimiert werden (Coelho et al., 2005), und dass AP-2 $\alpha$  mit TH koexprimiert ist (Kim et al., 2001).

Da der Phänotyp der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante durch eine angeborene Spaltbildung am Schädel, meist kombiniert mit schweren Hirnschäden (Cranioschisis) gekennzeichnet ist (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996), ist eine Analyse des LC in AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Tieren nicht möglich. Aus diesem Grund konnte nur die AP-2 $\beta$ -Nullmutante analysiert werden.

Nach Induktion der Differenzierung in den Vorläuferzellen der noradrenergen Neurone des LC durch BMPs, wird der Transkriptionsfaktor *Ascl1* induziert, der wiederum mit verantwortlich für die Induktion von *Phox2a* ist. Etwas zeitlich verzögert, tritt dann auch die Expression von *Phox2b* ein (Pattyn et al., 2000). Durch Verluststudien in Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Ascl1*, die *Phox2*-Transkriptionsfaktoren und *Rnx* maßgeblich für die Ausprägung des noradrenergen Phänotyps verantwortlich sind. Gegenüber den peripheren sympathischen Neuronen ist das zeitliche Expressionsmuster von *Phox2a* und *Phox2b* im LC verändert. In sympathischen Neuronen werden beide kontinuierlich bis in adulte Stadien exprimiert (Goridis und Rohrer, 2002). Dagegen wird im LC *Phox2b* zwischen E 11-13.5 herunterreguliert, während die Expression von *Phox2a* erhalten bleibt (Pattyn et al., 2000; Rüdiger et al., 2009).

Für die folgende Analyse wurden coronale Gewebsschnitte von E 13.5 AP-2 $\beta$ -homozygoten Mausembryonen und Kontrollversuchstieren angefertigt. Es wurden *in situ*-Hybridisierungen gegen *Phox2a*, TH und DBH durchgeführt (Abb. 3.17). Es zeigte sich, dass es in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tieren zu einem Verlust der noradrenergen Neurone des LC kommt. Die Fläche *Phox2a*-, TH-, und DBH-positiver Zellen ist auf 5 $\pm$ 1%, 6 $\pm$ 1%, und 5 $\pm$ 1% gegenüber den Kontrollen reduziert (Abb. 3.17).

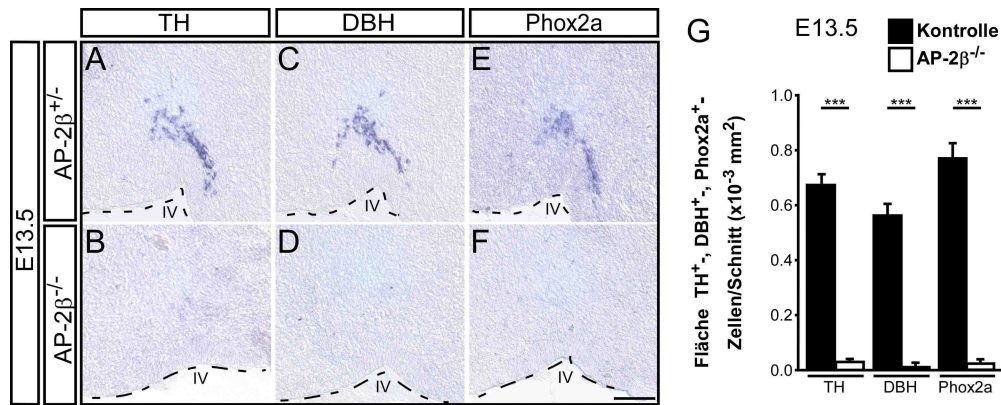


Abb. 3.17: **Analyse der Entwicklung des Locus Coeruleus (LC) in AP-2β<sup>-/-</sup>-Tieren an E 13.5.** Representative coronale Gewebsschnitte von AP-2β<sup>+/+</sup>-Kontrollembryonen (A, C, E) und homozygoten Mutanten (B, D, F) von E 13.5 alten Embryonen. Die Genexpression von Phox2a (E, F), TH (A, B) und DBH (C, D) wurde durch *in situ*-Hybridisierung analysiert. Der vierte Ventrikel (IV) ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Die Fläche der Phox2a-, TH-, und DBH-exprimierenden Zellen von AP-2β<sup>-/-</sup>-Tieren und Kontrollen wurde quantifiziert und in G dargestellt. Es wurde ein fast vollständiger Verlust von noradrenergen Zellen im AP-2β<sup>-/-</sup>-Knockout gegenüber den Kontrollen beobachtet ( $p \leq 0,001$ ,  $n=3$ ). Längenstandard 50μm

Somit konnte gezeigt werden, dass AP-2β für die Entstehung der noradrenergen Neuronen im LC essentiell ist. Da der Vorläuferzellenmarker Phox2a auch reduziert ist, handelt es sich um keinen Differenzierungseffekt, sondern um einen Verlust der Zellen des LC. Während im PNS AP-2α und AP-2β in der Entstehung noradrenerger Neuronen beteiligt sind, ist im ZNS nur AP-2β essentiell.

Es stellt sich die Frage, ob der Verlust der noradrenergen Neuronen im LC wie im PNS durch einen zellautonomen Mechanismus verursacht wird, oder durch indirekte Effekte über benachbarte Zellen im umliegenden neuronalen Gewebe.

Es wurde zunächst das Expressionsmuster von AP-2α und AP-2β in wildtypischen Mausembryonen bei E 13.5 im Bereich des LC analysiert, der durch *in situ*-Hybridisierung gegen DBH identifiziert wurde (Abb. 3.18, A, A'). Es zeigte sich, dass nicht alle DBH-positiven Neurone des LC AP-2α oder AP-2β positiv sind. Dies wurde durch eine Doppelimmunfärbung auf Parallelschnitten gegen TH und AP-2β bestätigt, da AP-2β nur in etwa der Hälfte der TH<sup>+</sup>-Zellen des LC koexprimiert ist (Abb. 3.15, F', F''). Im umliegenden Gewebe wurden AP-2α und AP-2β exprimiert (Abb. 3.18, B, B', C, E). Außerdem wurde die Expression von AP-2α und AP-2β im Neuroepithelium bei E 13.5 beobachtet (Abb. 3.15, B, C, D').

Aus der Analyse geht nicht klar hervor, ob ein zellautonomer Effekt oder eine



Störfunktion von Zellen im lokalen Umfeld zu einem Verlust der Neurone des LC im AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout führt. Da die Effekte im PNS in den Einzel- und Doppelknockouts auf eine zellautonome Wirkung zurückzuführen sind, wird vermutet, dass es während der Entstehung der Neurone des LC in AP-2 $\beta$ -defizienten Mäusen auch zum Verlust der Vorläuferzellen kommt, somit ebenfalls ein zellautonomer Mechanismus zu Grunde liegt.

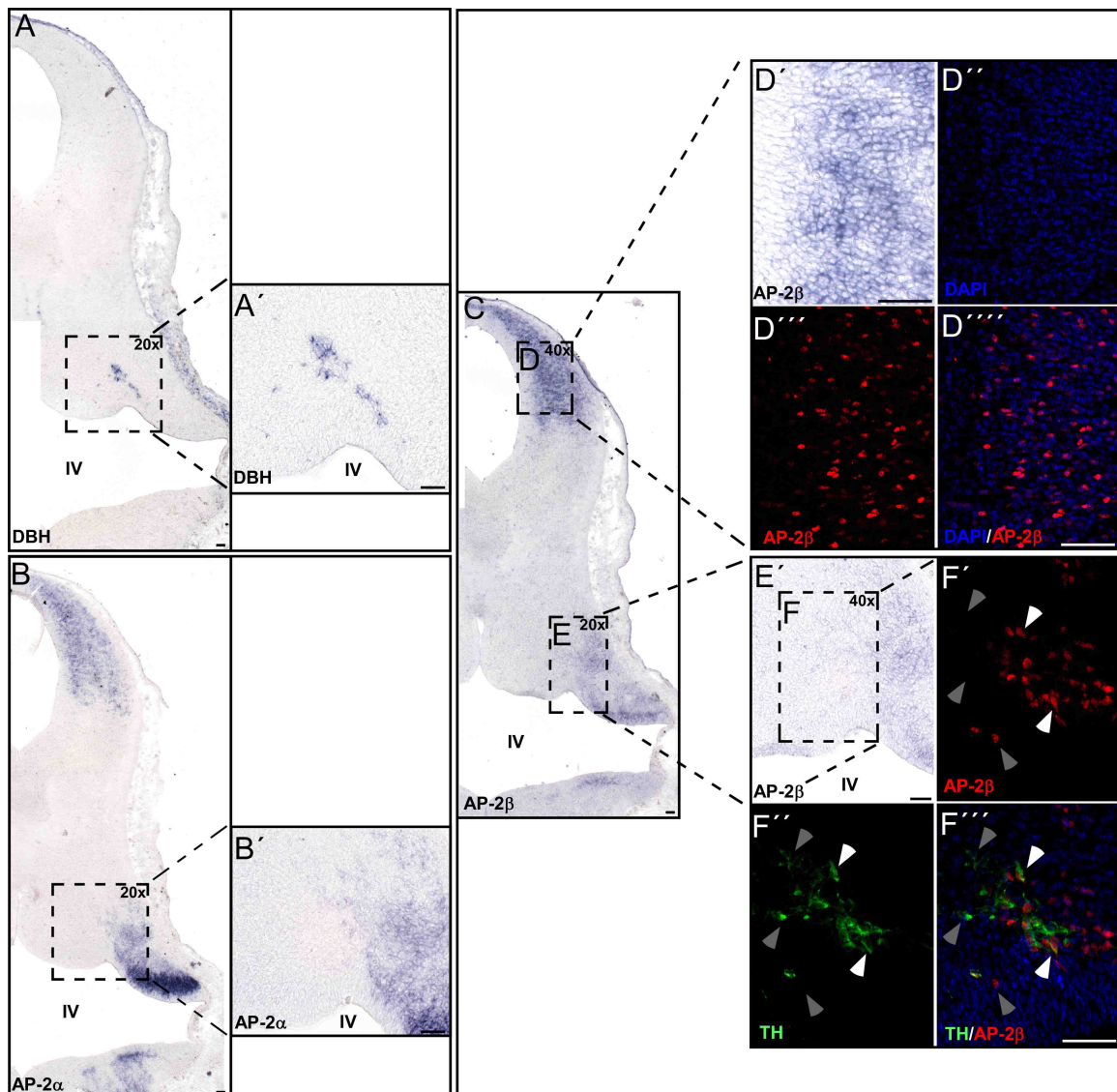


Abb. 3.18: Expression der AP-2-Faktoren und DBH im LC von E 13.5 Mausembryonen. Representative coronale Gewebsschnitte von E 13.5 Kontrollembryonen (n=2). Die Genexpression durch *in situ*-Hybridisierung von DBH (A, A'), AP-2 $\alpha$  (B, B') und AP-2 $\beta$  (C, D, E, D', E', F). Antikörperfärbung von AP-2 $\beta$  im Bereich des LC (F'-F'') und Neuroepithelium (D''-D'''). Antikörperfärbung von TH im LC (F''-F'''). Koexpression von AP-2 $\beta$  und TH ist durch weiße Pfeilspitzen dargestellt. TH<sup>+</sup> oder AP-2 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen sind durch graue Pfeilspitzen dargelegt. Es zeigte sich, dass nicht alle TH<sup>+</sup>-Zellen des LC AP-2 $\beta$ <sup>+</sup> sind. Vierter Ventrikel, (IV); 20x, 20fache Vergrößerung; 40x, 40fache Vergrößerung; Längenstandard 50 $\mu$ m

## 4. DISKUSSION

Die Nervenzellen des autonomen Nervensystems entstehen aus undifferenzierten Vorläuferzellen aus der Neuralleiste nachdem sich diese nach einer initialen Wanderungsphase zu Ganglien zusammengelagert haben. Die Signalmoleküle aus der Familie der BMPs sowie die Transkriptionsfaktoren *Ascl1*, *Insm1*, *Phox2a/b*, *Hand2* und *Gata2/3* sind essentiell für die noradrenerge Differenzierung, Proliferation und Überleben während der frühen Entwicklung von sympathischen Neuronen (Abb. 4.1; Reissmann et al., 1996; Schneider et al., 1999; Stanke et al., 1999; Howard et al., 2000; Lucas et al., 2006, Tsarovina et al., 2004; Reiff et al., 2010, Hendershot et al., 2008, Morikawa et al., 2007; Schmidt et al., 2009; Wildner et al., 2008). Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren, die nicht nur während der Entwicklung sympathischer Ganglien sondern bereits während der Wanderung der Neuralleistenzellen (NLZ) exprimiert werden, bleibt dagegen weitgehend unklar.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit den Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$ , die sowohl bereits vor Beginn der Neurogenese als auch in differenzierten Neuronen vorhanden sind. Zur Analyse ihrer Funktion wurden periphere Ganglien von Mausembryonen untersucht bei denen AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  oder beide Gene konstitutiv oder konditionell eliminiert wurden (Abb. 4.1).

Sowohl in den konstitutiven und konditionellen Doppelmutanten als auch in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante wurde eine gesteigerte Apoptose als zentraler Defekt beobachtet (Abb. 4.1).

Die Ausschaltung beider Gene oder nur von AP-2 $\beta$  führte zum Zelltod während der Wanderung der NLZ. Im Fall der Doppelmutante führt die Eliminierung beider AP-2-Gene zu einem fast vollständigem Verlust sympathischer und sensorischer Ganglien. Dagegen zeigten die AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tiere nur eine Reduktion der Größe sympathischer Ganglien. Es stellte sich heraus, dass AP-2 $\beta$  keine Funktion für die Aufrechterhaltung noradrenerger Differenzierung sympathischer Neurone hat. Zusätzlich zeigen diese Daten, dass eine AP-2 $\beta$ -abhängige Subpopulation von NLZ bereits während der Wanderung darauf spezifiziert ist zu sympathischen Neuronen zu differenzieren (Abb 4.1).

Die konditionelle Eliminierung von AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Ganglien (AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-*Ascl1*Cre<sup>+</sup> und AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>) führte zu einer weiteren Reduktion der

Anzahl sympathischer Neuronen. Dadurch wird gezeigt, dass die Überlebensfunktion von AP-2 $\beta$  in sympathischen Neuronen von AP-2 $\beta^{-/-}$ -Ganglien durch AP-2 $\alpha$  kompensiert wird (Abb. 4.1).

