



Institut für Säugetiergenetik, GSF-Forschungszentrum,
Neuherberg

**Molekularbiologische und embryologische Analyse
des neuronalen Phänotyps der Mausmutante *Dll1^{lacZ}***

Dipl. Biol. univ. Kurt Wunsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. R. Balling
2. Univ.- Prof. Dr. A. Gierl
3. Univ.- Prof. Dr. K. D. Pfeffer

Die Dissertation wurde am 18.04.00 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 29.05.00 angenommen.

(C) Copyright 2000 Kurt Wunsch

The images within this document are free for non-commercial use, as long as this copyright remains.

Danksagung

Besonderer Dank gebührt

**Herrn Prof. Rudi Balling und Herrn Dr. Martin Hrabè de Angelis.
Ohne deren Verständnis und Unterstützung ich nicht in der Lage gewesen
wäre, meine Promotion zu beenden.**

**Weiterhin danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Rudi Balling für die
Übernahme der Betreuung meiner Promotion an der
Technischen Universität München**

Ich danke ferner allen meinen Kollegen der „Delta“-Arbeitsgruppe:

Meinem Gruppenleiter Herrn Dr. Martin Hrabè de Angelis für die Möglichkeit meine wissenschaftliche Arbeit bei zahlreichen Gelegenheiten präsentieren zu dürfen;

Herrn Dr. Gerhard Przemeck für seine Hilfsbereitschaft, die Bereitstellung der Daten der „Floorplate-Zählung“ und für sein Engagement im „Probelesen“ meiner Dissertation;

Frau Sabine Manz für die Aufrechterhaltung der *Dll1^{lacZ}*-Mauszucht und ihrem Beitrag zu einem funktionierenden Laborablauf.

Ich danke auch allen meinen Laborkollegen der „Arbeitsgruppe Balling“ für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich bei meinem Laborkollegen Herrn Dipl. Biol. Ralf Kist, der mir ein echter Freund wurde und dessen Zusammenarbeit ich vermissen werde, für die Versorgung mit med. chin. Kräutern.

Ich danke Herrn Dr. Ulrich Heinzmann für seine Mitarbeit und für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch für die Hilfsbereitschaft und die hervorragende Mitarbeit der Tierpfleger des „Kleintierhauses“.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer dessen medizinischer Rat maßgebend zur Verbesserung meiner gesundheitlichen Verfassung beigetragen hat.

In diesem Sinn danke ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. C. Franke für seine unkomplizierte Art und Bereitschaft individuelle Therapieansätze zu verfolgen.

Ich danke meinem Freund und Arzt für trad. chin. Medizin Dietmar Wohl, der mir in meiner schweren Zeit als geduldiger Gesprächspartner und Arzt zur Seite stand.

Ich danke herzlich auch meinem Onkel Mr. Kwong Shun Man für seine aufopfernde, unkonventionelle Art mich zu behandeln und für seine väterliche Fürsorge während meines Aufenthalts in China.

An dieser Stelle bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern. Ihre liebevolle Fürsorge und Unterstützung waren mir immer eine große Hilfe auf meinem bisherigen Lebensweg. Danke auch an meine Restfamilie für ihre Anteilnahme in meiner schweren Zeit.

Ein liebes Dankeschön geht an Frau Leb. Chem. Antje Krazeisen.

Mein Dank gilt auch meinem Freund Dr. Markus Goese für dessen ausgesprochene Gastfreundschaft während meiner schweren Zeit.

Ich danke meinem Freund Dr. Jürgen Krauter für dessen logistischen Support und seine Integrität.

Zu guter letzt danke ich all dem Leben, das sich für die wissenschaftlichen Erkenntnisse und zum Zwecke meiner Promotion geopfert hat und bitte um Vergebung.

„ scold the soul 2 bold 2 hold this feeling”

by 

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung:	1
1.1.	Die Notch-Signaltransduktion	2
1.1.1.	Die Liganden	2
1.1.2.	Die Rezeptoren	3
1.1.3.	Die Effektoren	4
1.1.4.	Die Zielgene	4
1.1.5.	Determinierung des Zellschicksals durch Notch-Signaltransduktion	5
1.1.5.1.	Laterale Inhibition und Repression.....	5
1.1.5.2.	Laterale Spezifizierung.....	6
1.1.5.3.	Laterale Induktion.....	6
1.1.6.	Notch-Signaltransduktion in Regionalisierung und Kompartimentalisierung ...	7
1.1.7.	Verbindung der Notch-Signaltransduktion zu anderen Signaltransduktionswegen.....	8
1.1.7.1.	Interaktion mit dem Wg-(Wnt)-Signaltransduktionsweg	8
1.1.7.2.	Interaktion mit dem EGF-Signaltransduktionsweg	8
1.2.	Neuronale Entwicklung des spinalen ZNS und des PNS in Vertebraten	10
1.2.1.	Entwicklung des spinalen ZNS	10
1.2.1.1.	Neuronale Induktion	10
1.2.1.2.	Neurulation	10
1.2.1.3.	Neuronale Differenzierung im Neuralrohr	11
1.2.2.	Die Entwicklung des Peripheren Nervensystems (PNS).....	14
1.2.2.1.	Induktion der Neuralleistenzellen.....	14
1.2.2.2.	Differenzierung der Neuralleistenzellen.....	15
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	18
2.	Materialien und Methoden.....	19
2.1.	Techniken der Mausezucht und Genexpressionsanalysen	19
2.1.1.	Mausstamm.....	19
2.1.2.	Embryogenerierung	20
2.1.3.	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung von Mausembryonen.....	21
2.1.4.	“Whole-mount” Immunocytochemie	23
2.1.5.	Nachweis der Zellproliferation durch BrdU-Markierung.....	24

2.2.	Histologische Techniken und Mikroskopie.....	25
2.2.1.	Cryotom-Einbettung und Histologie	25
2.2.2.	Semidünnschnitte	25
2.2.3.	Rasterelektronenmikroskopie.....	26
2.2.4.	Mikroskopie und digitale Bildverarbeitung.....	26
2.3.	Bakterielle Techniken.....	27
2.3.1.	Bakterienstämme	27
2.3.2.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> K12 Bakterienstämme für CaCl ₂ Transfektion	27
2.3.3.	CaCl ₂ Transfektion von kompetenten <i>E. coli</i> K12 Bakterien.....	27
2.3.4.	Plasmid Maxipräparation.....	28
2.3.5.	<i>E. coli</i> K12 Gefrierkulturen.....	29
2.4.	Bezugsquellen.....	29
2.4.1.	Chemikalien:.....	29
2.4.2.	Molekularbiologische Produkte:	29
2.4.3.	cDNA Klone für die Expressionsanalyse:.....	29
3.	Ergebnisse	31
3.1.	<i>Dll1</i> Expression im ZNS und PNS von E9.5 und E10.5 wildtyp Embryonen	31
3.2.	Morphologische Veränderungen im Neuroepithel der <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten.....	32
3.3.	Veränderte Expression von Notch-Signaltransduktionsgenen im ZNS homozygoter <i>Dll1^{lacZ}</i> Embryonen.....	34
3.4.	Herabregulierung von <i>Hes-5</i> und Überexpression von proneuralen Genen im ZNS homozygoter <i>Dll1^{lacZ}</i> Embryonen.....	38
3.5.	<i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten zeigen Veränderungen in der neuronalen Differenzierung des ZNS.....	41
3.5.1.	Veränderungen im ventralen ZNS der <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten	42
3.5.1.1.	Vergrößerte <i>Floorplate</i> und verstärkte Antwort auf SHH-Signalisierung im ventralen ZNS der <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten	42
3.5.1.2.	Verfrühte Differenzierung von Motoneuronen im ventralen Neuralrohr der <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten.....	44
3.5.2.	Reduktion medialer Neuralrohrmarker und Verlust ventraler Interneuronen im <i>Dll1^{lacZ}</i> mutanten Neuralrohr.....	47
3.5.3.	Veränderungen im dorsalen Neuralrohr der <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten.....	50

3.5.3.1.	Unveränderte Expression dorsaler ZNS Marker im homozygoten <i>Dll1^{lacZ}</i> Neuralrohr und Überexpression proneuraler Marker	50
3.5.3.2.	Reduktion der <i>Wnt1</i> , <i>Wnt3a</i> Expression in der <i>Roofplate</i> der <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten.....	52
3.6.	<i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten zeigen Veränderungen in der PNS Entwicklung.....	54
3.6.1.	Verlust bestimmter sensorischer und Überexpression autonomer Vorläuferzellen des PNS in <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten	54
3.6.2.	Verlust von spät migrierenden Neuralleistenzellen und deren Derivate in <i>Dll1^{lacZ}</i> Mutanten.....	58
4.	Diskussion.....	62
4.1.	Verfrühte Zelldifferenzierung führt zur Instabilität des Neuroektoderms.....	62
4.2.	Dll1 Funktion ist an der d/v-Suborganisation des Neuralrohres beteiligt	64
4.3.	Partielle Substitution von <i>Dll1</i> durch <i>Dll3</i>	68
4.4.	<i>Dll1</i> und das laterale Inhibitionsmodell.....	71
4.5.	Erhöhte Shh Responsivität im ventralen Neuralrohr	71
4.6.	Verlust ventraler Interneuronen.....	73
4.7.	Reduktion von sezernierten <i>Roofplate</i> -Faktoren beeinflusst die neuronale Differenzierung im dorsalen <i>Dll1^{lacZ}</i> Neuralrohr.....	75
4.8.	Wnts und Dll1 Interaktion	76
4.9.	Dll1 Beteiligung an der Segregation sensorischer PNS-Vorläuferzelllinien.....	77
4.10.	Erschöpfung des Neuralleisten-Stammzellpools	79
4.11.	Ausblicke	81
4.12.	Spekulationen	82
5.	Zusammenfassung.....	83
6.	Abkürzungen.....	84
7.	Glossar.....	85
8.	Literaturverzeichnis	87

**Tao produzierte das Eine.
Das Eine produzierte die Zwei.
Die Zwei produzierte die Drei.
Und die Drei produzierte die 10 tausend Dinge.
Die 10 tausend Dinge tragen das Yin und umfassen das Yang
und durch das Verschmelzen des Qi erzielen sie Harmonie.**
(Lao Zi, Toa-te Ching, ca. 400 v. Chr.)

1. Einleitung:

Die Entwicklung einer befruchteten Eizelle zu einem vielzelligen, dreidimensionalen Organismus von charakteristischer Form und Größe wird vor allem durch die koordinierte Expression und Repression von Genen ermöglicht. Diese genetischen Programme bestimmen das entwicklungsspezifische Schicksal der einzelnen Zellen. Das enge Zusammenspiel zwischen Zellproliferation, Apoptose, Migration, Wachstum und Differenzierung führt letztendlich zum präzisen Aufbau von Zellverbänden und Organen.

Sezernierte Botenstoffe, sowie zellautonome, intrinsische Faktoren dirigieren die Zellen hierbei in bestimmte entwicklungsspezifische Richtungen. Oft werden die selben Signaltransduktionswege für Entwicklung und Differenzierung verschiedener Systeme innerhalb eines Organismus verwendet. Wie diese intrinsischen und extrinsischen Faktoren miteinander interagieren um verschiedene Zelltypen hervorzurufen, ist die zentrale Frage der Entwicklungsbiologie.

Die Erforschung der während der Entwicklung ablaufenden Vorgänge dient nicht nur dem Verständnis der Funktionalität der einzelnen Systeme eines Organismus, sondern bildet auch die Grundlage für die Entwicklung von spezifisch wirksamen Methoden zur Erkennung von Krankheiten und genetischen Defekten (Moore, 1999).

Einen Einblick in die biologischen Abläufe während der Entwicklung ermöglichen Modelorganismen, denen auf molekularbiologischem Wege entweder zusätzliche Kopien eines bestimmten Genes hinzugefügt, oder in denen die Kopien eines bestimmten Genes in ihrer Funktionalität zerstört („knock-out“) wurden. Weitere Möglichkeiten zur Generierung von mutanten Organismen ermöglichen chemische Mutagenisierung und sogenannte „Gene Trap Approaches“ (Galli-Taliadoros *et al.*, 1995; Grunwald and Streisinger, 1992; Hrabe de Angelis and Balling, 1998; Wurst *et al.*, 1995)

In allen Fällen wird das feine Netzwerk der natürlichen Genregulation gestört. Die Analyse der mutanten Phänotypen lässt dadurch eine Interpretation der Funktion der jeweiligen Gene

in ihrem natürlichen Kontext zu bzw. ermöglicht die Entdeckung von neuen Genen, bzw. Interaktionspartnern in Signaltransduktionswegen.

In dieser Arbeit wurde die Beteiligung des, während der Vertebratenentwicklung sehr vielseitig verwendeten, „Notch-Signaltransduktionsweges“ an der neuronalen Entwicklung betrachtet. Für die Analyse diente eine Mauslinie in der das *Delta-like-1 (Dll1)* Gen durch das bakterielle *lacZ* Gen ersetzt wurde („knock-in“) (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997).

1.1. Die Notch-Signaltransduktion

Die Notch-Signaltransduktion ist evolutionär sehr ursprünglich und nimmt in der Metazoenentwicklung (in Organismen wie der Fliege, über den Seeigel bis hin zum Menschen) eine fundamentale Rolle ein. Es handelt sich dabei um einen Zellinteraktionsmechanismus in dem Signale in einer Art Ligand-Rezeptor-Signaltransduktion zwischen benachbarten Zellen ausgetauscht werden.

Schematisch läuft die Notch-Signaltransduktion folgendermaßen ab: Die **Liganden** einer Zelle binden an die **Rezeptoren** einer benachbarten Zelle. Die dadurch aktivierten Rezeptoren vermitteln mit Hilfe von **Effektoren** das Signal in den Kern der Rezeptorzelle, wo die Expression von **Zielgenen** aktiviert wird (**Abb. 1.1**).

1.1.1. Die Liganden

Die Liganden der Notch-Signaltransduktion werden in die Metazoen umfassende Gruppe der **DSL**-Transmembranproteine eingeordnet. In diese Gruppe wurden ursprünglich **Delta** und **Serrate** aus *Drosophila* (Fleming *et al.*, 1990; Kopczynski *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1991), sowie **LAG-2** aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Lambie and Kimble, 1991) eingeordnet. Weitere Mitglieder der DSL Gruppe finden sich in *C.elegans*, sowie in zahlreichen verschiedenen Vertebratenspezies, wie z.B. **Dll1** in der Maus (Appel and Eisen, 1998; Bettenhausen *et al.*, 1995; Chitnis *et al.*, 1995; Dunwoodie *et al.*, 1997; Henrique *et al.*, 1995; Jen *et al.*, 1997; Lindsell *et al.*, 1995; Mello *et al.*, 1994; Myat *et al.*, 1996)

Im N-terminalen Bereich der DSL-Proteine finden sich zahlreiche „EGF-like“ Motivwiederholungen, deren Anzahl im direkten Vergleich der DSL-Proteine zueinander stark variieren kann. Obwohl die meisten DSL-Proteine relativ wenige Sequenzhomologien aufweisen, besitzen sie alle ein gruppenspezifisches Motiv im N-terminalen Bereich. Dieses sequenzspezifische Motiv ist die „DSL-Domäne“. Studien belegen, dass bereits ein Minimalfragment aus dem N-terminalen Bereich und der DSL-Domäne ausreichen, um die Aktivierung des Rezep-

tors Notch auszulösen (Fehon *et al.*, 1990; Fitzgerald and Greenwald, 1995; Henderson *et al.*, 1997; Lieber *et al.*, 1992; Muskavitch, 1994).

1.1.2. Die Rezeptoren

Die Rezeptoren des Notch-Signaltransduktionsweges sind die „EGF-like“ Motivwiederholung tragenden **L**NG-Transmembranproteine. Die ersten isolierten Mitglieder dieser Proteingruppe waren **L**IN-12 von *C. elegans*, **N**otch von *Drosophila* und **G**LP-1 von *C. elegans* (Greenwald, 1985; Wharton *et al.*, 1985). Vertebraten *Notch* Homologe wurden in der Maus, in Xenopus, im Hühnchen und im Menschen gefunden (Lardelli *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 1994; Uyttendaele *et al.*, 1996; Weinmaster *et al.*, 1991).

Das 300-kD große Notch Protein wird im Trans-Golgi-Apparat postranslational durch eine „Furin“-ähnliche Konvertase gespalten und als Heterodimer auf der Zelloberfläche präsentiert (Blaumueller *et al.*, 1997; Logeat *et al.*, 1998). Mutationsanalysen zeigten, dass mindestens noch zwei weitere Proteine an der Reifung des Notch Proteins beteiligt sind, die ADAM Metalloprotease Kuzbanian (Kuz) und die Preseniline. Letztere sind nachweislich an der Entstehung der Alzheimer Krankheit beteiligt (De Strooper *et al.*, 1999; Hardy and Israel, 1999; Struhl and Greenwald, 1999; Wolfe *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999).

Die extrazellulären N-terminalen „EGF-like“ Motivwiederholungen sind notwendig für die Interaktion mit der DSL-Domäne der Liganden (Rebay *et al.*, 1991). Es gibt Hinweise, dass für eine funktionelle Aktivierung des Notch-Rezeptors *in vivo* eine Dimerisierung sowohl des Rezeptors als auch der Liganden vorliegen muss (Lieber *et al.*, 1993; Muskavitch, 1994). Weiterhin wird beobachtet, dass die aktive Signaltransduktion mit einer Endozytose des Rezeptor-Ligand-Komplexes in die Signal-empfangende Zelle verbunden ist (Henderson *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 1994; Parks *et al.*, 1995; Seugnet *et al.*, 1997).