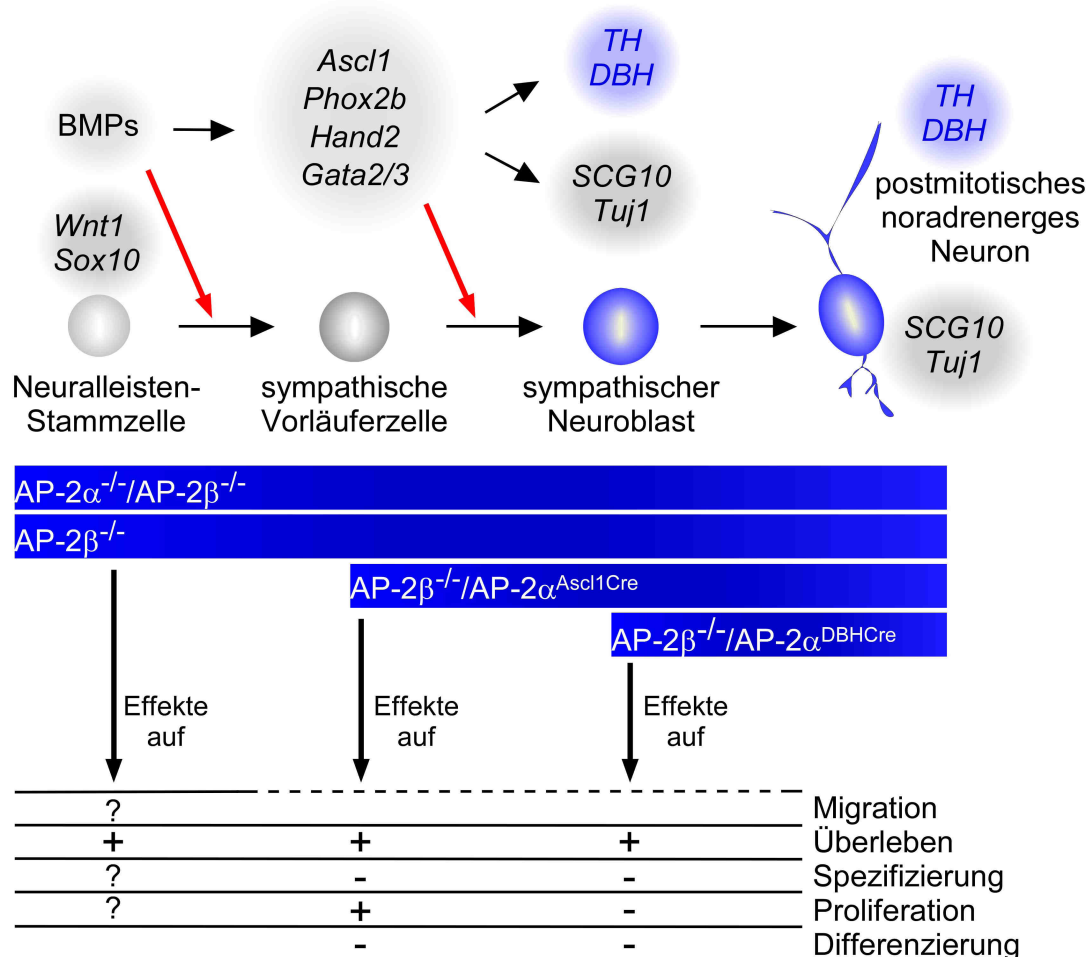


Abb. 4.1: **Die Rolle der AP-2-Faktoren in der Entwicklung sympathischer Neurone.** Eine wandernde Neuralleisten-Stammzelle ist durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Wnt1* und *Sox10* gekennzeichnet. Nach Induktion durch BMPs wird die Expression von Transkriptionsfaktoren (u.a. *Ascl1*, *Phox2b*, *Hand2*, *Gata2/3*) verursacht, die eine sympathische Vorläuferzelle charakterisieren. Der sich teilende sympathische Neuroblast und das postmitotische noradrenerge Neuron exprimieren sowohl noradrenerge Gene (*TH*, *DBH*) als auch generelle neuronale Gene (*SCG10*, *Tuj1*).

Sowohl die konstitutive Doppelnullmutante als auch die AP-2 $\beta^{-/-}$ -Tiere zeigen Effekte auf das Überleben wandernder Sox10<sup>+</sup>-Neuralleistenzellen. Effekte auf Migration, Proliferation und Spezifizierung von Neuralleistenzellen bleiben unklar. Beide konditionellen Doppelnullmutanten (*Ascl1Cre*, *DBHCre*) zeigen ebenfalls Effekte auf das Überleben sympathischer Vorläuferzellen bzw. sympathischer Neuroblasten. Nur der konditionelle Doppelknockout (*Ascl1Cre*) in sympathischen Vorläuferzellen zeigte einen signifikanten Effekt auf die Proliferation. Durch die konstitutiven und konditionellen Doppelnullmutanten und der AP-2 $\beta^{-/-}$ -Nullmutante konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Apoptose der zentrale Defekt ist. Dagegen ist die BMP-abhängige Spezifizierung (*Ascl1*, *Phox2b*, *Hand2*, *Gata2/3*) und Differenzierung (*TH*, *DBH*, *SCG10*, *Tuj1*) sympathischer Neurone nicht von AP-2 abhängig. Die AP-2 $\alpha$ -Nullmutante zeigte keine Effekte auf die Entstehung peripherer Ganglien.

#### **4.1 Expression der Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in den sympathischen Ganglien während der Normalentwicklung**

Die Mitglieder der AP-2-Familie der HSH-Transkriptionsfaktoren sind an der Entstehung und Morphogenese verschiedener Gewebe und Organe beteiligt. In der Entwicklung von Säugern sind AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in den meisten Strukturen des ZNS und PNS exprimiert (Eckert et al., 2005). Studien von Moser et al. (1995, 1997b) und Mitchell et al. (1991) haben gezeigt, dass Transkripte beider AP-2-Gene in den sympathischen und sensorischen Ganglien vorliegen. Diese Daten beschreiben jedoch nur in Ansätzen die Expression beider Gene, da vorwiegend „Whole-Mount“-Färbungen in der Maus durchgeführt wurden. Ein genauer Datensatz über die Anteile von AP-2 $\alpha$ <sup>+</sup>- und AP-2 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen in sympathischen und sensorischen Ganglien während der Entwicklung fehlt jedoch. Eine etwas genauere Analyse wurde von Hong et al. (2008) durchgeführt. Der Nachweis von AP-2 $\beta$  in sympathischen Neuronen wurde durch Immunfärbung erbracht. Die Expression von AP-2 $\beta$  wurde zwischen E 10.5 und E 13.5 nachgewiesen und deckte sich mit der Expression des adrenergen Markergens TH. Die Expression von AP-2 $\alpha$  wurde jedoch nur an E 13.5 untersucht. In diesem Stadium wurde in einigen Zellen des sympathischen Ganglions das AP-2 $\alpha$ -Protein nachgewiesen.

Für die vorliegende Arbeit war es jedoch wichtig, ein genaueres Expressionsprofil von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  zwischen E 10.5 und E 16.5 zu erstellen, um den Zusammenhang mit dem transkriptionellen Netzwerk der sympathischen Differenzierung herzustellen. Des Weiteren sollte eine detaillierte Untersuchung der Koexpression beider Gene im sympathischen Ganglion vorgenommen werden.

Die vorliegende Analyse der Mausembryonen zwischen E 10.5 und E 16.5 ergab, dass AP-2 $\beta$  in sympathischen Vorläuferzellen und embryonal differenzierten sympathischen Neuronen exprimiert wird. Während mRNA-Transkripte von AP-2 $\alpha$  in den sympathischen Ganglien zwischen E 10.5 und E 13.5 nachgewiesen wurden, war AP-2 $\alpha$  bei E 16.5 nur schwach und bei E 18.5 nicht mehr vorhanden. In den sensorischen Ganglien ist AP-2 $\alpha$  stärker als AP-2 $\beta$  bei E 10.5 exprimiert. Die Expression beider Gene geht aber zwischen E 13.5 und E 16.5 zurück. Dagegen werden beide Gene im dorsalen Rückenmark zwischen E 10.5 und E 16.5 koexprimiert, wie schon in früheren Studien gezeigt worden ist (Moser et al., 1995, 1997b).

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen, dass sowohl AP-2 $\alpha$  als auch AP-2 $\beta$  in der Entwicklung sympathischer Neurone in der Maus beteiligt sein könnten. Es wurde zusätzlich festgestellt, dass an E 10.5 beide Gene sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Zellen von sympathischen Ganglien koexprimiert werden. AP-2 $\beta$  ist ab E 13.5 jedoch präferentiell in den sympathischen Ganglien exprimiert und kann somit zusätzlich im Erhalt der noradrenergen Genexpression eine Rolle spielen.

## **4.2 Analyse der noradrenergen Differenzierung in AP-2-defizienten Mäusen**

### **4.2.1 Analyse der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -defizienten Maus**

AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  sind Transkriptionsfaktoren, die während der Entwicklung zelltypspezifisch exprimiert und reguliert werden. Sie kontrollieren die eukaryotische Genexpression als Homo- oder Heterodimer durch eine Interaktion mit der palindromischen Konsensussequenz 5'-GCCN<sub>3</sub>GGC-3' (Mitchell et al., 1991; Williams und Tjian, 1991a,b). Durch die Analyse der AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -Nullmutante konnte gezeigt werden, dass diese Gene eine essentielle Rolle für die Entwicklung des Gesichts, der Haut, der Augen und der Niere besitzen (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996, Nottoli et al., 1998; Moser et al., 1997a). Durch die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in Neuralleistenderivaten und neuroektodermalen Geweben wird angenommen, dass diese AP-2-Proteine in der Kontrolle der Expression von neuronal-spezifischen und terminalen Differenzierungsgenen involviert sind. Hinweise auf eine Funktion der beiden AP-2-Gene als positiver Regulator von DBH und TH lieferten die Promotorstudien von Kim et al. (2001) und Greco et al. (1995). In beiden Studien konnte eine AP-2-Bindungsstelle im proximalen Bereich des 5'-DBH-Promotors identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass AP-2 $\alpha$  an den DBH-Promotor bindet und die Transkription von TH und DBH stimuliert. Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch AP-2 $\beta$  eine ähnliche Rolle wie AP-2 $\alpha$  in der Kontrolle von terminalen Differenzierungsgenen hat.

Im Zebrafisch werden AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  im Neuralrohr, im Ektoderm und in der sich entwickelnden Niere koexprimiert, dagegen wird nur AP-2 $\alpha$  in Neuralleistenzellen (NLZ) exprimiert (Knight et al., 2003, 2005; Holzschuh et al., 2003). Durch verschiedene

Punktmutationen im *AP-2 $\alpha$* -Gen wurde im Zebrafisch gezeigt, dass es zu einer Störung in der Entwicklung der Neuralleistenderivate wie dem Gesichtsskelett, dem PNS und den Pigmentzellen kommt (Knight et al., 2003, 2004, 2005; Holzschuh et al., 2003; Barrallo-Gimeno et al., 2004). In den untersuchten Zebrafisch-Mutanten wurden jedoch widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Einerseits wird postuliert, dass *AP-2 $\alpha$*  eine Rolle in der Kontrolle der terminalen noradrenergen Differenzierungsgene TH und DBH spielt (Holzschuh et al., 2003). Dagegen wird *AP-2 $\alpha$*  in anderen Studien als ein genereller Überlebensfaktor für Zellen der sympathischen und sensorischen Ganglien charakterisiert (Knight et al., 2003; Barrallo-Gimeno et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Analyse der Expression von *AP-2 $\alpha$*  und *AP-2 $\beta$* , dass ein überlappendes Expressionsmuster (E 10.5 - 13.5) in sympathischen Neuronen existiert. Es wurde auch die Expression beider Gene in den sensorischen Ganglien bei E 10.5 festgestellt, jedoch war die Expression von *AP-2 $\beta$*  schwächer. Im weiteren Verlauf der Entwicklung geht die Expression beider Gene im HWG verloren.

Um eine Rolle von *AP-2 $\alpha$*  und *AP-2 $\beta$*  in der Entwicklung sympathischer Ganglien in der Maus zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst *AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$* -Doppelnullmutanten untersucht.

Die Analyse ergab, dass es durch die Eliminierung von *AP-2 $\alpha$*  und *AP-2 $\beta$*  zu einer sehr starken Reduktion der Zellzahl sympathischer Ganglien kommt. Die Größenreduktion spiegelt sich durch die fast vollständige Abnahme Sox10-, SCG10-, Phox2b-, TH- und DBH-positiver Zellen wieder.

In einer früheren Studie von Pattyn et al. (2006) wurde beschrieben, dass es in der *Ascl1*-Nullmutante zu einer verzögerten Genexpression von sympathischen neuronalen Differenzierungsgenen kommt. Davon sind z.B. DBH, Hand2, Gata3 und SCG10 betroffen. Es wurde gezeigt, dass diese Gene bei E 10.5 noch nicht exprimiert werden, aber bei E 12.5 vollständig vorhanden sind. Dagegen kann aufgrund der identischen Effekte in der Doppelnullmutante bei E 10.5 und E 13.5 ausgeschlossen werden, dass es sich bei der fast vollständigen Eliminierung der Ganglien bei E 10.5 um eine verzögerte Differenzierung des sympathischen Ganglions handelt.

Auch das sensorische Hinterwurzelganglion (HWG) zeigte eine vergleichbare Größenreduktion, was durch einen Verlust SCG10-positiver Zellen gekennzeichnet ist.

Dies warf die Frage nach dem zellulären Wirkungsmechanismus auf. *AP-2 $\alpha$*  könnte zusammen mit *AP-2 $\beta$*  die Differenzierung sympathischer und sensorischer

Vorläuferzellen in bestimmten Entwicklungsphasen steuern. Ein Doppelknockout würde dann zu einem Anstieg unreifer Vorläuferzellen im Ganglien führen. Eine Anreicherung von Vorläuferzellen wurde nicht beobachtet, es kommt zum Verlust der gesamten Zellpopulation, der Neuronen und der Sox10<sup>+</sup>-Vorläuferzellen.

Diese Daten in der Maus zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in Kombination nicht wie bisher angenommen, die Noradrenalin synthese kontrollieren, sondern für die allgemeine Entwicklung sympathischer Ganglien essentiell sind. Die Eliminierung beider Gene führt zusätzlich zu einem quantitativ gleichwertigen Effekt auf die Entwicklung sensorischer Ganglien. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine generelle Rolle von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in der Entwicklung des murinen PNS hin.

Zur weiteren Analyse der Funktion wurden sympathische Ganglien von Mausembryonen untersucht bei denen jeweils entweder AP-2 $\alpha$  oder AP-2 $\beta$  eliminiert wurde.

#### **4.2.2 Analyse der AP-2 $\alpha$ -defizienten Maus**

Der AP-2 $\alpha$ -Transkriptionsfaktor mit einem Molekulargewicht von 52 kDA wurde 1988 aus Kernextrakten von HeLa-Zellen isoliert (Mitchell et al., 1987). Er wird mit der Regulation von Genen in Verbindung gebracht, die in einer Vielzahl von biologischen Prozessen involviert sind. Gezielte Inaktivierung dieses Gens führt zur thorakalen Abdominoschisis und Cranioschisis (Zhang et al., 1996; Schorle et al., 1996), was z.B. in der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante eine Analyse der Zellen in den noradrenergen Zentren im ZNS unmöglich macht. Williams und Tjians et al. (1991a, b) zeigten, dass der C-terminale Bereich entscheidend für die Funktion des Proteins ist, da die Deletion des letzten Exons zum Verlust der Dimerisierungs-, DNA-Bindungs- und Transaktivierungsdomäne führt. Die Ergebnisse dieser Studien wurden als Grundlage für die Herstellung von DNA-Konstrukten zur Inaktivierung von AP-2 $\alpha$  durch homologe Rekombination in der Maus verwendet (Zhang et al., 1996; Schorle et al., 1996). In einer früheren Arbeit von Barallo-Gimeno et al. (2004) wird postuliert, dass bei den beiden verschiedenen *mont blanc*-Mutanten (Holzschuh et al., 2003; Barallo-Gimeno et al., 2004; siehe Einleitung 1.5.5) und den beiden AP-2 $\alpha$ -Nullmutanten in der Maus (Zhang et al., 1996;

Schorle et al., 1996) ein vollständiger Funktionsverlust des AP-2 $\alpha$ -Proteins vorliegt und somit diese als gleichwertige amorphe Allele zu betrachten sind. Auf Grund dieser Hypothese sollte der Verlust von AP-2 $\alpha$  in der Maus zu einem ähnlichen Phänotyp führen wie im Zebrafisch. Deshalb wäre zu erwarten, dass es in der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante zu einem Verlust der noradrenergen Genexpression in sympathischen Ganglien und zu einer Größenreduktion der HWG kommt. Ein entscheidender Unterschied zwischen Zebrafisch und Maus liegt jedoch darin, dass beim Zebrafisch AP-2 $\beta$  nicht im PNS exprimiert ist.