Die Signaltransduktion läuft über den zytoplasmatischen Teil des Notch-Rezeptors. Dieser trägt sechs wichtige cdc10/ANKYRIN Motive (Kodoyianni *et al.*, 1992; Roehl and Kimble, 1993; Shawber *et al.*, 1996). Zahlreiche Studien am *Drosophila* Notch Rezeptor weisen darauf hin, dass nach Ligand-Rezeptor-Bindung der C-terminale Bereich (mit cdc10/ANKYRIN Motiven) proteolytisch abgespalten und zusammen mit einem Effektorprotein (CLS-Protein) in den Kern transloziert wird (Jarriault *et al.*, 1995; Kopan *et al.*, 1996; Shawber *et al.*, 1996).

ren des Signaltransduktionsweges sind das Protein Fringe (Fng) und das Membranprotein Numb. Fng agiert als negativer Regulator von Ser, während Numb in der Lage ist die Notch-Aktivität zu unterbinden.

Die Metalloprotease Kuzbanian (Kuz) ist an der Prozessierung von Dl und wahrscheinlich auch N beteiligt. Weiterhin sind die trans-Golgi Konvertase Furin und die Preseniline an der posttranslationalen Prozessierung von N beteiligt. (Darüber hinaus gibt es noch weitere nicht aufgeführte Modulatoren, für eingehendere Informationen siehe Artavanis-Tsakonas, et al. 1999)

1.1.5. Determinierung des Zellschicksals durch Notch-Signaltransduktion

1.1.5.1. Laterale Inhibition und Repression

Als **laterale Inhibition** bezeichnet man das Phänomen, dass innerhalb eines gleichwertigen Zellverbandes ab einem gewissen Zeitpunkt in der Entwicklung nur bestimmte Zellen des Verbandes in ein anderes Entwicklungsschicksal geführt werden und diese selbst die ähnliche Differenzierung ihrer unmittelbaren Nachbarn in das gleiche Schicksal verhindern. Dadurch entsteht eine räumlich und zeitlich begrenzte Differenzierung bestimmter Zellen.

In *Drosophila* Notch- und Delta-Mutanten entwickeln sich alle neuroektodermalen Zellen in neuronale Vorläuferzellen, was auf das Fehlen der lateralen Inhibition auf Grund der nicht funktionellen Notch-Signaltransduktion zurückzuführen ist (**Abb. 1.2**). Arbeiten an Zebrafisch Delta-D Mutanten, sowie in der Maus als auch im Hühnchen ließen vermuten, dass in der Vertebraten ZNS Neurogenese die Notch-Signaltransduktion unter anderem an einer räumlich und zeitlich bedingten **lateralen Repression** von neuronalen Stammzellen beteiligt ist (Appel and Eisen, 1998; de la-Pompa *et al.*, 1997; Henrique *et al.*, 1995).

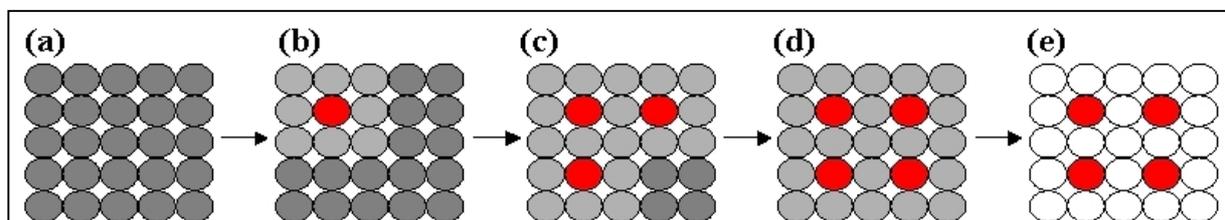


Abbildung 1.2: Spezifizierung des Neuroektoderms von *Drosophila* durch laterale Inhibition:

(a) Zu Anfang besitzen alle Zellen die gleiche Potenz. Jede Zelle empfängt und signalisiert in gleichem Maße durch Notch und Delta. (b) Auf Grund zufälliger Veränderungen in der Expressionsrate beginnt eine Zelle des Verbandes (rote Schattierung) mehr Delta Protein (Signal) zu produzieren. Die benachbarten Zellen (hellere Schattierung) werden durch das höhere Signal veranlasst ihre eigene *Delta* Expression zu verringern (**laterale Inhibition**). Sie besitzen dadurch verhältnismäßig mehr Notch-Protein und werden zu „Rezeptor“-Zellen (c) Die restliche Musterung des Zellverbandes ist jetzt festgelegt. Die Zellen, die an viele „Rezeptor“-Zellen grenzen,

besitzen dabei eine höhere Wahrscheinlichkeit „signalisierende“ Zellen zu werden. (d) Die so determinierten Zellen besitzen unterschiedliche Potenz und werden letztendlich (e) zu Zellen verschiedenen Schicksals. Im Falle des Neuroektoderms von *Drosophila* werden die signalisierenden „Delta-Zellen“ zu Neuroblasten und die empfangenden „Notch-Zellen“ zu Epidermoblasten. (adaptiert von (Greenwald and Rubin, 1992))

1.1.5.2. Laterale Spezifizierung

Die **laterale Spezifizierung** ist ein weiteres Phänomen. Der Unterschied hierbei ist, dass die Notch-Signaltransduktion nicht nur wie bei der lateralen Inhibition zwischen gleichwertigen Zellen eines Verbandes auftritt, sondern auch sekundär zwischen benachbarten nicht äquivalenten Zellen.

Ein Beispiel lateraler Spezifizierung findet sich in der Entwicklung der sensorischen Borsten von *Drosophila*. Die sensorische-Borsten-Vorläuferzelle (SOP) teilt sich dabei zuerst asymmetrisch, so dass nur eine der Tochterzellen das Membranprotein Numb erhält. In der Numb-„positiven“ Tochterzelle wird die Notch-Aktivität durch Numb unterbunden, während die zweite Tochterzelle Notch aktiviert und ein anders Zellschicksal annimmt. Die Tochterzellen teilen sich abermals, wobei wiederum Numb asymmetrisch verteilt wird und wieder eine Notch-abhängige Zelldeterminierung stattfindet, mit dem Ergebnis des fertigen Organs aus einem Paar Borsten- und Wurzelzelle, sowie Nerven- und Scheidenzelle (Frise *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1996; Spana and Doe, 1996).

Zahlreiche weitere Systeme in verschiedenen Spezies wurden gefunden, die die Notch-Signaltransduktion für die Zellspezifikation während der Entwicklung verwenden (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 1987; Kimble and Simpson, 1997).

1.1.5.3. Laterale Induktion

Die **laterale Induktion** unterscheidet sich von den bereits beschriebenen Prozessen dadurch, dass die Notch-Signaltransduktion zwischen von vornherein verschiedenen Zellen bzw. Zellverbänden abläuft, wobei die beteiligten Zellen entweder nur die LNG-Rezeptoren oder nur die DSL-Liganden exprimieren.

Beispielsweise wird in der Entwicklung der Keimbahn von *C. elegans* der Ligand LAG-2 nur von der signalisierenden „Distal tip“ Zelle exprimiert, während die Expression des Rezeptors

GLP-1 auf das Keimbahngewebe beschränkt bleibt (Crittenden *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1994; Henderson *et al.*, 1994; Mickey *et al.*, 1996).

1.1.6. Notch-Signaltransduktion in Regionalisierung und Kompartimentalisierung

Die Notch-Signaltransduktion wird im entwickelnden Organismus aber nicht nur für die Spezifizierung bzw. Induktion einzelner Zellen in ein bestimmtes Zell(linien)schicksal verwendet. Vielmehr findet sich die Notch-Signaltransduktion auch bei der Regionalisierung und Kompartimentalisierung während der Entwicklung bestimmter Organsysteme. Hierbei können zusätzliche Einflüsse auf die Notch-Signaltransduktion durch Modulatorproteine und Einflüsse anderer Signaltransduktionsmechanismen beobachtet werden.

Während der Entwicklung des *Drosophila* Flügels spielt die Notch-Signaltransduktion eine zentrale Rolle in der dorso-ventralen (d/v) Kompartimentalisierung und der Ausbildung der d/v-Grenze (Klein and Arias, 1998b). Dabei wird das Serrate (Ser) Protein im dorsalen Kompartiment des sich entwickelnden Flügels exprimiert. Die Ser-„positiven“ dorsalen Zellen aktivieren Notch in Zellen auf der ventralen Seite der d/v-Grenze. Delta (Dl) wird im ventralen Kompartiment exprimiert und aktiviert Notch in Zellen dorsal der d/v-Grenze (de Celis and Bray, 1997; Diaz- Benjumea and Cohen, 1995; Doherty *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1994).

Auch an der Segmentierung der sich entwickelnden *Drosophila* Extremitäten ist die Notch-Signaltransduktion beteiligt. Hierbei werden *fng*, *Ser* und *Dl* in abwechselnder Weise in den entwickelnden Beinsegmenten exprimiert. Mutationen in diesen Genen führen jeweils zur Fusionierung von Beinsegmenten und dem Fehlen von Gelenken (Marsh and Theisen, 1999; Rauskolb and Irvine, 1999).

Vergleichbar scheinen die Vorgänge während der Vertebratensomitogenese (Jiang *et al.*, 1998b; McGrew and Pourquie, 1998). Somiten sind mesodermale Kompartimente die paarweise entlang der Notochorda durch Segmentierung des presomitischen Mesoderms ausgebildet werden. Derivate der Somiten sind beispielsweise das Körperskelett und die gestreifte Muskulatur des Körpers (Gossler and Hrabe de Angelis, 1998).

Hier werden Notch-Signaltransduktionsgene ebenfalls in einem wiederholendem segmentspezifischen Muster exprimiert. Mutationen dieser führen zum Verlust der a/p Kompartimentalisierung der Somiten und dem Verlust von Somitengrenzen (Gossler and Hrabe de Angelis,

1998; Jiang *et al.*, 1998b; McGrew and Pourquie, 1998). Bislang ist nicht klar, ob die Notch-Signaltransduktion sowohl für die Ausbildung der Somitengrenzen als auch für die a/p Kompartimentalisierung benötigt wird, oder ob einer der beiden Phänotypen den anderen sekundär bedingt.

1.1.7. Verbindung der Notch-Signaltransduktion zu anderen Signaltransduktionswegen

1.1.7.1. Interaktion mit dem Wg-(Wnt)-Signaltransduktionsweg

Zahlreiche genetische Studien weisen darauf hin, dass der Notch- und der Wingless-(wg)-Signaltransduktionsweg auf einer bestimmten Ebene miteinander verknüpft sein müssen (Blair, 1996; Couso *et al.*, 1995; Klein and Arias, 1998a) (**Abb. 1.3**). Jedoch kann die Interaktion verschiedene Gesichter haben und ist abhängig von den jeweils interagierenden Zellen. In einigen Fällen beeinflussen sich die Notch- und wg-Aktivität synergistisch, d.h. beide Signaltransduktionswege leiten in die gleiche entwicklungspezifische Richtung. Während der Flügelentwicklung von *Drosophila* beobachtet man dabei die Expression von wg durch Notch-Aktivierung und Su(H) entlang der Flügelkante (Neumann and Cohen, 1996).

In anderen Fällen findet sich ein antagonistisches Zusammenspiel der beiden Signaltransduktionswege. (**Abb. 1.3-A**) (Axelrod J. D. *et al.*, 1996; Gonzalez-Gaitan and Jackle, 1995). Hinweise für die direkte Interaktion des Wg-Proteins mit dem Notch-Rezeptor bestehen zwar (Martinez Arias, 1998), sind aber noch immer umstritten, zumal bislang in anderen Organismen wie *C. elegans* keine Verbindungspunkte zwischen der LIN-12-Signaltransduktion und dem wg-homologen Signaltransduktionsweg gefunden wurden.

1.1.7.2. Interaktion mit dem EGF-Signaltransduktionsweg

Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der mit der Notch-Signaltransduktion interagieren kann, ist der „Epidermal Growth Factor“ (EGF) Signaltransduktionsweg.

Im sensorischen Chordotonalorgan von *Drosophila* beobachtet man, dass zahlreiche benachbarte Zellen aus dem Ektoderm (proneuralen Cluster (PNC)) für die Entwicklung des Organs rekrutiert werden. Mutationen im EGF-Rezeptor führen zum Verlust der chordotonalen Organe. Man nimmt an, dass die EGF-Signaltransduktion antagonistisch auf die Notch-Signaltransduktion wirkt und durch das außer Kraft setzen der lateralen Inhibition innerhalb

der ektodermalen Vorläuferzellen die Rekrutierung von mehreren benachbarten Zellen aus dem PNC ermöglicht (zur Lage and Jarman, 1999) (Abb.1.3-C).

Weitere Studien zeigen, dass in der *Drosophila* Augenentwicklung sowohl die Notch- als auch die EGF-Signaltransduktion für die sukzessive Determinierung der einzelnen Zelltypen notwendig sind (Cagan and Ready, 1989; Freeman, 1996).

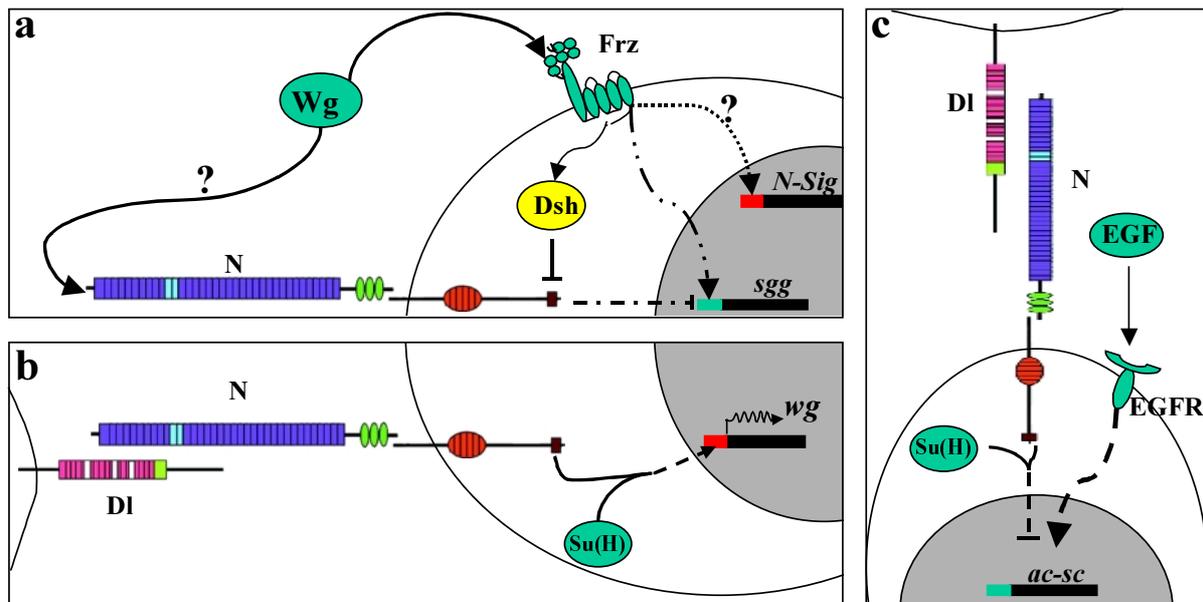


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Interaktionen der Notch-Signaltransduktion mit anderen Signaltransduktionswegen

(a, b) Interaktion der Notch-Signaltransduktion mit dem Wingless-(Wg)-Signaltransduktionsweg.

(a) Nach Wg-Signalaufnahme durch den Rezeptor Frizzled (Frz) wird Dishevelled (Dsh) aktiviert. Durch physikalische Interaktion mit dem C-Terminus von Notch soll Dsh in der Lage sein, die Notch-Signaltransduktion zu unterbinden (Axelrod J. D. *et al.*, 1996). In der Entwicklung der sensorischen Borsten von *Drosophila* wirkt die Wg-Signaltransduktion antagonistisch zur Notch-Signaltransduktion. Dabei reprimiert Notch-Signalisierung die Expression des Transkriptionsfaktors Shaggy (*sgg*) (— · — Linie) während Wg-Signalisierung (· — · Linie) zur Aktivierung von *sgg* führt (Ruel *et al.*, 1993; Simpson *et al.*, 1993). Während der Beinentwicklung von *Drosophila* scheint die Expression der Notch-Signalproteine (*N-Sig*) durch die frühe Wg Expression reguliert (····· Linie). Der genaue Transduktionsweg ist jedoch bislang nicht bekannt (Rauskolb and Irvine, 1999). Diskutiert wird ebenfalls die Möglichkeit, dass Notch als Rezeptor von Wg agieren kann (Martinez Arias, 1998).

(b) In einigen Fällen wird die Aktivierung der *wg* Expression durch Notch-Aktivierung und Supressor of Hairless (Su(H)) beobachtet. (Neumann and Cohen, 1996)

(c) Interaktion mit der EGF-Signaltransduktion: In der Entwicklung der sensorischen Chordotonalen Organe in *Drosophila* setzt die EGF-Signalisierung die Repression der *Achaete-Scute* (*as-sc*) durch Notch-Signalisierung außer Kraft. (EGFR: EGF-Rezeptor).

1.2. Neuronale Entwicklung des spinalen ZNS und des PNS in Vertebraten

Das Vertebratennervensystem kann morphologisch und entwicklungspezifisch in das zentrale und das periphere Nervensystem unterteilt werden. Das zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst das Gehirn und das Rückenmark. In das periphere Nervensystem (PNS) werden die peripheren Nerven sowie die **cranialen** und die spinalen Ganglien eingeordnet.