Um den Beitrag von AP-2 $\alpha$  zur noradrenergen Differenzierung zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit AP-2 $\alpha$ -Nullmutanten untersucht. Interessanterweise wurde in diesen Mäusen zu Beginn der sympathischen Differenzierung an E 10.5, sowie in der weiteren Entwicklung an E 13.5 keine Veränderung der noradrenergen Genexpression (TH, DBH) festgestellt. Die Expression weitere Differenzierungsgene (Phox2b, Hand2, Gata3, SCG10) war ebenfalls nicht beeinträchtigt.

Es wurde auch kein Effekt auf die Entwicklung des HWG bei E 10.5 und E 13.5 beobachtet, was in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten ist (Brewer et al., 2004; Zhang et al., 1996).

Aus den hier diskutierten Daten geht hervor, dass AP-2 $\alpha$  in der Maus nicht die im Zebrafisch beobachtete Rolle in der Kontrolle der Expression der terminalen Differenzierungsgene wie TH oder DBH besitzt. Dies kann durch eine Kompensation durch AP-2 $\beta$  während der Entwicklung sympathischer Ganglien erklärt werden.

### **4.2.3 Analyse der AP-2 $\beta$ -defizienten Maus**

Das frühe embryonale Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  überlappt in Neuralleistenderivaten, trotzdem zeigen die AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -Nullmutanten unterschiedliche Phänotypen (Schorle et al., 1996; Moser et al., 1997b). In der AP-2 $\beta$ -Nullmutante tritt lediglich im Vergleich zur AP-2 $\alpha$ -Nullmutante ein Defekt in der Nierenentwicklung auf, was zum perinatalen Tod führt. Alle Neuralleistenderivate, die kranialen Strukturen und die neuronalen Gewebe entwickeln sich beim AP-2 $\beta$ -Knockout weitgehend normal. Durch eine frühere Arbeit von Hong et al. (2008) wurde jedoch gezeigt, dass es zu einer gestörten Entwicklung noradrenerger sympathischer



Neurone in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante kommt.

In diesen AP-2 $\beta$ -defizienten Tieren wurde festgestellt, dass die Expression von Phox2b und somit die Gangliengröße zwar an E 10.5, E 11.5 und E 12.5 kaum beeinträchtigt war; an E 13.5 wurde jedoch eine Reduktion der Größe der sympathischen Ganglien (Reduktion der Expression aller untersuchten Marker; Phox2b, Gata3 und SCG10) beobachtet. Außerdem wurde in dieser Arbeit eine selektive Rolle von AP-2 $\beta$  auf die Expression von DBH und nicht von TH postuliert und die dadurch entstehende Noradrenalininsuffizienz für die postnatale Letalität verantwortlich gemacht (Hong et al., 2008).

Die vorliegende Analyse der AP-2 $\beta$ -Nullmutante an E 10.5, E 13.5 und E 16.5 ergab, dass bei diesen Tieren die Größe der sympathischen Ganglien um ca. 40% reduziert ist. Dies wird durch eine gleichmäßige Reduktion der noradrenergen Genexpression (TH, DBH) und der Expression der Differenzierungsgene (Phox2b, Hand2, Gata3, SCG10) gezeigt. Somit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Größenreduktion des sympathischen Ganglions bei E 13.5 mit Hong et al. (2008) überein, jedoch wurde kein selektiver Effekt auf die noradrenerge Genexpression festgestellt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf beruhen, dass unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung der noradrenergen Genexpression verwendet wurden. Hong et al. (2008) analysierten die DBH- und TH-Expression durch Intensitätsmessung der DAB-Immunfärbung auf Schnitten sympathischer Ganglien. Da solche Messungen nur im linearen Bereich der Enzymreaktivität quantitative Aussagen erlauben, ist fraglich ob das Expressionsniveau mit diesem Verfahren quantifiziert werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte planimetrische Messung der Fläche des *in situ*-Hybridisierungssignals ist unabhängig von der Intensität der Färbung und beruht nur darauf, dass eine signifikante Färbung über der Hintergrundfärbung vorliegt. Es kann dadurch eine verlässliche Aussage über den zeitlichen Verlauf der Genexpression getroffen werden, i.e. welcher Anteil der Ganglienzellen welche Gene exprimieren.

Eine weitere Erklärung wäre, dass die Effekte durch den genetischen Hintergrund beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um einen genetisch gemischten Mausstamm (C57/Bl6x129SV). Hong et al. (2008) analysierten jedoch ein reinen C57/Bl6-Mausstamm. Ein eindrucksvolles Beispiel für den Einfluss des genetischen Hintergrunds auf den Effekt von Knockouts wird in einer früheren Arbeit von Dimou et al. (2006) beschrieben. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass

der Nogo-A-Knockout in zwei verschiedenen Mausstämmen zu unterschiedlichen Phänotypen führt. Es wurde beobachtet, dass zurückgekreuzte 129 Black Swiss Nogo-A-Knockouts im Vergleich zu C57/Bl6 Nogo-A-Knockouts eine 2-4fach höhere Regenerationsfähigkeit aufweisen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der unterschiedliche Phänotyp der vorliegenden Arbeit und der von Hong et al. (2008) teilweise durch die verschiedenen verwendeten Mausstämme verursacht wurden.

Jedenfalls kontrolliert AP-2 $\beta$  in dem von uns untersuchten Mausmodell nicht die spezifische Expression von DBH, sondern ist vielmehr für die generelle Entwicklung sympathischer Ganglien notwendig. Aus den hier diskutierten Ergebnissen ist nicht klar, warum es durch den Verlust der AP-2-Gene oder AP-2 $\beta$  zur Größenreduktion der sympathischen Ganglien kommt. Es wäre denkbar, dass die Entwicklung von sympathischen Neuronen bereits zu einem frühen Zeitpunkt in Vorläuferzellen gestört ist. Außerdem stellt sich die Frage, warum der Verlust von AP-2 $\beta$  nicht dem Phänotyp des Doppelknockouts entspricht. Ist AP-2 $\alpha$  vielleicht in AP-2 $\beta$ -negativen noradrenergen Neuronen kompensatorisch wirksam? Diese letzte Frage sollte durch die Analyse der konditionellen Doppelknockouts beantwortet werden.

#### **4.2.4 Analyse der konditionellen AP-2-Doppelnulmutanten**

Die BMPs sind identifizierte, nicht zellautonome Signale, welche die Entwicklung von sympathischen Vorläuferzellen zu noradrenergen Neuronen steuern. Sie induzieren in sympathischen Vorläuferzellen zunächst die Expression des proneuralen Gens *Ascl1* und des Transkriptionsfaktors *Phox2b* (Reissmann et al., 1996; Schneider et al., 1999). Weiterhin wird eine verzweigte Kaskade von Transkriptionsfaktoren induziert, die direkt oder indirekt die Expression der terminalen Differenzierungsgene steuern. Zu diesen Genen gehören u.a. TH, DBH und SCG10.

Die in dieser Arbeit beschriebene Expressionsanalyse ergab, dass AP-2 $\alpha$  während der Entwicklung sympathischer Neurone zunächst exprimiert bleibt und somit durchaus eine Funktion während dieser Entwicklungsphase besitzen könnte. Die Analyse der AP-2 $\alpha$ -Nullmutante ergab zwar keinen Effekt auf die sympathische Entwicklung, jedoch könnte der AP-2 $\alpha$ -Verlust durch AP-2 $\beta$  kompensiert werden. Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tieren

auszuschalten. Im AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-genetischen Hintergrund wurde AP-2 $\alpha$  einerseits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in Ascl1-positiven sympathischen Vorläuferzellen, andererseits in DBH-exprimierenden embryonal differenzierten Neuronen deletiert.

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden, dass die zusätzliche konditionelle Eliminierung von AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zum AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Einzelknockout zu einer weiteren Reduzierung in der Anzahl von Neuronen führte. AP-2 $\alpha$  kontrolliert also das Überleben AP-2 $\beta$ -defizienter sympathischer Neurone. Die mögliche Überlebensfunktion von AP-2 $\beta$  in sympathischen Neuronen wird somit durch AP-2 $\alpha$  zellautonom kompensiert und ist daher nur in den beiden konditionellen Doppelknockouts (AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-Ascl1Cre<sup>+</sup> und AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>) evident. Die Resultate der beiden konditionellen AP-2 $\alpha$ -Knockouts in der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Mutante zeigen deutlich, dass sich der Effekt auf die generelle Entwicklung der sympathischen Ganglien gegenüber dem AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout verstärkt, nicht aber der Phänotyp der Doppelnullmutante reproduziert wird.

Zusätzlich konnte nach einer frühen initialen konditionellen AP-2 $\alpha$ -Deletion ein Effekt auf die Proliferation beobachtet werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Anzahl der Ki67<sup>+</sup>-Zellen durch selektiven Zelltod proliferierender Zellen reduziert hat und dadurch kein selektiver Effekt auf die Proliferation vorhanden ist.

Es stellen sich die Fragen, warum es in den beiden konditionellen Doppelnullmutanten zu einem verzögerten Effekt kommt und warum durch die zusätzliche Eliminierung von AP-2 $\alpha$  in AP-2 $\beta$ -negativen noradrenergen sympathischen Neuronen nicht ein der Doppelmutante vergleichbaren Phänotyp erzielt wird?

Es wurde durch PCR gezeigt, dass die Cre-Rekombinase ein deletiertes AP-2 $\alpha$ -Allel produziert und somit der konditionelle Knockout prinzipiell funktioniert. Es bleibt jedoch unklar, ob AP-2 $\alpha$  vollständig deletiert wurde, da in den Ganglien eine unbekannte Menge an Gliazellen vorliegt, in denen AP-2 $\alpha$  durch die Ascl1- und DBH-Cre nicht eliminiert wurde. Eine quantitative Aussage könnte beispielsweise durch *in vitro*-Zellkulturversuche getroffen werden. Hier würden SCG-Zellkulturen von AP-2 $\beta$ <sup>+/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-Cre<sup>+</sup>-Tieren mit AraC (Cytosin Arabinosid) behandelt werden und dann eine quantitative-„real-time“-PCR von AP-2 $\alpha$  durchgeführt werden. Durch Zugabe von AraC, ein auf Einbau in die DNA basierender Mitosehemmer, wird vor allem in teilenden Gliazellen indirekt Apoptose induziert, dagegen sind postmitotische Neurone nicht

betroffen. Da die AP-2 $\alpha$ -Expression zwischen E 13.5 und E 16.5 in sympathischen Ganglien zurückgeht, könnte dieser Versuch nur an E 13.5 durchgeführt werden, was einerseits aber technische Probleme bereitet, da sehr wenig Zellmaterial zu Verfügung steht, andererseits die sympathischen Neurone noch proliferieren und evtl. ebenfalls durch AraC eliminiert werden.

Eine qualitative Aussage könnte aber getroffen werden wenn anstatt der RT-qPCR eine genomische PCR durchgeführt werden würde. Hier könnte eine genauere Aussage erhalten werden, wieviele Neurone ein deletiertes AP-2 $\alpha$ -Gen besitzen. Da für diese Versuche jedoch postnatale (P0/3) Mäuse verwendet werden müssten, ist es nicht möglich die Aktivität der Cre zum Zeitpunkt der Analyse der Ganglienzellen in den konditionalen Mutanten (E 10.5 - E 16.5) zu untersuchen. Somit kann nur eine Aussage gemacht werden, ob die Cre bis kurz nach der Geburt in der Lage ist in noradrenergen Neuronen das AP-2 $\alpha$ -Allel komplett zu deletieren.

Wenn die Cre-Rekombination von AP-2 $\alpha$  ineffizient abläuft, wäre zu erwarten, dass AP-2 $\alpha$  schneller eliminiert wird, wenn Tiere mit nur einem geflochten Allel eingezüchtet werden. Dies könnte durch Kreuzungen zu AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/-}$ -Cre $^{+}$ -Tieren erzeugt werden. Dadurch könnte die Cre ihre vollständige Enzymaktivität für dieses einzelne Allel verwenden. Es ist sehr interessant, ob dann ein stärkerer Phänotyp entsteht. Dieses Teilprojekt ist bereits in Arbeit.

Eine weitere Erklärung für den verzögerten Effekt der konditionalen Nullmutanten wäre eine sehr lange Halbwertszeit des AP-2 $\alpha$ -Proteins. Die Wahrscheinlichkeit ist aber sehr gering, weil gezeigt werden konnte, dass die mRNA von Transkriptionsfaktoren eine Halbwertszeit von ca. einer halben Stunde besitzt (Sharova et al., 2009; Hargrove und Schmidt, 1989), und dass die Halbwertszeit des AP-2 $\alpha$ -Proteins in immortalisierten Säugerepithel- (MCF-10a) und murinen NIH 3T3-Zellen ca. eine Stunde beträgt. Nur in Krebszelllinien (MDA-MB-453, SK-BR-3) wurde gezeigt, dass AP-2 $\alpha$  bis zu 72 Stunden stabil sein kann (Li et al., 2006). Somit ist es unwahrscheinlich, dass der verzögerte Effekt durch eine hohe Halbwertszeit des Proteins verursacht wird.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass AP-2 $\alpha$  das Überleben sympathischer Neurone in AP-2 $\beta^{-/-}$ -Tieren kontrolliert. Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der AP-2-Proteine bleibt jedoch unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich im AP-2 $\beta$ -Knockout ca. 60% der sympathischen Neurone bilden, dann aber bei Verlust von AP-2 $\alpha$  charakteristische Eigenschaften sympathischer Neurone verlieren, wie z.B.

Rezeptoren für Neurotrophine, und daraufhin in den Zelltod gehen.