1.2.1. Entwicklung des spinalen ZNS

1.2.1.1. Neuronale Induktion

Entwicklungsspezifisch hat das ZNS seinen Ursprung in der Neuralplatte. In der frühen Gastrula induzieren mesodermale Zellen in Assoziation mit der Notochorda im darüberliegenden Ektoderm die Neuralplatte. Untersuchungen an *Xenopus* haben gezeigt, dass dies durch die Inhibition des im epidermalen Ektoderm aktiven „Bone Morphogenic Protein“ (BMP) Signaltransduktionsweges geschieht. Die vom „Organizer“ Gewebe (Spemann's Knoten) sekretierten Proteine Follistatin, Noggin, Chordin und Cerberus sind dabei in der Lage Proteine der TGF β /Activin/BMP-Familie zu binden und zu inaktivieren. Durch die Inhibition der BMP-Signaltransduktion besitzen sie neuronale Induktionsfähigkeit (Sasai *et al.*, 1995; Zimmerman *et al.*, 1996) ([Abb. 1.4-A](#)).

1.2.1.2. Neurulation

Durch die Einfaltung des entstandenen Neuroektoderms bildet sich das frühe röhrenförmige ZNS. Dieser Prozess in der embryonalen Entwicklung wird als Neurulation bezeichnet ([Abb. 1.4-B](#)).

Im Verlauf der Entwicklung findet entlang der Neuralachse eine a/p-Differenzierung statt. Dabei bilden sich im **anterioren** ZNS die vier Hirnventrikel aus, an die sich das spinale Neuralrohr (Rückenmark) anschließt. Die frühe neuronale Entwicklung des spinalen Neuralrohrs wurde bislang am eingehendsten untersucht (Lee and Jessell, 1999).

1.2.1.3. Neuronale Differenzierung im Neuralrohr

Die regionale Identität der Neuralrohrzellen wird durch eine zeit- und ortsabhängige Expression von Signalmolekülen (Morphogenen) ausgehend von bestimmten Organisationszentren koordiniert (Tanabe and Jessell, 1996) (**Abb. 1.4-C**).

Eine wichtige Rolle in der Ausbildung der *Floorplate*, als auch der Differenzierung der Motoneuronen und verschiedener **ventraler** Interneuronen spielt ein von ventral nach **dorsal** abnehmender Konzentrationsgradient von Sonic Hedgehog (Shh). Quelle der Shh-Produktion ist primär die Notochorda und im Verlauf der Entwicklung schließlich auch die *Floorplate* (Briscoe *et al.*, 1999; Ericson *et al.*, 1996; Ericson *et al.*, 1997; Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995). Shh ist ein Mitglied der großen Familie der sekretierten Hedgehog Signalproteine. Sie sind wichtig für viele kurz- und weitreichende Musterbildungsprozesse während der Invertebraten- und Vertebratenentwicklung (Hammerschmidt *et al.*, 1997). In der Vertebratenentwicklung ist die Notochorda eines der Hauptzentren der *Shh*-Expression. Explantation der Notochorda im Hühnchenembryo führt zum Verlust der *Floorplate* und Motoneuronendifferenzierung im ventralen Neuralrohr. Implantation einer Notochorda an ein Neuralrohr bewirkt hingegen die Ausbildung einer ektopischen *Floorplate* und die Differenzierung von Motoneuronen (Bang and Goulding, 1996; Tanabe and Jessell, 1996).

Allein die Gabe von Shh-Protein zu Neuralrohr-Explantaten von Hühnchen bzw. die ektopische Expression von *Shh* in *Xenopus* oder der Maus induziert die Expression von *Floorplate*-spezifischen Expressionsmarkern, wie z.B. des „winged-helix“ Transkriptionsfaktors HNF-3 β (Weinstein *et al.*, 1994), als auch die Ausbildung von Motoneuronenmarkern (z.B.: Lim-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (Lundgren *et al.*, 1995; Thor *et al.*, 1999)) (Pfaff and Kintner, 1998). Mäuse mit einer *Shh*-Nullmutation entwickeln weder eine *Floorplate* noch Motoneuronen (Chiang *et al.*, 1996). Dabei scheint der Induktionsmechanismus der *Floorplate* von dem der Motoneuronendifferenzierung abzuweichen. In Mäusen mit einer *Gli2*-Nullmutation, einem direktem Effektorgen der Shh-Signaltransduktion, fehlt zwar die *Floorplate*, die ventralen Motoneuronen sind jedoch vorhanden (Ding *et al.*, 1998; Matise *et al.*, 1998).

Es hat sich gezeigt, dass für die d/v-Spezifizierung der verschiedenen Neuronentypen im Neuralrohr (**Abb. 1.4-D**) nicht nur ein definierter ventraler Shh-Konzentrationsgradient wichtig ist, sondern dass vielmehr ein Zusammenspiel von mindestens zwei weiteren Morphogengradienten in der d/v-Organisation der **medialen** und dorsalen Neuronentypen innerhalb des Neuralrohrs stattfindet. Zum einen ist es ein vom lateralen Mesoderm ausgehende Retinsäure-

(RA)-Gradient. Zum anderen handelt es sich um den vom **dorsalen** Ektoderm ausgehenden BMP-Signaltransduktionsgradient (**Abb. 1.4-C**).

Die endogen synthetisierte RA besitzt transkriptionsregulierende Eigenschaften. Während der Entwicklung ist sie beteiligt an der a/p-Spezifizierung, der Förderung des Neuritenwachstums, sowie dem Überleben der Neuralleistenzellen (Maden *et al.*, 1996). Das laterale Mesoderm entlang des spinalen Neuralrohrs ist einer der Hauptorte der RA-Produktion. Die ausgeschüttete RA induziert im lateralen Neuralrohr die Expression der Homeobox-Gene *Dbx1* und *Dbx2*. Beide Gene werden in Vorläuferzellen der **medialen** Interneuronen exprimiert. Die *En1* (Wurst *et al.*, 1994) positiven V1 Interneuronen gehen dabei aus den **ventralen** *Dbx2* exprimierenden Vorläuferzellen hervor (Pierani *et al.*, 1999).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die mediale Expressionsdomäne von *Dbx1* und *Dbx2* ventral durch den Shh-Konzentrationsgradienten begrenzt wird. Dorsal wird ihre Ausbreitung durch den BMP-Konzentrationsgradienten vom epidermalen Ektoderm eingeschränkt (Pierani *et al.*, 1999).

Der BMP-Signalkonzentrationsgradient aus dem epidermalen Ektoderm und der *Roofplate* beeinflusst die Expression von dorsalen Expressionsmarkern wie *Pax3*, *Pax7*, *Msx1* und *Msx2* im Neuralrohr (Liem *et al.*, 1997; Liem *et al.*, 1995; Monsoro-Burq *et al.*, 1996).

Entscheidend in der Vertebratenneurogenese ist eine Differenzierung in Abhängigkeit von Zeit und Raum. Innerhalb des Neuralrohres differenzieren dabei die ventralen, das LIM-Homeoboxgen *Islet-1* (*Isl-1*) exprimierenden Motoneuronen zeitlich vor den ventralen Interneuronen (Appel and Eisen, 1998). In der Neurogenese scheint also zu einem gewissen Zeitpunkt nur eine bestimmte Anzahl von Stammzellen kompetent, um auf extrinsische bzw. intrinsische Differenzierungssignale zu reagieren (Appel and Eisen, 1998). Sowohl in Insekten als auch in Vertebraten bestimmen „proneurale“ Gene, die für bHLH Transkriptionsfaktoren kodieren, die Fähigkeit (Kompetenz) von Zellen sich in ein neuronales Zellschicksal zu differenzieren. Die verantwortlichen bHLH Transkriptionsfaktoren sind die der AS-SC- und der Atonal-Familie bzw. deren Vertebratenhomologe wie z.B. *Mouse Acheate-Scute Homologe 1* (*Mash-1*) und *Neurogenin1,2* (*ngn1,2*) (Lee, 1997). Die Segregation der neuronalen Vorläuferzellen von den verbleibenden neuronalen Stammzellen wird höchstwahrscheinlich durch **laterale Inhibition** mittels **Notch-Signaltransduktion** erreicht (siehe oben) (Campos-Ortega, 1993; de la-Pompa *et al.*, 1997; Dunwoodie *et al.*, 1997; Haddon *et al.*, 1998; Henrique *et al.*, 1995; Lewis, 1996).