Eine weitere mögliche Erklärung für den Zelltod der Ganglienzellen im konditionellen Knockout wurde durch die Analyse der polyzystischen Niereninsuffizienz in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante geliefert. Es zeigte sich, dass im Nierenepithel eine verstärkte Apoptoserate vorhanden ist (Moser et al., 1997a), die sehr wahrscheinlich auf einer verminderten Expression des antiapoptotisch wirkenden *bcl-2*-Gens und einer Induktion von *c-myc* beruht. Auch eine Überexpression von *c-myc* und ein *bcl-2*-Verlust führt zu renaler Zystenbildung (Trudel et al., 1991; Veis et al., 1993). Unterstützt werden diese Beobachtungen durch den Nachweis einer direkten Interaktion von AP-2-Proteinen mit *c-myc* und der gemeinsamen Kontrolle von *c-myc*-Zielgenen wie z.B. *bcl-2* (Gaubatz et al., 1995). Dadurch wird ein molekularer Signalweg von AP-2 $\beta$  zur Apoptose identifiziert, der möglicherweise auch für die Effekte von AP-2 $\alpha$  und für Effekte von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in anderen Geweben relevant sein kann. Obwohl die AP-2 $\alpha$ - im Gegensatz zur AP-2 $\beta$ -Nullmutante keinen Nierenphänotyp zeigt, wurde in beiden Nullmutanten Apoptose als Haupteffekt diagnostiziert (Schorle et al., 1996; Moser et al., 1997a; Zhang et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass AP-2 $\alpha$  zumindest im *Ascl1*-getriebenen konditionellen Knockout die Proliferation in AP-2 $\beta$ -negativen sympathischen Vorläuferzellen kontrolliert. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Proliferation ist in der Arbeit von Boshier et al. (1996) zu finden. In dieser Studie wurden die AP-2-Gene als Induktor der Zellproliferation beschrieben. Zusätzlich konnte in AP-2 $\alpha$ -negativen Fibroblasten eine reduzierte Zellproliferation festgestellt werden, was unmittelbar mit einer verstärkten Expression von KLF-4 („Krüppel-like factor-4“) einhergeht. Das KLF-4-Gen wird mit Signalwegen in Verbindung gebracht die Zellproliferation hemmen und die terminale Differenzierung und Apoptose fördern (Pfisterer et al., 2002). Dieser Regelmechanismus wäre auch in sich entwickelnden und terminal differenzierten Neuronen denkbar.

Dagegen stehen jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass die AP-2-Proteine in der Zellzyklusinhibition involviert sind. Die Arbeit von Eilers et al. (1991) zeigte beispielsweise, dass *c-myc* ebenfalls ein Regulator der Zellproliferation ist und den Eintritt in die G1 Phase des Zellzyklus induzieren kann. Die Induktion der Expression von D2-Zyklinen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Im *D2-Zyklin*-Gen ist ein kombiniertes E-Box/AP-2 cis-regulatorisches Promotorelement zu finden, das die

Expression des D2-Zyklin steuert und durch *c-myc* aktiviert wird. So hemmt AP-2 $\alpha$  kompetitiv die D2-Zyklin-Expression (Eilers et al., 1991). Außerdem konnte in AP-2 $\beta$ -Nullmutanten gezeigt werden, dass *c-myc*-Zielgene, darunter auch D2-Zyklin-Transkripte, hochreguliert sind (Hilger-Eversheim et al., 2000). Ein weiterer Regelmechanismus von Zellzyklusinhibition, der von AP-2-Genen gesteuert wird, stellt die verstärkte Expression des Zellzyklusinhibitors p21WAF/CIP dar (Michieli et al., 1994). Die AP-2-Aktivität kann durch Phorbolster posttranskriptionell stimuliert werden (Luscher et al., 1989). Da AP-2-Bindungsstellen im p21-Promotor vorhanden sind, konnte in Krebszellen durch Phorbolster-Behandlung gezeigt werden, dass durch eine erhöhte AP-2-Aktivität p21 hochreguliert ist und somit Krebszellwachstum inhibiert wird (Zeng et al., 1997).

Da in den konditionellen Knockouts eine Reduktion von Ki67<sup>+</sup>-Zellen beobachtet wurde, könnten vermutlich die Hinweise aus der Arbeit von Boshier et al. (1996) eher relevant sein als die Hinweise zur Zyklusinhibition der AP-2-Gene. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass selektiv proliferierende Zellen im sympathischen Ganglion in den konditionellen Knockouts in den Zelltod gehen. Daher bleibt der Mechanismus und die Rolle von AP-2 $\alpha$  in sympathischen Neuronen bezüglich der Kontrolle der Proliferation weitgehend offen.

In der konstitutiven Doppelnullmutante wurde ein fast vollständiger Verlust von sympathischen und sensorischen Neuronen beobachtet. Dagegen tritt in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante kein Effekt auf Überleben oder Proliferation sympathischer Neuronen an E 10.5 und E 13.5 auf. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die Reduzierung der Zellzahl auf einem früheren Effekt in Neuralleistenvorläuferzellen beruhen könnte. Um diese Frage zu beantworten wurde der Doppelknockout und die AP-2 $\beta$ -Nullmutante auf einen Effekt in wandernden Neuralleistenzellen hin überprüft.

### **4.3 Die Rolle von AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in Vorläuferzellen der Neuralleiste**

#### **4.3.1 Expression der Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$ in Neuralleistenzellen während der Normalentwicklung**

Die Neuralleistenzellen (NLZ) sind eine migratorische embryonale Zellpopulation, welche sich während der Neurulation, d.h. der Bildung des Neuralrohres aus der Neuralplatte, zwischen dorsalem Neuralrohr und nicht-neuronalem Ektoderm bildet. Die Existenz der Neuralleiste ist spezifisch für Vertebraten. Zellen der Neuralleiste tragen zur Bildung äußerst unterschiedlicher Gewebe bei (Bronner-Fraser, 1993). So entstehen aus der Neuralleiste Neuronen und Gliazellen des PNS, Melanozyten, glatte Muskelzellen, kraniofaziales Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe. Somit weisen die stammzellähnlichen Zellen der Neuralleiste ein enormes Entwicklungspotential auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde bisher beschrieben, dass die Eliminierung beider Transkriptionsfaktoren in der Doppelnullmutante zu einem fast vollständigen Verlust der sympathischen Ganglien führte. Die Eliminierung von AP-2 $\beta$  resultierte dagegen in einem schwächeren Phänotyp. Sowohl in der Doppelnullmutante als auch in der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Nullmutante war die Größe der initialen sympathischen Ganglien bereits bei E 10.5 reduziert. Deshalb wurden Effekte der Eliminierung von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  auf wandernde NLZ, vor der Ausbildung der sympathischen Ganglien, untersucht.

Um die Rolle von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in Vorläuferzellen der Neuralleiste zu charakterisieren, sollte zunächst ihre Expression analysiert werden.

Die Vorläuferzellen der Neuralleiste sind u.a. durch eine Expression von Sox8, 9 und 10 gekennzeichnet (Southard-Smith et al., 1998). Die Sox-Proteine („SRY-related high mobility group (HMG)-Box“) sind durch ihre HMG-Domäne in zehn Untergruppen unterteilt (Bowles et al., 2000). Sox10 wird in der frühen Spezifizierungsphase und während der Migration von NLZ exprimiert und dient daher als Marker (Britsch et al., 2001). Frühere Studien in der Maus zeigten, dass AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  bei E 8 in der Neuralfalte und ab E 10 im PNS exprimiert werden (Moser et al., 1997b; Mitchel et al., 1991; Brewer et al., 2004). Bei diesen Analysen wurden jedoch hauptsächlich „Whole-Mount“-Färbungen durchgeführt, die keine genaue Aussage über die Expression beider Gene während der Wanderung von NLZ im Rumpfbereich zulassen. Datensätze

über den Anteil, wieviele Sox10-positiven Neuralleistenzellen AP-2 $\alpha$ <sup>+</sup> und/oder AP-2 $\beta$ <sup>+</sup> sind, existieren nicht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$  in wandernden NLZ bei E 9.5 exprimiert werden. Zu diesem untersuchten Zeitpunkt sind AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in ca. 60% bzw. 40% der Sox10<sup>+</sup>-NLZ nachzuweisen.

Warum werden die AP-2-Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu Sox10 in einem geringeren Anteil der NLZ exprimiert? Eine naheliegende Erklärung wäre, dass das Expressionsniveau beider Faktoren zumindest teilweise unterhalb der Nachweisgrenze der *in situ*-Hybridisierung liegt. Eine Analyse auf Proteinebene würde eine zusätzliche hilfreiche Einschätzung zur Expression geben.

### 4.3.2 Analyse der AP-2 $\beta$ -defizienten Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die TUNEL-Analyse festgestellt, dass es in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante bereits an E 9.5 zu einer signifikanten Erhöhung apoptotischer Zellen kommt. Die TUNEL<sup>+</sup>-Zellen sind in einem Gebiet lokalisiert, in dem sich die migrierenden präsympathischen Neuralleistenzellen (NLZ) befinden. Die Lage der absterbenden Zellen bei E 9.5 deutet zwar daraufhin, dass der Zelltod kurz nach der Delamination der NLZ eintritt, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Vorläuferzellen bis E 10.5 trotzdem in der Nähe der dorsalen Aorta absterben.

Die Analyse der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -Doppelmutante zeigte, dass die gemeinsame Funktion von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  für die Entstehung sympathischer Neurone *in vivo* essentiell ist. Die Analyse des AP-2 $\beta$ -Knockouts ergab dagegen nur eine Reduktion in der Größe der sympathischen Ganglien um etwa 40%. Da dieser Effekt bereits bei E 10.5 vorhanden war, muss AP-2 $\beta$  bereits zu einem frühen Zeitpunkt für die Entwicklung der Vorläuferzellen sympathischer Neuronen erforderlich sein. Durch die vorliegenden Ergebnisse wird gezeigt, dass beide Faktoren in der Neuralleiste exprimiert werden, und dass AP-2 $\beta$  eine Überlebensfunktion in NLZ besitzt.

Nach ihrer Entstehung delaminieren die NLZ vom Neuroepithelium, migrieren und differenzieren sich in eine breite Vielzahl von unterschiedlichen Gewebszelltypen, wie z.B. die peripheren Neurone, Chromatophoren und Strukturen des Gesichtsskeletts (LeDouarin und Kalcheim, 1999). Eine Reihe von Genen wurden identifiziert, die



essentiell für die Entwicklung von unterschiedlichen Neuralleistenzellderivaten sind, und/oder als Marker für diese dienen. So konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor MITFA für die Entwicklung von Melanozyten essentiell ist und in Vorläuferzellen der Melanozyten exprimiert wird, bevor diese sich differenzieren (Levy et al., 2006). Jedoch wurde aufgrund von Analysen unterschiedlicher Abstammungslinien der Neuralleiste vermutet, dass eine initiale Spezifizierung auf ein Zellschicksal schon vor der Expression dieser identifizierten Gene, die die Abstammungslinien der NLZ definieren, stattgefunden haben muss (Bronner-Fraser und Fraser, 1988; Henion und Weston, 1997). Aus diesem Grund wird postuliert, dass ein noch früheres funktionales regulatorisches Netzwerk in Vorläuferzellen der Neuralleiste existieren muss, welches für die Diversität der Neuralleistenzellderivate verantwortlich ist.

Die Wnt-, BMP- und TGF $\beta$ -Signalwege steuern die Induktion der multipotenten Neuralleistenvorläuferzellen. Während der Spezifizierung von prä-migratorischen NLZ werden eine Reihe von Transkriptionsfaktoren exprimiert, wie FoxD3, Snail/Slug, Id2, Sox9/10 und auch AP-2 $\alpha/\beta$  (Knecht und Bronner-Fraser, 2002). Anschließend werden diese Gene, wie u.a. FoxD3, herunterreguliert und Gene, die für die Migration erforderlich sind, wie u.a. Cadherin 7/11 und Rho-Proteine, hochreguliert (Nieto, 2001).

Da der Transkriptionsfaktor AP-2 $\beta$  sowohl während der Spezifizierung als auch während der Wanderung der NLZ exprimiert wird, ist anzunehmen, dass AP-2 $\beta$  ein Mitglied eines regulatorischen Netzwerks ist, welches die Entwicklung der Neuralleistenzellderivate steuert. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Analyse der AP-2 $\beta^{-/-}$ -Tiere, da in diesen Tieren nur eine Subpopulation von NLZ absterben. Es handelt sich bei dieser Subpopulation um sympathische Vorläuferzellen, da in den AP-2 $\beta$ -Nullmutanten nur die sympathischen Ganglien reduziert sind und nicht die HWG.

Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus bleibt jedoch weitgehend unklar. Es wäre denkbar, dass ein ähnlicher Signalweg zum Zelltod der NLZ führt wie er im Kontext der konditionellen Doppelknockouts diskutiert wurde (Siehe 4.2.4).

Eine Präspezifizierung unterschiedlicher Subtypen setzt voraus, dass diese Zellen auch spezifisch zu den verschiedenen Geweben wandern, d.h. Melanozytenvorläuferzellen in die Haut und sympathoadrenerge Vorläuferzellen zur dorsalen Aorta. Das korrekte Einwandern der totipotenten NLZ ist ein entscheidender Schritt für die Entwicklung des Bauplans der Wirbeltiere, somit auch für die Entstehung der SG und der HWG des PNS. Die NLZ zeichnen sich durch eine hohe

Migrationsfähigkeit aus und das Schicksal ist zum großen Teil abhängig vom Zielort der Wanderung, d.h. der Region, in der sie sich ansiedeln (Gilbert, 2000). Die wandernden Neuralleistenvorläuferzellen der HWG und SG schlagen gemeinsam den ventrolateralen Weg ein, um in ihren Zielgebieten zu kondensieren und zum entsprechenden Neuralleistenderivat zu differenzieren. Der molekulare Mechanismus, der die NLZ in ihre Zielgebiete führt und letztendlich mit verantwortlich für die Differenzierung zu sympathischen oder sensorischen Neuronen ist, bleibt weitgehend ungeklärt.

Hinweise auf eine selektive Expression von Chemokin-Rezeptoren in einer Subpopulation von trunkalen NLZ liefert ein Studie, die in einem Poster auf dem SFN-Kongress (Kasemeier-Kulesa et al., 2009) präsentiert wurde. Die Chemokin-Rezeptoren und ihre Liganden sind verantwortlich, dass Zellen in ihr Zielgebiet einwandern. Zusätzlich wird der Chemokin-Rezeptor während der Differenzierung in Zellen exprimiert und dient daher als Marker. In dieser Studie wurde durch PCR und *in situ*-Hybridisierung beschrieben, dass eine Subpopulation von NLZ den Chemokin-Rezeptor 4 (CXC-Motif, CXCR4) exprimiert, und dass zusätzlich der Agonist für CXCR4, SDF-1 („Stromal cell-derived factor-1“) von Zellen im Bereich der dorsalen Aorta sezerniert wird. Durch konfokale Aufnahmen im Zeitraffer wurden Experimente von *in vivo*-Implantation eines in SDF-1-Proteinlösung getränkten Trägermaterials im Huhn analysiert und es zeigte sich, dass NLZ in die Nähe des SDF-1<sup>+</sup>-Trägermaterials migrieren bzw. sich dort ansammeln. Zusätzlich wurde nach Knockdown der mRNA von CXCR4 in NLZ festgestellt, dass die Migration von NLZ und die Entstehung des sympathischen Ganglions gestört war. Hier wurde beobachtet, dass signifikant weniger CXCR4-shRNA<sup>+</sup>-Zellen in den ventralen Bereich, in dem sich normalerweise die sympathischen Ganglien bilden, einwandern und somit weniger CXCR4<sup>+</sup>-Vorläuferzellen den inneren Kernbereich im sympathischen Ganglion bevölkern. Der innere Kernbereich des sich bildenden SG ist als Region bekannt in der sympathische CXCR4<sup>+</sup>-Vorläuferzellen lokalisiert sind, die in die neuronale Differenzierung gehen. Zusätzlich wurde dokumentiert, dass es nach Reduzierung der CXCR4-mRNA zu einer erhöhten Zellzahl im HWG kommt. Die Autoren dieses Posters postulieren, dass der CXCR4/SDF-1-Signalweg eine entscheidende Rolle in der trunkalen Navigation von NLZ spielt und somit dafür verantwortlich ist, aus einer Population von NLZ diejenigen zu sortieren, die sich zu sympathischen Neuronen entwickeln.

Zusätzliche Hinweise zum CXCR4/SDF-1-Signalweg in der Maus liefert die Arbeit von Belmadani et al (2005). Der Chemokin-Rezeptor 4 wird auch in migrierenden NLZ bei E 9.5 in der Maus exprimiert. Zusätzlich wurde festgestellt, dass der Agonist für CXCR4, SDF-1, entlang dem Migrationsweg der Neuralleistenzellen exprimiert wird, die sich zum HWG differenzieren. Durch die Analyse der CXCR4-Nullmutante konnte festgestellt werden, dass es zu einer Reduktion in der Größe der HWG kommt. Es wurde jedoch nicht das sympathische Ganglion untersucht. Die CXCR4<sup>+</sup>-Neuralleistenvorläuferzellen in der Maus bei E 9.5 liegen in dem Bereich, in dem auch AP-2 $\beta$ <sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu finden sind (Belmadani et al., 2005). Zusätzlich wird auch in der Maus SDF-1 im Bereich der dorsalen Aorta exprimiert, sodass nicht nur sensorische, sondern auch sympathische Vorläuferzellen wie im Huhn von diesem Chemokin während der Migration geleitet werden könnten (Belmadani et al., 2005).

In einer unabhängigen Studie von Olesnicky Killian et al. 2009 im Zebrafisch wurde die Rolle von CXCR4a in der Entwicklung und Migration von kranialen Neuralleistenzellen untersucht. Nach einem Verlust von CXCR4a kommt es zu Defekten in der Entwicklung kraniofazialer Strukturen. Interessanterweise lieferte diese Arbeit Hinweise darauf, dass AP-2 $\alpha$  die Expression von CXCR4a reguliert, da in der AP-2 $\alpha$ -Mutante *lockjaw* im Zebrafisch eine Reduktion von CXCR4a festgestellt wurde.

Somit stellt der CXCR4/SDF-1-Signalweg einen potentiellen Mechanismus dar, der von den AP-2-Faktoren in der Maus reguliert werden kann. Da die Entstehung des Hinterwurzelganglions im AP-2 $\beta$ -Knockout nicht betroffen ist, kann von einer Präspezifizierung AP-2 $\beta$ -abhängiger sympathischer Vorläuferzellen ausgegangen werden. Es wäre von besonderem Interesse zu untersuchen, ob CXCR4 und AP-2 $\beta$  in NLZ koexprimiert sind. Wenn ja, sollte der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Knockout auf eine Veränderung in der CXCR4-Expression untersucht werden. Es kann sein, dass wie AP-2 $\alpha$  im Zebrafisch, AP-2 $\beta$  in der Kontrolle der CXCR4-Expression involviert ist. Die sensorischen Ganglien, welche AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  bei E 10.5 exprimieren, sind in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante nicht betroffen, da es sich bei den sensorischen Vorläuferzellen um eine andere Präspezifizierung handeln könnte oder diese Vorläuferzellen nicht mehr AP-2 $\beta$ -abhängig sind.

Die frühe Induktion und Spezifizierung der Neuralleiste ist in der AP-2 $\beta$ -Nullmutante nicht beeinträchtigt. Die Delamination der NLZ verläuft ohne Störung. Dies wird durch die Analyse der Sox10-Expression gezeigt, da Sox10 in den Vorläuferzellen

der Neuralleiste normal exprimiert wird. Die erzielten Ergebnisse sind teilweise in Übereinstimmung mit der AP-2 $\alpha$ -Mutante *lockjaw* im Zebrafisch (Knight et al., 2003). In dieser Zebrafisch-Mutante verläuft die Spezifizierung der prä migratorischen NLZ normal, jedoch fehlen die sympathischen Ganglien komplett während die Entwicklung des HWG nicht beeinträchtigt ist. Somit ist AP-2 $\beta$  in der Maus für das Überleben einer Subpopulation von sympathischen Vorläuferzellen erforderlich. Dagegen ist die Expression von AP-2 $\alpha$  im Zebrafisch essentiell für das Überleben der gesamten Zellpopulation sympathischer Ganglienzellen. Daher übernimmt AP-2 $\beta$  in der Maus nur teilweise die Rolle von AP-2 $\alpha$  im Zebrafisch.

### 4.3.3 Analyse der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -defizienten Maus

In der AP-2 $\beta$ -Nullmutante wurde festgestellt, dass der Verlust von AP-2 $\beta$  zum selektiven Absterben einer Population von Vorläuferzellen sympathischer Neurone führt, sodass man von einer präspezifizierten Population von Sox10<sup>+</sup>-Neuralleistenzellen (NLZ) ausgehen kann. Dass der Verlust von AP-2 $\alpha$  keinen Effekt auf die Entwicklung sympathischer Ganglien hat, könnte dadurch erklärt werden, dass AP-2 $\beta$  den Verlust von AP-2 $\alpha$  kompensieren kann, jedoch nicht umgekehrt, AP-2 $\alpha$  den Verlust von AP-2 $\beta$ . Es stellte sich die Frage, wie sich der Verlust beider Gene auswirkt.

Durch die Analyse der Doppelnullmutante konnte gezeigt werden, dass AP-2 $\beta$  tatsächlich den Verlust von AP-2 $\alpha$  weitgehend kompensiert, und dass der Verlust der sympathischen und sensorischen Ganglien durch Zelltod wandernder NLZ bewirkt wird.

Es ist weitgehend unklar wann der Zelltod ausgelöst wird. Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, dass es in den Doppelmutanten im Vergleich zu den AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tieren zwar auch zum Zelltod in wandernden NLZ kommt, jedoch ist ein wesentlicher Unterschied, dass sich in den Doppelmutanten die Population von Sox10<sup>+</sup>-NLZ signifikant reduziert. Folglich ist zu vermuten, dass ein Absterben von Sox10<sup>+</sup>-NLZ bereits vor der Delamination also im Neuroektoderm stattfindet, oder dass die Expression von Sox10 in den prä migratorischen und wandernden NLZ herunterreguliert wird und daraufhin diese Zellen in den Zelltod gehen. Die Frage, ob die Induktion der NLZ beeinträchtigt ist, bleibt jedoch unbeantwortet.

Hinweise inwiefern die Induktion und die Spezifizierung der NLZ in der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -Doppelmutante beeinträchtigt sein könnte, liefert die Analyse der *foxd3<sup>zdf10</sup>;tfap2<sup>low</sup>*-Zebrafischdoppelmutane in der Arbeit von Arduini et al. (2009). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Foxd3 und AP-2 $\alpha$  in Kombination für die Spezifizierung von Neuralleistenderivaten im Zebrafisch erforderlich sind. Dieser Phänotyp ist einerseits gekennzeichnet durch einen Verlust der Expression der SoxE-Familie in NLZ, wie z.B. Sox10, Sox9 und Sox9a, andererseits zumindest teilweise durch einen p53-ausgelösten Zelltod in Subpopulationen von Neuralleistenvorläuferzellen (Melanophoren). Dagegen verläuft die NLZ-Induktion normal, da die Induktion und die Ausbildung der Grenzen des Neuroektoderms in diesen Doppelmutanten nicht beeinträchtigt ist. Somit wird in dieser Arbeit postuliert, dass der Zelltod nicht allein für den Verlust von Neuralleistenzellderivaten verantwortlich ist, sondern, dass der Verlust eher durch die Bildung eines undefinierten Vorläuferzellstatus von NLZ ausgelöst wird. Interessanterweise wurde zusätzlich beschrieben, dass in der *tfap2<sup>low</sup>*-Zebrafischmutante nur ein Verlust der Hand2<sup>+</sup>-sympathischen Neurone stattfindet.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse in der Maus lassen sich folgenderweise in das Zebrafischmodell einordnen: a) Sowohl im AP-2 $\beta$ -Knockout als auch in der AP-2 $\beta$ /AP-2 $\alpha$ -Doppelmutante ist noch Sox10-Expression in NLZ zu beobachten. Demnach ist die Induktion von NLZ nicht beeinträchtigt und stimmt somit mit den Zebrafischdaten überein. Eine Analyse der AP-2-Doppelmutante auf die Expression von Faktoren (Pax3, Msx1, u.a.), die für die Induktion der NLZ erforderlich sind, könnte diese Interpretation, dass die NLZ-Induktion nicht beeinträchtigt ist, bestätigen. b) Da im AP-2 $\beta$ -Knockout nur die Entstehung sympathischer Neurone beeinträchtigt ist und nicht die der HWG, entspricht dies dem AP-2 $\alpha$ -Einzelknockout im Zebrafisch. Sowohl in der Maus als auch im Zebrafisch ist in diesen Einzelknockouts die initiale Sox-Expression in NLZ nicht beeinträchtigt. c) Der AP-2-Doppelknockout und die *foxd3<sup>zdf10</sup>;tfap2<sup>low</sup>*-Zebrafischdoppelmutane führen zu einem vollständigen Verlust der untersuchten Neuralleistenderivate, was bedeutet, dass die AP-2-Faktoren sowohl in der Maus als auch im Zebrafisch zu einem transkriptionellen Netzwerk gehören, welches die Entstehung der Neuralleistenderivate steuert. Es wäre sehr interessant die FoxD3-Expression in der AP-2-Doppelmutante zu überprüfen, um eine mögliche Rolle bezüglich der Entstehung der Neuralleistenderivate im Kontext der AP-2-Verluststudien in der Maus zu charakterisieren

Bisher wurde eindeutig bewiesen, dass AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in Kombination für das Überleben von NLZ während der Migration und der frühen Phase der Differenzierung des PNS verantwortlich sind. Da die Entwicklung sowohl der sympathischen als auch der sensorischen Ganglien von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  abhängig ist, wäre es interessant zu überprüfen, ob es im Doppelknockout auch zum Verlust der Zellen des enterischen Nervensystems oder der Chromatophoren kommt. Damit wird eine mögliche generelle Rolle der AP-2-Gene in Neuralleistenvorläuferzellen im PNS besser definiert.

Welche Bedeutung besitzen AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  für die Entstehung von sensorischen Neuronen des Hinterwurzelganglion? AP-2 $\beta$  und AP-2 $\alpha$  werden bei E 10.5 auch in Neuronen des HWG exprimiert, allerdings wurde bezüglich der generellen Ganglienentstehung nur ein Effekt im Doppelknockout beobachtet. Dies wurde durch die Analyse der SCG10-Expression dokumentiert. In weiteren spezifischeren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob in den AP-2-Einzelknockouts bestimmte Gene mit Funktion oder Faktoren, die ein Neuron des HWG charakterisieren, betroffen sind. Ein naheliegender Kandidat hierfür ist das Neuropeptid Y (NPY).

Das NPY ist ein Neuropeptid, das sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem exprimiert ist. NPY ist physiologisch u.a. an der präsynaptischen Regulation von Neurotransmittern beteiligt (Li et al., 2000). Die Aktivierung des Promoters von NPY und dessen Expression wird durch den NGF-Signalweg über AP-2 $\alpha$  reguliert (Li et al., 2000). Der Mechanismus, wie NGF die Aktivität von AP-2 $\alpha$  reguliert, bleibt weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spielt der NGF-Rezeptor-TrkA eine Rolle in der Regulierung von AP-2 $\alpha$ . Sowohl Transkripte vom TrkA als auch von NPY wurden während der Embryogenese und bis ins adulte Alter in Neuronen des HWG in der Maus detektiert (Li et al., 2000; Ernsberger, 2009). In einer kürzlich publizierten Arbeit von Huang et al. (2010) wurde gezeigt, dass nach dem konditionellen Dicer<sup>Wnt1Cre</sup>-Knockout einerseits die Expression von TrkA und andererseits von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  reduziert ist. Es wurde postuliert, dass die gestörte Genexpression dieser Marker für die Reduktion der NPY-Expression verantwortlich ist. Es wäre denkbar, dass die AP-2 $\alpha$ - oder AP-2 $\beta$ -Knockouts zu einer ähnlichen reduzierten Expression von NPY führen.

Trotzdem wäre es möglich, dass im AP-2-Einzelknockout jeweils der andere Transkriptionsfaktor oder weitere Faktoren kompensatorisch wirken und somit keinen Phänotyp im HWG verursachen.

#### 4.4 Die Rolle von AP-2 $\beta$ während der Entwicklung der noradrenergen Neurone des Locus Coeruleus (LC)

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass AP-2 $\beta$  für die Entstehung der noradrenergen Neurone im LC essentiell ist. Da der Marker für Vorläuferzellen des LC (Phox2a) bei E 13.5 nicht nachweisbar ist, handelt es sich nicht um eine reduzierte Differenzierung, sondern um ein Verlust der Zellen des LC.

Da die AP-2 $\alpha$ -Nullmutante durch eine angeborene Schädelspaltbildung (Cranioschisis) gekennzeichnet ist, ist eine Analyse des LC in AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Tieren nicht möglich. Jedoch besteht die Möglichkeit einer Analyse der in dieser Arbeit verwendeten konditionellen AP-2 $\alpha$ -Knockout-Tiere. Diese Tiere zeigten keine Missbildung des Schädels. In den konditionellen AP-2 $\alpha$ -Knockout-Tieren (Ascl1Cre und DBHCre) kann die Funktion von AP-2 $\alpha$  in Ascl1-positiven Vorläuferzellen des LC, als auch in DBH-positiven differenzierten noradrenergen Neuronen untersucht werden. Somit würde zumindest in diesem Zeitraum eine Charakterisierung der Funktion von AP-2 $\alpha$  in der Entstehung noradrenerger Neurone des LC möglich sein.

Weiterhin stellt sich jedoch die Frage warum in AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tieren die noradrenergen Neurone des LC bei E 13.5 fehlen. Eine Erklärung wäre, dass der durch den Verlust von AP-2 $\beta$  wahrscheinlich ausgelöste Zelltod auf einem zellautonomen Effekt in Vorläuferzellen oder noradrenergen Neuronen vor E 13.5 beruht, wie er in der vorliegenden Arbeit in NLZ während der Entstehung sympathischer Neurone beobachtet wurde. Vergegenwärtigt man sich die Entstehung noradrenerger Neurone des LC, stellt man fest, dass es einige Parallelen bezüglich der extrinsischen und intrinsischen Faktoren gibt, welche diese Hypothese unterstützen.

Die initiale Entwicklung (E 9 - E 10.5) und Differenzierung von noradrenergen Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem wird durch die gleichen Signalwege kontrolliert. In beiden Fällen sind BMPs beteiligt, sowie die Transkriptionsfaktoren Ascl1, Phox2a und Phox2b (Pattyn et al., 2000; Guillemot et al., 1993; Hirsch et al., 1998; Lo et al., 1998; Morin et al., 1997; Pattyn et al., 1999; Vogel-Höpker et al., 2002). Im dorsalen Bereich von Rhombomer 1 werden die Vorläuferzellen des LC während der Entwicklung durch BMPs induziert und exprimieren bei E 9 den Vorläuferzellmarker Phox2a (Goridis und Rohrer, 2002; Vogel-Höpker et al., 2002; Pattyn et al., 2000). Einige Stunden später werden Phox2b<sup>+</sup>-Neurone des LC in der

Mantelzone im Bereich von Rhombomer 1 gefunden. Die Expression von Phox2a wird bei adulten Neuronen erhalten. Dagegen ist Phox2b nur transient bis E 13.5 in den Neuronen des LC nachweisbar (Pattyn et al., 2000; Rüdiger et al., 2009). Die DBH-Expression setzt im Prinzip mit der Phox2b-Expression (E 9.5) ein und definiert den noradrenergen Phänotyp (Pattyn et al., 2000).