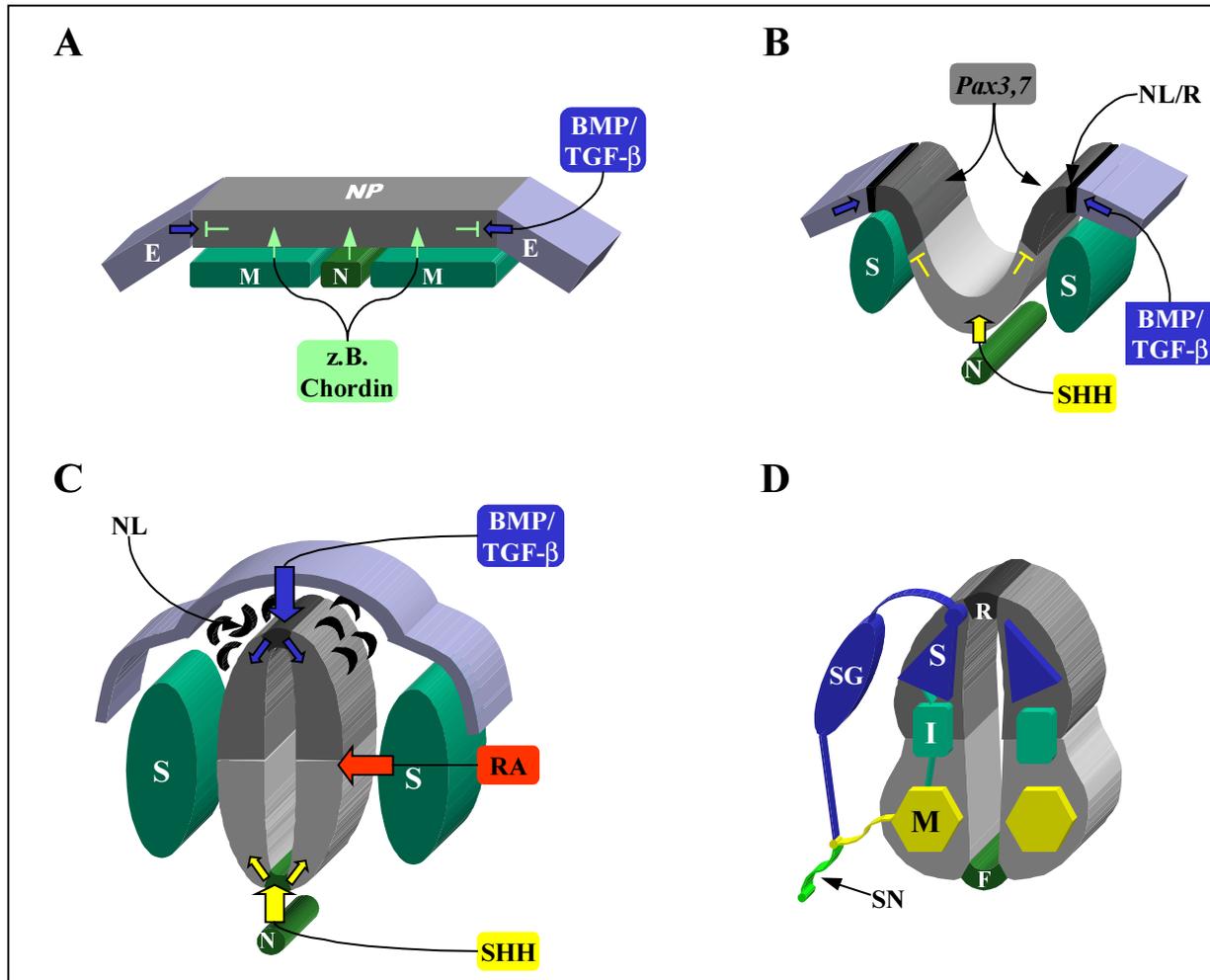


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der neuralen Induktion und Neurulation sowie der verschiedenen Neuronenklassen im Rückenmark

(A) Neurale Induktion: Studien an *Xenopus* lassen vermuten, dass der konstitutive „Bone Morphogenic Protein“ (BMP) Signaltransduktionsweg die neuronale Differenzierung der ektodermalen Zellen unterdrückt (Fainsod *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1995). Durch das Ausschütten von BMP/TGF- β („Tumor Growth Factor β “) inhibierenden Faktoren, wie z.B.: Chordin, Noggin, Follistatin, durch mesodermale Zellen (M) in Assoziation mit der Notochorda (N) wird im darüberliegenden Ektoderm (E) die Neuralplatte (NP) induziert (Bouwmeester *et al.*, 1996; Hemmati-Brivanlou *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 1993; Sasai *et al.*, 1994).

(B, C) Neurulation: (B) Die Neuralplatte beginnt sich einzufalten und es bildet sich die Neuralgrube. Ektodermale Signale induzieren die Vorläufer der Neuralleisten- und *Roofplate*-Zellen (NL/R) im lateralen Neuroektoderm. Zelllinien-Analysen in Hühnchen- (Bronner-Fraser and Fraser, 1988) und Mäuseembryonen (Echelard *et al.*, 1994) weisen dabei darauf hin, dass die Neuralleisten- und *Roofplate*-Zellen den gleichen Vorläuferzellen entstammen. BMP/TGF- β Signale aus dem angrenzenden Ektoderm induzieren die Expression von *Pax3,7* in der Neuralplatte. **Ventrale** Shh-Signale aus der Notochorda schränken die Expressionsdomäne von *Pax3* bzw. *Pax7* ein und induzieren die Ausbildung spezieller ventraler Mittellinienzellen (*Floorplate*: F in (D)). (C) Die lateralen Grenzen der Neuralplatte fusionieren und das frühe Neuralrohr löst sich vom Ektoderm. **Dorsal** im Neuralrohr werden spezielle Mittellinienzellen (*Roofplate*: R in (D)) ausgebildet. Die Neuralleistenzellen (NL) beginnen

auszuwandern und nehmen mesenchymalen Charakter zwischen dem Ektoderm und dem dorsalen Neuralrohr an. Die Zellen innerhalb des Neuralrohres teilen sich bis zum Einsetzen der Neurogenese ohne sich zu differenzieren. Mit dem Einsetzen der Neurogenese differenzieren die neuronalen Stammzellen abhängig von ihrer d/v-Position zu verschiedenen Zelltypen aus. An der d/v-Spezifizierung ist ein Zusammenspiel von drei extrinsischen Morphogengradienten beteiligt: Ein von dorsal nach ventral abnehmender BMP/TGF- β Konzentrationsgradient ausgehend vom Ektoderm und der *Roofplate*, ein von ventral nach dorsal abnehmender Shh-Konzentrationsgradient ausgehend von der Notochorda und der *Floorplate*, sowie Retinsäure-(RA)-Signalisierung aus dem **lateralen** Mesoderm der Somiten (S).

(D) Schema der Neuronentypen im Rückenmark: Die Neuronen des entwickelten Neuralrohrs (Rückenmark) erfüllen zwei Hauptaufgaben. Die dorsalen sensorischen Interneuronen (SI) prozessieren die von den Spinalganglien (SG) des peripheren Nervensystems übermittelten hautsensorischen Reize und leiten sie weiter an höhere Zentren des Gehirns. Im ventralen Bereich des Rückenmarks liegen die am motorischen Output beteiligten Motoneuronen (M). Im Bereich dazwischen befinden sich verschiedene Interneuronenklassen. Diese sind unter anderem an der Ausbildung der Reflexbögen beteiligt (Jankowska and Lindstrom, 1972). Morphologisch wird das Neuralrohr dorsal und ventral durch spezialisierte Mittellinienzellen abgeschlossen. Die dorsalen Mittellinienzellen werden als „*Roofplate*“, die ventralen Mittellinienzellen als „*Floorplate*“ bezeichnet. Die *Roofplate*- und *Floorplate*-Zellen differenzieren letztendlich zu besonderen Gliazellen (McKanna, 1993).

Die Axone der SG und der M vereinigen sich zum Spinalnerv (SN).

1.2.2. Die Entwicklung des Peripheren Nervensystems (PNS)

Das periphere Nervensystem hat seinen Ursprung in den Neuralleistenzellen. Die Neuralleistenzellen sind eine migratorische Zellpopulation, die von lateralen Zellen der Neuralplatte abstammen (**Abb. 1.4-B,C**). Abhängig von ihrer **rostro-caudalen** und **medio-lateralen** Position im Embryo bilden die Neuralleistenzellen die Neuronen und Glia des PNS, sowie Melanozyten als auch eine Reihe von anderen nichtneuronalen Strukturen aus (**Abb. 1.5**)

1.2.2.1. Induktion der Neuralleistenzellen

Das epidermale Ektoderm, sowie das paraxiale Mesoderm scheinen eine Rolle in der Induktion der Neuralleistenzellen zu spielen (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998). Transplantationsexperimente in Axolotl und an Hühnchenembryonen haben gezeigt, dass der Kontakt von epidermale Ektoderm zur Neuralplatte für die Induktion von frühen prä-migratorischen Neuralleistenzellmarkern ausreicht (Dickinson *et al.*, 1995; Moury and Jacobson, 1989; Moury and Jacobson, 1990; Selleck and Bronner-Fraser, 1995). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass auch das paraxiale Mesoderm, sowie das laterale Plattenmesoderm, das unterhalb der lateralen

Neuralplatte liegt, die Fähigkeit besitzt, Neuralleistenzellen zu induzieren (Bonstein *et al.*, 1998; Liem *et al.*, 1995).

Die Signalmoleküle, die dabei die Induktion bzw. Spezifizierung der Neuralleistenzellen dirigieren, wurden identifiziert. Es sind sekretierte Proteine der „Fibroblast Growth Factor“- (FGF)-, Wnt- und der BMP-Familie (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; Liem *et al.*, 1995; Mayor *et al.*, 1997; Mayor *et al.*, 1995; Muhr *et al.*, 1997) (**Abb.1.4-B**).

Die *Drosophila* Wingless homologe Wnt-Proteinfamilie umfasst eine Gruppe sekretierter Cystein-reicher Glykoproteine, die in einer Reihe von Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind (Cadigan and Nusse, 1997). Die in der *Roofplate* exprimierten Wnt1/Wnt3a-Proteine sind dabei an der Regulierung der Zellproliferation und der Spezifizierung der dorsalen Neuralrohrzellen sowie der Aufrechterhaltung der undifferenzierten, ausgewanderten (delaminierten) Neuralleistenzellen beteiligt (Dickinson *et al.*, 1994; Ikeya *et al.*, 1997; McMahon and Bradley, 1990; Takada *et al.*, 1994).

Die FGF- und BMP-Signalsierung aus dem epidermalen Ektoderm induzieren die Expression von zahlreichen in ihrer Funktion redundanten „Zink-Finger“ Transkriptionsfaktoren, wie z.B. der Zic-Familie, in der lateralen Neuralplatte. Zunehmende Hinweise zeigen, dass diese Transkriptionsfaktoren an der frühen Spezifizierung der Neuralleistenzellen beteiligt sind (Dickinson *et al.*, 1995; Liem *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 1997; Nakata *et al.*, 1998).

Prämigratorische Neuralleistenzellen, die in der lateralen Neuralplatte generiert werden, wandern schließlich aus dem Neuroektoderm aus und nehmen einen mesenchymalen Charakter zwischen dem dorsalen Neuralrohr und dem epidermalen Ektoderm an (**Abb.1.4-C**). An diesem Delaminierungsprozess sind unter anderem Veränderungen in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen von Bedeutung. Das, der „ras-Superfamilie“ zugehörnde Protein rhoB wird mit dem Delaminierungsprozess der Neuralleistenzellen in Verbindung gebracht. Die Klasse der rho GTP-binde Proteine ist an der Gestaltung der Actin-Cytoskelettstruktur sowie an Zelladhäsionsvorgängen beteiligt (Hall, 1998; Liu and Jessell, 1998).

1.2.2.2. Differenzierung der Neuralleistenzellen

Die delaminierten Neuralleistenzellen migrieren schließlich auf definierten Wegen von dorsal nach ventral zu verschiedenen Geweben innerhalb des sich entwickelnden Embryos (**Abb. 1.5-A**).

Zum Zeitpunkt der Migration sind die meisten Neuralleistenzellen multipotent. Das normale Zellschicksal der delaminierten Neuralleistenzellen kann durch Transplantation in andere

Körperregionen bzw. durch Zugabe anderer Umgebungsfaktoren *in vitro* verändert werden (Baker *et al.*, 1997; Le Douarin *et al.*, 1993).

Einige postmigratorische Neuralleistenzellen sind jedoch in ihrer Entwicklungsfähigkeit eingeschränkt und besitzen keine Multipotenz mehr. Es zeigt sich, dass die Restriktion des entwicklungspezifischen Potentials sowohl sequenziell als auch in einer hierarchischen Weise erfolgt. Dabei unterscheiden sich frühe migratorische in ihrem Entwicklungspotential von späten migratorischen Neuralleistenzellen.

Untersuchungen an Neuralrohrimplantaten von Wachtelebryonen weisen darauf hin, dass es vier größere Subpopulationen von Neuralleistenzellen gibt, die sequenziell auswandern. Dabei entwickelt sich die erste frühe migrierende Subpopulation zu Neuronen des PNS, gefolgt von einer Subpopulation mit neuronaler/glialer Potenz. Folgend darauf sind Subpopulationen mit glialer/melanozyter bzw. melanozyter Potenz (Henion and Weston, 1997).

Die Differenzierung in die verschiedenen Subzellpopulationen wird intrinsisch, als auch von der Umgebung durch extrinsische Faktoren bestimmt (Henion and Weston, 1997; Weston, 1991). So ist beispielsweise BMP-2, das von der dorsalen Aorta ausgeschieden wird, in der Lage die Differenzierung von autonomen Neuronen und in einem geringen Maße von glatten Muskelzellen zu fördern (Shah *et al.*, 1996). Genetische Experimente haben im Laufe der Zeit eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren identifiziert, die an der Entwicklung der Neuralleistenzellen und deren Derivate im Säugetier wichtig sind (Barsh, 1996; Dong *et al.*, 1995; Lemke and Brookes, 1984; Marusich and Weston, 1991).

Diese extrinsischen Signale wirken instruierend auf die Neuralleistenzellen, wobei beobachtet wird, dass nicht alle Zellen einer Subpopulation kompetent sind, auf diese zu reagieren. So wurden mitotisch aktive Neuralleistenzellen gefunden, die unabhängig von äußeren, „autonom-neuronal“ instruierenden BMP/TGF- β Signalen ein „sensorisch-neuronales“ Zellschicksal annehmen (Greenwood *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass sich in den sequenziell migrierenden Subpopulationen bereits verschiedene, in ihrem Zellschicksal determinierte Zelllinien befinden.

Molekularbiologisch lassen sich die verschiedenen determinierten Neuralleistenzelllinien bzw. deren Vorläuferzelllinien durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren identifizieren (**Abb. 1.5-B**) (Blaugrund *et al.*, 1996; Guillemot *et al.*, 1993; Lo *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1999).

Die Determinierung bestimmter Neuralleistenzelllinien in bestimmte Entwicklungsschicksale könnte durch Zell-Zell-Interaktionen in den delaminierten Neuralleistenzellen zu Stande kommen. Hierbei gibt es Anzeichen, dass die Notch-Signaltransduktion eine Beteiligung an

der Segregation der Subzelllinien hat, da einige Notch-Signaltransduktionskomponenten, wie z.B. *Dll1*, *Dll3* und *Notch1* in den migratorischen Neuralleistenzellen exprimiert werden (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Bettenhausen *et al.*, 1995; Dunwoodie *et al.*, 1997; Weinmaster *et al.*, 1991).

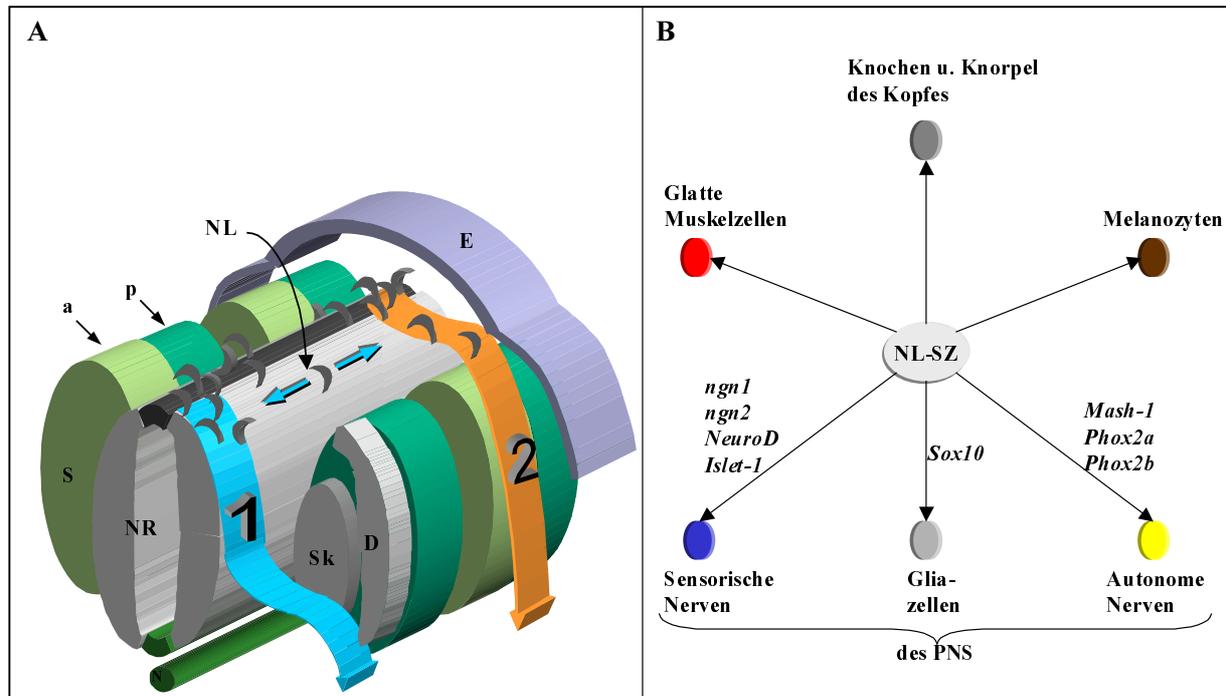


Abbildung 1.5: Darstellung der Wanderungswege der Neuralleistenzellen und ihrer Hauptderivate