Die bislang durchgeführte Analyse zeigte, dass AP-2 $\beta$  bei E 13.5 in TH<sup>+</sup>-Zellen des LC und in Zellen außerhalb des LC exprimiert wird. Durch Doppelfärbung von AP-2 $\beta$  und Phox2a und/oder Phox2b zwischen E 9 und E 13.5 an verschiedenen Stadien während der Entwicklung des LC kann geklärt werden, ob AP-2 $\beta$  bereits in Vorläuferzellen der noradrenergen Neurone des LC exprimiert wird. Dann stellt sich die Frage zu welchem Zeitpunkt die Neuronen des LC eliminiert werden.

Aufgrund der bisher vorliegenden Daten ist unklar, ob die Effekte der AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-Tiere auf einen zellautonomen Effekt oder auf einer Störung der lokalen Signale in der Umgebung des sich bildenden Gewebe beruhen. Expressionsanalysen von AP-2 $\beta$  zwischen E 9 und E 13.5 werden Aufschluss darüber geben, ob AP-2 $\beta$  nicht nur bei E 13.5 sondern auch zu früheren Zeitpunkten im umliegenden Gewebe exprimiert ist.

Unterstützt wird diese Vorstellung durch frühere Studien, die zeigen, dass der Verlust von AP-2 $\alpha$  u.a. zur gestörten Augenentwicklung im AP-2 $\alpha$ -Knockout führt (Bassett et al., 2007, 2010). Es wurde beschrieben, dass es schon während der frühen Entwicklung des optischen Vesikels zu Effekten in AP-2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Tieren kommt. Während der frühen Entwicklung des Auges (E 8.75 -E 12.5) wird AP-2 $\alpha$  in der sich entwickelnden Linse exprimiert. Im weiteren Verlauf der Entwicklung des Augenbechers wurde jedoch die Expression von AP-2 $\alpha$  nur noch in postmitotischen amakrinen Zellen festgestellt. AP-2 $\alpha$  wurde in keiner sich teilenden Zelle während der späteren Augenentwicklung (E 13.5, E 14.5, E 15.5 und P2) nachgewiesen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass AP-2 $\alpha$  eher eine Funktion in der späten Differenzierungsphase von amakrinen Zellen besitzt. Da AP-2 $\alpha$  aber während der frühen Phase der Augenentwicklung in der Linse exprimiert ist, wurden Analysen von konditionellen AP-2 $\alpha$ <sup>Pax6Cre</sup>-Knockout-Tieren durchgeführt. In dieser konditionellen Nullmutante wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pax6  $\alpha$  „enhancers“ exprimiert und führt dadurch nur zur Deletion von AP-2 $\alpha$  in Zellen der Neuroretina. Es zeigte sich, dass der Verlust von AP-2 $\alpha$  zu keinem Effekt in der Entwicklung der optischen Neuroepitheliumderivate führt. Somit deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass der Effekt nach Verlust von AP-2 $\alpha$  auf einen nicht-



zellautonomen Effekt zurückzuführen ist. Durch die Analyse des AP-2 $\alpha$ -Knockouts wurde gezeigt, dass der Verlust von AP-2 $\alpha$  beträchtliche Effekte in der Morphogenese und Musterbildung sowohl des Augenbeckers als auch des Augenstiels verursacht. Es stellt sich die Frage, warum der AP-2 $\alpha$ -Knockout eine Störung in der Augenentwicklung verursacht? In der Arbeit von Bassett et al. (2010) wurde die Expression von AP-2 $\alpha$  während der Entwicklung des optischen Vesikels (E 8.75 - E 10.5) im periokkulären Mesenchym beobachtet. AP-2 $\alpha$  ist zusätzlich im Oberflächenektoderm im Bereich des sich bildenden Auges und im Vorderhirn exprimiert. Diese Gewebe sind für die Sezernierung der entsprechenden Signale (u.a. Shh und FGF), die zur korrekten Augenentwicklung notwendig sind, erforderlich. Es wird vermutet, dass der Verlust dieser AP-2 $\alpha$ <sup>+</sup>-Zellpopulationen im AP-2 $\alpha$ -Knockout und damit der Verlust von Signalen im umliegenden Gewebe zur gestörten Ausbildung des Auges führt. Somit wurde in diesen beiden Veröffentlichungen beschrieben, dass der Effekt des AP-2 $\alpha$ -Knockouts auf einem nicht-zellautonomen Effekt beruht, der durch eine Störung im Gewebe der Umgebung des sich entwickelnden Auges gekennzeichnet ist (Bassett et al., 2007, 2010).

Ein ähnliches Szenario wäre auch für AP-2 $\beta$  in der Entwicklung des LC denkbar.

## 4.5 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  einen wesentlichen Beitrag für das Überleben von Neuralleistenvorläuferzellen und sympathischen Neuronen leisten. Während beide Faktoren in Kombination für das Überleben aller sympathischer und sensorischer Neuronen verantwortlich sind, zeigt AP-2 $\beta$  eine selektive Überlebensfunktion für eine Subpopulation sympathischer Vorläuferzellen. Zusätzlich konnte durch die konditionellen Knockouts gezeigt werden, dass die Überlebensfunktion von AP-2 $\beta$  in allen Entwicklungsstadien sympathischer Neuronen teilweise durch AP-2 $\alpha$  kompensiert wird. Da das Expressionsmuster beider Gene in Neuralleistenzellen überlappt, besteht die Möglichkeit, dass die selektiven Überlebenswirkungen von AP-2 $\beta$  nicht durch das räumliche-zeitliche Expressionsmuster erzielt wird, sondern durch funktionelle Unterschiede der Faktoren selbst.

Der molekulare Signaltransduktionsweg zwischen AP-2-Eliminierung und Zelltod bleibt weitgehend ungeklärt. AP-2 $\beta$  spielt eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung und es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Apoptoserate im AP-2 $\beta$ -Knockout für die gestörte Nierenentwicklung verantwortlich ist (Moser et al., 1997a). Es stellte sich heraus, dass das *c-myc*-Gen und das antiapoptotische *bcl-2*-Gen eine entscheidende Rolle im Absterben der Nierenzellen spielen (Moser et al., 1997a). Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine Veränderung in der Expression dieser beiden Gene für den Zelltod der Vorläuferzellen in der Doppelnullmutante und im AP-2 $\beta$ -Knockout verantwortlich sind.

Die Erzeugung von Knockout-Tieren hat wesentlich zur Darstellung der Genfunktion der AP-2-Faktoren während der Embryogenese beigetragen. So konnte durch die vorliegende Arbeit ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Rolle von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  während der Entwicklung des PNS sowohl in Neuralleistenvorläuferzellen als auch in embryonal differenzierten sympathischen Neuronen erarbeitet werden.

AP-2 $\beta$  ist bis E 16.5 in sympathischen Neuronen exprimiert. Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob AP-2 $\beta$  auch postnatal oder im adulten Alter im PNS exprimiert ist. Welche Rolle hat AP-2 $\beta$  in embryonalen oder adulten DBH-positiven differenzierten Neuronen?

Diese Frage könnte durch die Herstellung einer AP-2 $\beta$ -geflochten Maus beantwortet werden. Durch die konstitutive Cre-Expression unter der Kontrolle des *Ascl1*- oder DBH-Promoters wurde zwar eine erwünschte Genrekombination in Vorläuferzellen und differenzierten sympathischen Neuronen erreicht, jedoch schließt dies eine Analyse eines Gens zu einem späten Zeitpunkt z.B. in adulten Tieren aus. Um eine zeitliche Kontrolle zu ermöglichen sollte eine DBHCreERT2-Mauslinie verwendet werden (Tsarovina et al., 2010; Stubbusch et al., 2010). CreERT2 ist ein Fusionsprotein zwischen der Cre und der mutierten Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors. Durch intraperitoneale Injektion von Tamoxifen findet daraufhin Genrekombination nur in noradrenergen Neuronen statt. Tiere mit geflochtenem AP-2 $\beta$  und einer DBHCreERT2 würden eine funktionelle Analyse von AP-2 $\beta$  in postnatalen und adulten sympathischen Neuronen erlauben.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Nervenzellen des PNS entstehen aus undifferenzierten Vorläuferzellen der Neuralleiste nachdem sich diese nach einer initialen Wanderungsphase zu Ganglien zusammengelagert haben. Die Entwicklung sympathischer Neurone wird durch eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren gesteuert (Phox2b, Ascl1, Hand2, Gata2/3, Insm1), die während der Ganglienausbildung erstmals nachzuweisen sind. Die Effekte dieser Faktoren auf verschiedene Differenzierungsprozesse sind inzwischen gut charakterisiert und ihre Funktion wird zunehmend besser verstanden (Goridis und Rohrer, 2002; Huber, 2006). Dagegen ist die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren, die bereits während der Wanderung der Neuralleistenzellen (NLZ) und später in Nervenzellen exprimiert werden weitgehend unklar. Die vorliegende Arbeit befasste sich mit den Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$ , die sowohl bereits vor Beginn der Neurogenese als auch in differenzierten Neuronen vorhanden sind.

Sowohl AP-2 $\alpha$  als auch AP-2 $\beta$  sind in wandernden NLZ vorhanden. In der Entwicklung sympathischer Neurone wurde die Expression von AP-2 $\alpha$  bis E13.5, die Expression von AP-2 $\beta$  bis E 16.5 beobachtet. In sensorischen Ganglien des Hinterwurzelganglions (HWG) sind beide AP-2-Transkriptionsfaktoren bei E 10.5 vorhanden, wobei AP-2 $\alpha$  gegenüber AP-2 $\beta$  stärker exprimiert wird. Beide AP-2-Gene werden in der weiteren Entwicklung der HWG herunterreguliert. Zur Analyse der Funktion der Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  wurden sympathische Ganglien von Mausembryonen untersucht bei denen AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  oder beide Gene eliminiert wurden.

Die Ausschaltung beider Gene führte zum fast vollständigen Verlust sympathischer und sensorischer Ganglien. Die sympathischen und sensorischen Ganglien in AP-2 $\alpha$ -defizienten Embryonen entwickeln sich normal. Somit lag der Fokus dieser Doktorarbeit verstärkt auf der Funktion von AP-2 $\beta$ . Zusätzlich zur konstitutiven Eliminierung von AP-2 $\beta$  wurde AP-2 $\alpha$  zu zwei verschiedenen Entwicklungszeitpunkten durch konditionelle AP-2 $\alpha$ -Knockouts in sympathischen Vorläuferzellen und unreifen sympathischen Neuronen ausgeschaltet.

In Abwesenheit von AP-2 $\beta$  enthalten die sympathischen Ganglien bereits unmittelbar nach ihrer Entstehung (E10.5) ca 40% weniger sympathische Neuronen als im Wildtyp. Im weiteren Verlauf der Entwicklung bleibt die Zellzahl unverändert, was darauf schließen lässt, dass AP-2 $\beta$  in differenzierten sympathischen Neuronen keine Funktion für das Überleben hat, bzw. dass diese Faktoren durch AP-2 $\alpha$  kompensiert werden. Die konditionelle Eliminierung von AP-2 $\alpha$  in sympathischen Vorläuferzellen (durch *Ascl1Cre*) und in embryonalen differenzierten sympathischen Neuronen (durch *DBHCre*) führte tatsächlich zu einer weiteren Reduzierung der Anzahl von Neuronen. Die Überlebensfunktion von AP-2 $\beta$  in sympathischen Neuronen wird also durch AP-2 $\alpha$  kompensiert und ist daher nur in den konditionellen Doppelknockouts (AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ *Ascl1Cre*<sup>+</sup> und AP-2 $\beta^{-/-}$ /AP-2 $\alpha^{fl/fl}$ *DBHCre*<sup>+</sup>) nachweisbar. Dagegen wurde die postulierte spezifische Rolle von AP-2 $\beta$  in der Kontrolle des noradrenergen Markergens DBH nicht bestätigt (Hong et al., 2008).

Die bereits bei E 10.5 reduzierte Zahl sympathischer Neuronen im AP-2 $\beta$ -Knockout wurde auf eine selektive Überlebensfunktion von AP-2 $\beta$  in wandernden NLZ zurückgeführt. Da im AP-2 $\beta$ -Knockout nur sympathische, nicht jedoch sensorische Ganglien betroffen sind, zeigen diese Daten, dass eine Präspezifizierung von wandernden NLZ zu sympathischen Neuronen zu differenzieren von AP-2 $\beta$  abhängt. Der vollständige Verlust sympathischer und sensorischer Ganglien im Doppelknockout beruht ebenfalls auf einem frühen Überlebenseffekt in wandernden NLZ.

Zusätzlich wurde eine essentielle Funktion von AP-2 $\beta$  für die Entwicklung der noradrenergen Neuronen des Locus Coeruleus demonstriert. Die aus früheren *in vitro*-Studien (Kim et al., 2001) implizierte spezifische Rolle von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  in der Expression noradrenerger Markergene (Tyrosinhydroxylase, Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase) wurde somit weder im PNS noch im ZNS bestätigt.

## 6. LITERATURANGABEN

- Alvarez Martinez, C. E.,** R. Binato, et al. (2002). „Characterization of a Smad motif similar to Drosophila mad in the mouse Msx 1 promoter.“ *Biochem Biophys Res Commun* 291(3): 655-662.
- Anderson, D. J.** (1994). „Stem cells and transcription factors in the development of the mammalian neural crest.“ *FASEB J* 8(10): 707-713.
- Arduini, B. L.,** K. M. Bosse, et al. (2009). „Genetic ablation of neural crest cell diversification.“ *Development* 136(12): 1987-1994.
- Aybar, M. J.,** M. A. Nieto, et al. (2003). „Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the Xenopus neural crest.“ *Development* 130(3): 483-494.
- Bang, A. G.,** N. Papalopulu, et al. (1999). „Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm.“ *Dev Biol* 212(2): 366-380.
- Barrallo-Gimeno, A.,** J. Holzschuh, et al. (2004). „Neural crest survival and differentiation in zebrafish depends on mont blanc/tfap2a gene function.“ *Development* 131: 1463-1477.
- Bassett, E. A.,** T. Williams, et al. (2010). „AP-2alpha knockout mice exhibit optic cup patterning defects and failure of optic stalk morphogenesis.“ *Hum Mol Genet* 19(9): 1791-1804.
- Battiste, J.,** A. W. Helms, et al. (2007). „Ascl1 defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord.“ *Development* 134(2): 285-293.
- Bellmeyer, A.,** J. Krase, et al. (2003). „The protooncogene c-myc is an essential regulator of neural crest formation in xenopus.“ *Dev Cell* 4(6): 827-839.
- Belmadani, A.,** P. B. Tran, et al. (2005). „The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors.“ *J Neurosci* 25(16): 3995-4003.
- Birnboim, H. C. und J. Doly** (1979). „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.“ *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Borycki, A. G.,** J. Li, et al. (1999). „Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation.“ *Development* 126(8): 1665-1674.
- Bosher, J. M.,** N. F. Totty, et al. (1996). „A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma.“ *Oncogene* 13: 1701-1707.

- Bowles, J.,** G. Schepers, et al. (2000). „Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators.“ *Dev Biol* 227(2): 239-255.
- Brewer, S.,** W. G. Feng, et al. (2004). „Wnt1-Cre-mediated deletion of AP-2a causes multiple neural crest-related defects.“ *Dev.Biol.* 267: 135-152.
- Brewer, S.,** X. Jiang, et al. (2002). „Requirement for AP-2a in cardiac outflow tract morphogenesis.“ *Mech.Dev.* 110: 139-149.
- Britsch, S.,** D. E. Goerich, et al. (2001). „The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development.“ *Genes Dev* 15(1): 66-78.
- Bronner-Fraser, M.** (1993). „Neural development: crest destiny.“ *Curr Biol* 3(4): 201-203.
- Bronner-Fraser, M. und S. E. Fraser** (1988). „Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells.“ *Nature* 335(6186): 161-164.
- Campuzano, S. und J. Modolell** (1992). „Patterning of the Drosophila nervous system: the achaete-scute gene complex.“ *Trends Genet* 8(6): 202-208.
- Chazaud, C.,** M. Oulad-Abdelghani, et al. (1996). „AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis.“ *Mech.Dev.* 54: 83-94.
- Chen, D.,** M. Zhao, et al. (2004). „Bone morphogenetic proteins.“ *Growth Factors* 22(4): 233-241.
- Cheung, M.,** M. C. Chaboissier, et al. (2005). „The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination.“ *Dev Cell* 8(2): 179-192.
- Chiang, C.,** L. T. T. Ying, et al. (1996). „Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function.“ *Nature* 383: 407-413.
- Coelho, D. J.,** D. J. Sims, et al. (2005). „Cell type-specific and sexually dimorphic expression of transcription factor AP-2 in the adult mouse brain.“ *Neuroscience* 134(3): 907-919.
- Coppola, E.,** A. Pattyn, et al. (2005). „Reciprocal gene replacements reveal unique functions for Phox2 paralogous homeobox genes during neural differentiation.“ *EMBO J.* 24: 4392-4403.
- Craven, S. E.,** K.-C. Lim, et al. (2004). „Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog.“ *Development* 131: 1165-1173.
- Cserjesi, P.,** D. Brown, et al. (1995). „Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development.“ *Dev.Biol.* 170: 664-678.

- Danielian, P. S.**, D. Muccino, et al. (1998). „Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase.“ *Curr Biol* 8(24): 1323-1326.
- Dasen, J. S.**, S. M. O'Connell, et al. (1999). „Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types.“ *Cell* 97: 587-598.
- Davidson, D.** (1995). „The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes.“ *Trends Genet* 11(10): 405-411.
- del Barrio, M. G. und M. A. Nieto** (2002). „Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation.“ *Development* 129(7): 1583-1593.
- Dimou, L.**, L. Schnell, et al. (2006). „Nogo-A-deficient mice reveal strain-dependent differences in axonal regeneration.“ *J Neurosci* 26(21): 5591-5603.
- Dubreuil, W.**, M. R. Hirsch, et al. (2002). „The role of Phox2b in synchronizing pan-neuronal and type-specific aspects of neurogenesis.“ *Development* 129: 5241-5253.
- Echelard, Y.**, G. Vassileva, et al. (1994). „Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS.“ *Development* 120: 2213-2224.
- Eckert, D.**, S. Buhl, et al. (2005). „The AP-2 family of transcription factors.“ *Genome Biology* 6: 246.
- Eilers, M.**, S. Schirm, et al. (1991). „The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene.“ *EMBO J* 10(1): 133-141.
- Endo, Y.**, N. Osumii, et al. (2003). „Deltex/Dtx mediates NOTCH signaling in regulation of BMP4 expression in cranial neural crest formation during avian development.“ *Development, Growth and Differentiation* 45: 241-248.
- Erickson, J. D.**, H. Varoqui, et al. (1994). „Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a „cholinergic“ gene locus.“ *J Biol Chem* 269(35): 21929-21932.
- Ernsberger, U.**, H. Patzke, et al. (1997). „The developmental expression of choline acetyltransferase (ChAT) and the neuropeptide VIP in chick sympathetic neurons: evidence for different regulatory events in cholinergic differentiation.“ *Mech.Dev.* 68: 115-126.
- Ernsberger, U.**, H. Patzke, et al. (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): 125-136.

- Ernsberger, U. und H. Rohrer** (1999). „Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons.“ *Cell Tissue Res.* 297: 339-361.
- Ernsberger, U.** (2009). „Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia.“ *Cell Tissue Res* 336(3): 349-384.
- Firulli, A. B.** (2003). „A HANDful of questions: the molecular biology of the heart and neural crest derivatives (HAND)-subclass of basic helix-loop-helix transcription factors.“ *Genes* 312: 27-40.
- Franchini, K. G. und Cowley, A. W.** (2004). „Neurogenic Control of Blood Vessels, In: Primer On The Autonomic Nervous System.“ Robertson, D. Seite 139-143. London: Elsevier Academic Press.
- Galliot, B., C. de Vargas, et al.** (1999). „Evolution of homeobox genes: Q50 paired-like genes founded the paired class.“ *Development, Genes and Evolution* 209: 186-197.
- Garcia-Castro, M. I., C. Marcelle, et al.** (2002). „Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer.“ *Science* 297: 848-851.
- Gaubatz, S., A. Imhof, et al.** (1995). „Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2.“ *EMBO J* 14(7): 1508-1519.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al.** (1992). „Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.“ *J Cell Biol* 119(3): 493-501.
- Gibbins, I. L. und M. Schemann** (1995). „Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in sympathetic and parasympathetic pathways of guinea-pigs.“ *Proceedings of the Australian Neuroscience Society* 8: 81.
- Gilbert SF.** (2003). „Developmental Biology.“ Seventh Edition, Sinauer Associates Inc.
- Goridis, C. und H. Rohrer** (2002). „Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons.“ *Nat.Rev.Neurosci.* 3: 531-541.
- Greco, D., E. Zellmer, et al.** (1995). „Transcription factor AP-2 regulates expression of the dopamine b-hydroxylase gene.“ *J.Neurochem.* 65: 510-516.
- Guillemot, F., L.-C. Lo, et al.** (1993). „Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons.“ *Cell* 75: 463-476.
- Guo, S., J. Brush, et al.** (1999). „Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein soulless/Phox2a.“ *Neuron* 24: 555-566.



- Hamill, R. W. und Shapiro, R. E.** (2004). „Peripheral Autonomic Nervous System, In: Primer On The Autonomic Nervous System.“ Robertson, D. Seite 20-28. London: Elsevier Academic Press.
- Hargrove, J. L. und F. H. Schmidt** (1989). „The role of mRNA and protein stability in gene expression.“ *FASEB J* 3(12): 2360-2370.
- Helms, A. W., J. Battiste, et al.** (2005). „Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons.“ *Development* 132(12): 2709-2719.
- Hendershot, T. J., H. Liu, et al.** (2008). „Conditional deletion of Hand2 reveals critical functions in neurogenesis and cell type-specific gene expression for development of neural crest-derived noradrenergic sympathetic ganglion neurons.“ *Dev Biol* 319(2): 179-191.
- Henion, P. D. und J. A. Weston** (1997). „Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage.“ *Development* 124(21): 4351-4359.
- Higgins D.,** Lein P., Osterhout D., Johnson M. I. (1991) „Tissue culture of autonomic neurons. In: *Culturing nerve cells*“, Ed 1 (Banker G, Goslin K, eds), pp 177-205. Cambridge, MA: MIT.
- Hilger-Eversheim, K.,** M. Moser, et al. (2000). „Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control.“ *Gene* 260(1-2): 1-12.
- Hirsch, M. R.,** M. C. Tiveron, et al. (1998). „Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system.“ *Development* 125: 599-608.
- Höltke, H. J.,** G. Sagner, et al. (1992). „Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications.“ *Biotechniques* 12(1): 104-113.
- Höltke, H. J.,** R. Seibl, et al. (1990). „Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. II. Optimization of the digoxigenin system.“ *Biol Chem Hoppe Seyler* 371(10): 929-938.
- Holzschuh, J.,** A. Barrallo-Gimeno, et al. (2003). „Noradrenergic neurons in zebrafish hindbrain are induced by retinoic acid and require tfap2a for expression of the neurotransmitter phenotype.“ *Development* 130: 5741-5754.
- Hong, S. J.,** C.-H. Kim, et al. (2001). „Structural and functional characterization of the 5' upstream promotor of the human Phox2a gene: possible direct transactivation by transcription factor Phox2b.“ *J. Neurochem.* 79: 1225-1236.
- Hong, S. J.,** T. Lardaro, et al. (2008). „Regulation of the noradrenaline neurotransmitter phenotype by the transcription factor AP-2beta.“ *J Biol Chem* 283(24): 16860-16867.

- Honoré, S. M.**, M. J. Aybar, et al. (2003). „Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos.“ *Dev.Biol.* 260: 79-96.
- Howard, M. J.**, D. N. Foster, et al. (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: 62-77.
- Howard, M. J.**, M. Stanke, et al. (2000). „The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification.“ *Development* 127: 4073-4081.
- Huang, T.**, Y. Liu, et al. (2010). „Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice.“ *J Mol Cell Biol* 2(3): 152-163.
- Huber, K.** (2006). „The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives.“ *Dev Biol* 298(2): 335-343.
- Ikeya, M.**, S. M. K. Lee, et al. (1997). „Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors.“ *Nature* 389: 966-970.
- Jasoni, C. L.**, M. B. Walker, et al. (1994). „A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system.“ *Development* 120: 769-783.
- Kala, K.**, M. Haugas, et al. (2009). „Gata2 is a tissue-specific post-mitotic selector gene for midbrain GABAergic neurons.“ *Development* 136(2): 253-262.
- Kalcheim, C. und M.-A. Teillet** (1989). „Consequences of somite manipulation on the pattern of dorsal root ganglion development.“ *Development* 106: 85-93.
- Kandel, E. R.**, Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2000). „Principles of neural science.“ McGraw-Hill Publishing Co.
- Karis, A.**, I. Pata, et al. (2001). „Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear.“ *J.Comp.Neurol.* 429: 615-630.
- Karunaratne, A.**, M. Hargrave, et al. (2002). „GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord.“ *Dev.Biol.* 249: 30-43.
- Kasemeier-Kulesa, J. C.**, P. M. Kulesa, et al. (2005). „Imaging neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia.“ *Development* 132: 235-245.
- Kasemeier-Kulesa, J. C.**, R. McLennan, et al. (2009). „CXCR4 controls ventral migration of sympathetic precursor cells.“ *Neuroscience 2009 Poster*: 219.7/A28.

- Kim, H.-S.**, H. Seo, et al. (1998). „Noradrenergic-specific transcription of the dopamine b-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites.“ *J.Neurosci.* 18: 8247-8260.
- Kim, H. S.**, S. J. Hong, et al. (2001). „Regulation of the tyrosine hydroxylase and dopamine b-hydroxylase genes by the transcription factor AP-2.“ *J.Neurochem.* 76: 280-294.
- Kim, J.**, L. Lo, et al. (2003). „SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells.“ *Neuron* 38(1): 17-31.
- Knecht, A. K. und M. Bronner-Fraser** (2002). „Induction of the neural crest: a multigene process.“ *Nat Rev Genet* 3(6): 453-461.
- Knight, R. D.**, Y. Javidan, et al. (2005). „AP2-dependent signals from the ectoderm regulate craniofacial development in the zebrafish embryo.“ *Development* 132: 3127-3138.
- Knight, R. D.**, S. Nair, et al. (2003). „lockjaw encodes a zebrafish tfap2a required for early neural crest development.“ *Development* 130: 5755-5768.
- LaBonne, C. und M. Bronner-Fraser** (1998). „Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model.“ *Development* 125: 2403-2414.
- LaBonne, C. und M. Bronner-Fraser** (2000). „Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration.“ *Dev.Biol.* 221: 195-205.
- Landis, S. C.** (1988). Neurotransmitter plasticity in sympathetic neurons and its regulation by environmental factors in vitro and in vivo. *Handbook of chemical neuroanatomy, Vol.6: The peripheral nervous system.* A. Björklund, T. Hökfelt and C. Owman, ELSEVIER: 65-115.
- Le Douarin, N.** (1982). *The neural crest.* Cambridge London, New York, Cambridge University Press.
- Le Douarin, N. M.**, S. Creuzet, et al. (2004). „Neural crest cell plasticity and its limits.“ *Development* 131: 4637-4650.
- Le Douarin, N. M. und E. Dupin** (2003). „Multipotentiality of the neural crest.“ *Current Opinion in Genetics and Development* 13: 529-536.
- Le Douarin, N. M. und C. Kalcheim** (1999). *The neural crest.* Cambridge, Cambridge University Press.
- Lee, H. Y.**, M. Kleber, et al. (2004a). „Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells.“ *Science* 303(5660): 1020-1023.

- Lee, Y. H.**, Y. Aoki, et al. (2004b). „Early requirement of the transcriptional activator Sox9 for neural crest specification in *Xenopus*.“ *Dev Biol* 275(1): 93-103.
- Levy, C.**, M. Khaled, et al. (2006). „MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene.“ *Trends Mol Med* 12(9): 406-414.
- Li, B. S.**, P. R. Kramer, et al. (2000). „Molecular cloning, expression, and characterization of rat homolog of human AP-2alpha that stimulates neuropeptide Y transcription activity in response to nerve growth factor.“ *Mol Endocrinol* 14(6): 837-847.
- Li, M.**, Y. Wang, et al. (2006). „Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2alpha and activates HER-2/neu gene in breast cancer.“ *Int J Cancer* 118(4): 802-811.
- Liem, K. F.**, G. Tremml, et al. (1995). „Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm.“ *Cell* 82: 969-979.
- Lim, K.-C.**, G. Lakshmanan, et al. (2000). „Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system.“ *Nature Genetics* 25: 209-212.
- Lo, L.-C.**, J. E. Johnson, et al. (1991). „Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells.“ *Genes & Development* 5: 1524-1537.
- Lo, L.**, E. L. Dormand, et al. (2005). „Late-emigrating neural crest cells in the roof plate are restricted to a sensory fate by GDF7.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(20): 7192-7197.
- Lo, L. C.**, M. C. Tiveron, et al. (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.
- Lucas, M. E.**, F. Müller, et al. (2006). „The bHLH transcription factor hand2 is essential for noradrenergic differentiation of sympathetic neurons.“ *Development* 133: 4015-4024.
- Luo, T.**, Y. H. Lee, et al. (2003). „Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2a.“ *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100: 532-537.
- Luo, T.**, M. Matsuo-Takasaki, et al. (2002). „Transcription factor AP-2 is an essential and direct regulator of epidermal development in *Xenopus*.“ *Dev Biol* 245(1): 136-144.
- Luscher, B.**, P. J. Mitchell, et al. (1989). „Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers.“ *Genes Dev* 3(10): 1507-1517.
- Mallet, J.**, L. Houhou, et al. (1998). „The cholinergic locus: ChAT and VACHT genes.“ *J Physiol Paris* 92(2): 145-147.

- Massagué, J.** (2000). „How cells read TGF-beta signals.“ *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 169-178.
- Massagué, J.** (1998). „TGF-b signal transduction.“ *Ann.Rev.Biochem.* 67: 753-791.
- McFadden, D. G.,** A. C. Barbosa, et al. (2005). „The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner.“ *Development* 132: 189-201.
- McFadden, D. G.,** J. McAnally, et al. (2002). „Misexpression of dHAND induces ectopic digits in the developing limb bud in the absence of direct DNA binding.“ *Development* 129: 3077-3088.
- Meulemans, D. und M. Bronner-Fraser** (2002). „Amphioxus and lamprey AP-2 genes: implications for neural crest evolution and migration patterns.“ *Development* 129(21): 4953-4962.
- Michieli, P.,** M. Chetid, et al. (1994). „Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway.“ *Cancer Res* 54(13): 3391-3395.
- Mitchell, P. J.,** P. M. Timmons, et al. (1991). „Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis.“ *Genes & Development* 5: 105-119.
- Mitchell, P. J.,** C. Wang, et al. (1987). „Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen.“ *Cell* 50(6): 847-861.
- Monsoro-Burq, A. H.,** E. Wang, et al. (2005). „Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction.“ *Dev Cell* 8(2): 167-178.
- Moriguchi, T.,** N. Takako, et al. (2006). „Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation.“ *Development* 133(19): 3871-3881.
- Morikawa, Y.,** F. D'Autreaux, et al. (2007). „Hand2 determines the noradrenergic phenotype in the mouse sympathetic nervous system.“ *Dev Biol* 307(1): 114-126.
- Morikawa, Y.,** A. Zehir, et al. (2009). „BMP signaling regulates sympathetic nervous system development through Smad4-dependent and -independent pathways.“ *Development* 136(21): 3575-3584.
- Morin, X.,** H. Cremer, et al. (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.,** S. E. Perez, et al. (2000). „Transient notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells.“ *Cell* 101: 499-510.
- Moser, M.,** A. Imhof, et al. (1995). „Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta.“ *Development* 121(9): 2779-2788.

- Moser, M., A. Pscherer, et al. (1997a).** „Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2b.“ *Genes & Development* 11: 1938-1948.
- Moser, M., J. Rüschoff, et al. (1997b).** „Comparative analysis of AP-2a and AP-2b gene expression during murine embryogenesis.“ *Dev.Dyn.* 208: 115-124.
- Müller, F. und H. Rohrer (2002).** „Molecular control of ciliary neuron development: BMPs and downstream transcriptional control in the parasympathetic lineage.“ *Development* 129: 5707-5717.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987).** „Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.“ *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Nakata, K., T. Nagai, et al. (1997).** „Xenopus Zic3, a primary regulator both in neural and neural crest development.“ *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 11980-11985.
- Nardelli, J., D. Thiesson, et al. (1999).** „Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system.“ *Dev.Biol.* 210: 305-321.
- Nieto, M. A. (2001).** „The early steps of neural crest development.“ *Mech Dev* 105(1-2): 27-35.
- Nottoli, T., S. Hagopian-Donaldson, et al. (1998).** „AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13714-13719.
- Olesnicky Killian, E. C., D. A. Birkholz, et al. (2009).** „A role for chemokine signaling in neural crest cell migration and craniofacial development.“ *Dev Biol* 333(1): 161-172.
- Park, G. T. und M. I. Morasso (2002).** „Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates Dlx3 through Smad1 and Smad4: alternative mode for Dlx3 induction in mouse keratinocytes.“ *Nucleic Acids Res* 30(2): 515-522.
- Patient, R. K. und J. D. McGhee (2002).** „The GATA family (vertebrates and invertebrates).“ *Current Opinion in Genetics and Development* 12: 416-422.
- Pattyn, A., C. Goridis, et al. (2000).** „Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b.“ *Molecular and Cellular Neuroscience* 15: 235-243.
- Pattyn, A., F. Guillemot, et al. (2006).** „Delays in neuronal differentiation in Mash1/Ascl1 mutants.“ *Dev Biol* 295(1): 67-75.
- Pattyn, A., X. Morin, et al. (1999).** „The homeobox gene Phox2b is essential for the development of all autonomic derivatives of the neural crest.“ *Nature* 399: 366-370.
- Pattyn, A., X. Morin, et al. (1997).** „Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis.“ *Development* 124: 4065-4075.

- Patzke, H.,** E. Reissmann, et al. (2001). „BMP growth factors and Phox2 transcription factors can induce synaptotagmin I and neurexin I during sympathetic neuron development.“ *Mech.Dev.* 108: 149-159.
- Pfisterer, P.,** J. Ehlermann, et al. (2002). „A subtractive gene expression screen suggests a role of transcription factor AP-2 alpha in control of proliferation and differentiation.“ *J Biol Chem* 277(8): 6637-6644.
- Potzner, M. R.,** K. Tsarovina, et al. (2010). „Sequential requirement of Sox4 and Sox11 during development of the sympathetic nervous system.“ *Development* 137(5): 775-784.
- Reiff, T.,** K. Tsarovina, et al. (2010). „Neuroblastoma phox2b variants stimulate proliferation and dedifferentiation of immature sympathetic neurons.“ *J Neurosci* 30(3): 905-915.
- Reissmann, E.,** U. Ernsberger, et al. (1996). „Involvement of bone morphogenetic proteins-4 and-7 in the specification of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons.“ *Development* 122: 2079-2088.
- Rüdiger, R.,** E. Binder, et al. (2009). „In vivo role for CREB signaling in the noradrenergic differentiation of sympathetic neurons.“ *Mol Cell Neurosci* 42(2): 142-151.
- Schmidt, M.,** S. Lin, et al. (2009). „The bHLH transcription factor Hand2 is essential for the maintenance of noradrenergic properties in differentiated sympathetic neurons.“ *Dev Biol* 329(2): 191-200.
- Schneider, C.,** H. Wicht, et al. (1999). „Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons.“ *Neuron* 24: 861-870.
- Schorle, H.,** P. Meier, et al. (1996). „Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development.“ *Nature* 381: 235-238.
- Shah, N. M.,** A. K. Groves, et al. (1996). „Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFb superfamily members.“ *Cell* 85: 331-343.
- Sharova, L. V.,** A. A. Sharov, et al. (2009). „Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells.“ *DNA Res* 16(1): 45-58.
- Silbernagl, S.,** Despopoulos, A (2001). „Taschenatlas der Physiologie.“ Thieme Verlag.
- Sonnenberg-Riethmacher, E.,** M. Miehe, et al. (2001). „Development and degeneration of dorsal root ganglia in the absence of the HMG-domain transcription factor Sox10.“ *Mech Dev* 109(2): 253-265.

- Southard-Smith, E. M.,** L. Kos, et al. (1998). „Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model.“ *Nat Genet* 18(1): 60-64.
- Spokony, R. F.,** Y. Aoki, et al. (2002). „The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*.“ *Development* 129(2): 421-432.
- Srivastava, D.,** P. Cserjesi, et al. (1995). „A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis.“ *Science* 270: 1995-1999.
- Srivastava, D.,** T. Thomas, et al. (1997). „Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND.“ *Nature Genetics* 16: 154-160.
- Stanke, M.,** C. V. Duong, et al. (2006). „Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp130 signaling.“ *Development* 133: 141-150.
- Stanke, M.,** D. Junghans, et al. (1999). „The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons.“ *Development* 126: 4087-4094.
- Stanke, M.,** J. Stubbusch, et al. (2004). „Interaction of Mash1 and Phox2b in sympathetic neuron development.“ *Molecular and Cellular Neuroscience*.
- Steventon, B.,** C. Carmona-Fontaine, et al. (2005). „Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival.“ *Semin Cell Dev Biol* 16(6): 647-654.
- Stubbusch, J.,** A. Majdazari et al (2010). „Generation of the tamoxifen-inducible DBH-Cre transgenic mouse line DBH-CT.“ *Genesis*, eingereicht.
- Suzuki, A.,** N. Ueno, et al. (1997). „*Xenopus* msx1 mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4.“ *Development* 124(16): 3037-3044.
- Swanson, D. J.,** M. Adachi, et al. (2000). „The homeodomain protein Arix promotes protein kinase A-dependent activation of the dopamine b-hydroxylase promoter through multiple elements and interaction with the coactivator cAMP-response element-binding protein-binding protein.“ *J.Biol.Chem.* 275: 2911-2923.
- Swanson, D. J.,** E. Zellmer, et al. (1997). „The homeodomain protein arix interacts synergistically with cyclic AMP to regulate expression of neurotransmitter biosynthetic genes.“ *J.Biol. Chem.* 272: 27382-27392.
- Theiler, K.** (1989). „The House Mouse: Atlas of Embryonic Development.“ Springer-Verlag, New York.
- Tribulo, C.,** M. J. Aybar, et al. (2003). „Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification.“ *Development* 130(26): 6441-6452.



- Tribulo, C.**, M. J. Aybar, et al. (2004). „A balance between the anti-apoptotic activity of Slug and the apoptotic activity of msx1 is required for the proper development of the neural crest.“ *Dev Biol* 275(2): 325-342.
- Trudel, M.**, V. D'Agati, et al. (1991). „C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice.“ *Kidney Int* 39(4): 665-671.
- Tsarovina, K.**, A. Pattyn, et al. (2004). „Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development.“ *Development* 131: 4775-4786.
- Tsarovina, K.**, T. Reiff, et al. (2010). „The Gata3 transcription factor is required for the survival of embryonic and adult sympathetic neurons.“ *J Neurosci*, in Druck.
- Valarché, I.**, J.-P. Tissier-Seta, et al. (1993). „The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype.“ *Development* 119: 881-896.
- van der Wees, J.**, M. A. van Looij, et al. (2004). „Hearing loss following Gata3 haploinsufficiency is caused by cochlear disorder.“ *Neurobiol Dis* 16(1): 169-178.
- van Doorninck, J. H.**, J. Van der Wees, et al. (1999). „GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei.“ *J. Neurosci.* 19 RC12: 1-8.
- Varley, J. E.**, R. G. Wehby, et al. (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.“ *Developmental Dynamics* 203: 434-447.
- Vega, S.**, A. V. Morales, et al. (2004). „Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death.“ *Genes Dev* 18(10): 1131-1143.
- Veis, D. J.**, C. M. Sorenson, et al. (1993). „Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair.“ *Cell* 75(2): 229-240.
- Vogel-Höpker, A. und H. Rohrer** (2002). „The development of noradrenergic locus coeruleus (LC) neurons depends on bone morphogenetic proteins (BMPs).“ *Development*.
- Wakil, A. E.**, C. Francius, et al. (2006). „The GATA2 transcription factor negatively regulates the proliferation of neuronal progenitors.“ *Development* 133: 2155-2165.
- Wang, Q.**, T. R. Chan, et al. (2003). „Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition.“ *J Am Chem Soc* 125(11): 3192-3193.
- Weiss, M. J. und S. H. Orkin** (1995). „GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis.“ *Experimental Hematology* 23: 99-107.

- White, P. M. und D. J. Anderson** (1999). „In vivo transplantation of mammalian neural crest cells into chick hosts reveals a new autonomic sublineage restriction.“ *Development* 126: 4351-4363.
- Wiggan, O., M. P. Fadel, et al.** (2002). „Pax3 induces cell aggregation and regulates phenotypic mesenchymal-epithelial interconversion.“ *J Cell Sci* 115(Pt 3): 517-529.
- Wildner, H., M. S. Gierl, et al.** (2008). „Insm1 (IA-1) is a crucial component of the transcriptional network that controls differentiation of the sympatho-adrenal lineage.“ *Development* 135(3): 473-481.
- Williams, T. und R. Tjian** (1991a). „Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins.“ *Science* 251(4997): 1067-1071.
- Williams, T. und R. Tjian** (1991b). „Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2.“ *Genes Dev* 5(4): 670-682.
- Xu, H. M., A. B. Firulli, et al.** (2003). „HAND2 synergistically enhances transcription of dopamine- $\beta$ -hydroxylase in the presence of Phox2a.“ *Dev. Biol.* 262: 183-193.
- Yang, C., H.-S. Kim, et al.** (1998). „Paired-like Homeodomain Proteins, Phox2a and Phox2b, Are Responsible for Noradrenergic Cell-Specific Transcription of the Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase Gene.“ *J. Neurochem.* 71: 1813-1826.
- Young, P., L. Qiu, et al.** (2008). „Single-neuron labeling with inducible Cre-mediated knockout in transgenic mice.“ *Nat Neurosci* 11(6): 721-728.
- Zeng, Y. X., K. Somasundaram, et al.** (1997). „AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression.“ *Nat Genet* 15(1): 78-82.
- Zhang, J., S. Hagopian-Donaldson, et al.** (1996). „Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2.“ *Nature* 381: 238-241.
- Zhao, F., T. Lufkin, et al.** (2003). „Expression of TFap2d, the gene encoding the transcription factor AP-2d, during mouse embryogenesis.“ *Gene Expression Patterns* 3: 213-217.

## 7. ANHANG

### 7.1 AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>-defiziente Mäuse

	<b>E 10.5</b>	<b>E 13.5</b>	<b>E 16.5</b>
<b>TH</b>	56±6	63±7	59±3
<b>DBH</b>	62±7	65±4	59±5
<b>Phox2b</b>	64±8	54±8	58±6
<b>GATA3</b>	60±3	50±5	63±5
<b>Hand2</b>	64±4	47±2	64±5
<b>SCG10</b>	66±9	52±3	62±9

Tabelle 1: Reduktion der Fläche von TH<sup>+</sup>-, DBH<sup>+</sup>-, Phox2b<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, Hand2<sup>+</sup>- und SCG10<sup>+</sup>- Zellen (% der Kontrolle)

### 7.2 AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-DBHCre<sup>+</sup>-Nullmutante

	<b>E 13.5</b>	<b>E 16.5</b>
<b>TH</b>	64±7	34±5
<b>DBH</b>	63±7	37±3
<b>Phox2b</b>	66±4	38±5
<b>GATA3</b>	61±3	39±3
<b>Hand2</b>	62±4	35±3
<b>SCG10</b>	80±3	39±5

Tabelle 2: Reduktion der Fläche von TH<sup>+</sup>-, DBH<sup>+</sup>-, Phox2b<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, Hand2<sup>+</sup>- und SCG10<sup>+</sup>- Zellen (% der Kontrolle)

### 7.3 AP-2 $\beta$ <sup>-/-</sup>/AP-2 $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>-Ascl1Cre<sup>+</sup>-Nullmutante

	<b>E 10.5</b>	<b>E 13.5</b>
<b>TH</b>	67±3	31±6
<b>DBH</b>	58±5	31±4
<b>Phox2b</b>	63±6	32±3
<b>GATA3</b>	65±5	36±4
<b>Hand2</b>	67±5	25±4
<b>SCG10</b>	60±4	38±4

Tabelle 3: Reduktion der Fläche von TH<sup>+</sup>-, DBH<sup>+</sup>-, Phox2b<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, Hand2<sup>+</sup>- und SCG10<sup>+</sup>- Zellen (% der Kontrolle)

---

## ERKLÄRUNG

Die Präparation der Zervical- und Stellarganglien aus E 12,5, E 13.5, E 16.5, E 18.5 Mausembryonen und P90 Mäusen wurde von Afsaneh Majdazari durchgeführt (Seite 34).

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

.....  
Mirko Schmidt

Frankfurt am Main, den.....