(A) Wanderungswege der Neuralleistenzellen (NL) im Thorakalbereich: Die früh-auswandernden NL folgen dem medio-lateralen Weg (1 in A). Sie wandern **medial** entlang des Neuralrohres (NR) und anschließend durch den **anterioren** Teil der Somiten (a) nach ventral. Dabei durchqueren sie das Sklerotom (Sk) der Somiten und ziehen zwischen Sk und dem Dermomyotom (D) in die ventrale Körperperipherie. NL, die ursprünglich an den posterioren Hälften der Somiten (p) auswandern, bewegen sich entlang der a/p-Achse des Neuralrohres zu anterioren Somitenhälften (schattierter Pfeil) und folgen dem beschriebenen Wanderungsweg (1). Die NL des medio-lateralen Wanderweges entwickeln sich unter anderem zu den Derivaten des PNS. Später in der Entwicklung setzt ein zweiter Wanderungsweg der NL ein (2 in A). Im dorso-lateralen Weg wandern die NL zwischen dem Dermomyotom (D) und der Epidermis (E) in die ventrale Körperperipherie. Diese spät-wandernden NL entwickeln sich zu den Pigment produzierenden Melanozyten.

(B) Überblick der hauptsächlichlichen Entwicklungsschicksale der undifferenzierten Neuralleistenzellen (NL-SZ) und einige der molekulargenetischen Marker der jeweiligen Zelllinienderivate. Die Darstellung umfasst bei weitem nicht die gesamten NL-Derivate (für eingehendere Betrachtung s. Le Douarin, 1982)

1.3. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die neuronale Entwicklung der *Delta like 1 (Dll1)* Mausmutante mittels *in vitro* Genexpressionsanalysen näher untersucht werden (Bettenhausen *et al.*, 1995; Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997).

Wie bereits beschrieben, haben Mutationsanalysen an *Notch-1*- bzw. *RBP-Jκ*-Nullmutanten gezeigt, dass die Notch-Signaltransduktion in der Vertebraten ZNS Entwicklung eine wichtige Rolle einnimmt. Innerhalb des entwickelnden ZNS werden jedoch mehrere potentielle Notch-1 Liganden exprimiert (Chitnis *et al.*, 1995; de la-Pompa *et al.*, 1997; Dunwoodie *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1997; Matisse and Joyner, 1997; Myat *et al.*, 1996). Der neuronale Phänotyp der *Notch-1* Nullmutante könnte somit den Verlust der durch Notch-1 vermittelten Signaltransduktion im gesamten ZNS widerspiegeln.

Notch-1 und *RBP-Jκ* nullmutante Embryonen sterben im sehr frühen Entwicklungsstadium E9.5. Dies macht eine Analyse späterer Stadien der Neurogenese unmöglich. Die *Dll1^{lacZ}* Mutanten Embryonen haben demgegenüber den Vorteil, dass sie erst im Embryonalstadium E12.0 sterben. Dies ermöglicht somit eine spezifische Betrachtung der Beteiligung der Notch-Signaltransduktion in fortgeschrittenen Stadien der ZNS Entwicklung.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war demnach die Vorgänge in der neuronalen Entwicklung des ZNS beim Verlust eines einzigen potentiellen Notch-Liganden (Dll1) zu untersuchen. Dabei wurde verstärktes Augenmerk auf die Analyse der Entwicklungsvorgänge im spinalen Neuralrohr gerichtet.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es die Vorgänge in der neuronalen Entwicklung des ZNS beim Verlust eines einzigen potentiellen Notch-Liganden (Dll1) zu untersuchen. Dies ermöglicht eine spezifischere Betrachtung der Beteiligung der Notch-Signaltransduktion während der ZNS Entwicklung, da die Notch1-Aktivierung durch andere DSL-Proteine höchstwahrscheinlich unbeeinflusst bleibt. Dabei wurde verstärktes Augenmerk auf die Analyse der Entwicklungsvorgänge im spinalen Neuralrohr gerichtet.

Die Notch-Signaltransduktion ist möglicherweise an der Segregation der Neuralleistenzelllinien beteiligt. Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es dieser Fragestellung nachzugehen und die Beteiligung des Notch-Signaltransduktionspartners Dll1 an der Segregation der Neuralleistenzelllinien bzw. an der PNS Entwicklung näher zu untersuchen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Techniken der Mauszucht und Genexpressionsanalysen

2.1.1. Mausstamm

Ausgangspunkt für den ursprünglichen, die *Dll1^{lacZ}* Mutation tragenden Mausstamm waren homolog rekombinierte embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie R1. Die *Dll1^{lacZ/+}*-tragenden R1 ES-Zellen wurden auf einen homogenen 129/SV^{Pas} genetischen Hintergrund gebracht (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997).

Auf Grund der bekannten niedrigen Nachkommensraten des 129/SV^{Pas} Mausstammes wurde der homogene “Knock-Out” (k.o.) Mausstamm auf einen C56BL/6J genetischen Hintergrund eingekreuzt, um eine höhere Nachkommensrate zu erhalten. Da die homozygote *Dll1* Nullmutation zu einer embryonalen Letalität führt, kann die *Dll1^{lacZ}* Mutation nur in heterozygoter Form erhalten werden. Die aus der Zucht resultierenden heterozygoten k.o. Nachkommen wurden Mittels Allel-spezifischer Polymerase Kettenreaktion (PCR) von Schwanz-DNA ermittelt.

Dazu wurden den 3 Wochen alten Nachkommen ca. 4 mm der Schwanzspitze abgeschnitten. Die Schwanzspitzen wurden in Proteinase K Puffer (1 mg/ml Proteinase K in 50mM Tris pH 8; 100mM EDTA; 0,5% SDS) bei 55°C über Nacht verdaut und am folgenden Tag für eine Stunde bei 80°C hitzeinaktiviert. 2µl der hitzeinaktiviert Schwanzspitzen-Lysate wurden direkt für die Allel-spezifische PCR verwendet.

Die PCR Reaktion erfolgte in 40µl PCR Puffer:

- 20µl 1x Lysispuffer
- 2µl 10x PCR-Puffer
- 0,4µl Oligonukleotide (0,25µg/µl)
- 0,4µl Taq-Polymerase (5U/µl)
- 1µl MgCl₂
- 14,2µl AMPU-Wasser
- 2µl Schwanzspitzenlysat

1xLysispuffer: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 2mM MgCl₂, 0,45% Tween20, 0,45% NP40.

10xPCR-Puffer: 166mM (NH₄)₂SO₄, 670mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mg/ml BSA

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide waren:

5' *lacZ*-spezifisch: → LacZ1: 5'-CAAATTCAGACGGCAAACG-3'

3' *Dll1*-spezifisch: → Melta38: 5'-ATCCCTG-GGTCTTTGAAGAAG-3'

Die PCR-Zyklusbedingungen waren:

30 Zyklen à:

Denaturierung: 94°C, 30s;

Annealing: 55°C, 30s;

Elongation: 72°C, 30s.

Mäuse mit einem *Dll1*^{lacZ/+} Genotyp wurden für den Erhalt der Kolonie und für die Generation von homozygoten *Dll1*^{lacZ} Embryonen verwendet.

2.1.2. Embryogenerierung

Die für die *in situ* Analysen verwendeten Embryonen wurden aus zeitlich überwachten Paarungen heterozygoter *Dll1* Nullmutanten gewonnen. Dabei wurde 12 Uhr Mittag des Tages des ersten Auftretens eines vaginalen Pfropfes dem embryonalen Stadium 0.5 (E0.5) zugeordnet. Jeder folgende Entwicklungstag wurde hinzugezählt. Die Mehrheit der *in situ* Analysen erfolgte an Embryonen der Stadien zwischen E8.5 und E10.5.

Die entsprechenden schwangeren Weibchen wurden mittels Genickbruch getötet und die Uterushörner entnommen. Die Embryodissektion aus den Uteri erfolgte in gekühlter DEPC (0.01% Diethylpyrocarbonat (Sigma)) behandelte Phosphat-gepufferte Salinelösung (PBS: 150mM NaCl, 15mM Na-Phosphat-Puffer pH 7.3)). Die Trennung homozygoter *Dll1*^{lacZ} von den phänotypisch unauffälligen heterozygoten *Dll1*^{lacZ} und wildtyp Embryonen erfolgte anhand der morphologischer Auffälligkeiten der Nullmutanten.

Nachfolgend wurden die sortierten Embryonen fixiert.

Embryonen die für RNA-*in-situ*-Hybridisierungen verwendet wurden, wurden in 4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS fixiert. Während Embryonen die für immunocytochemische Nachweise verwendet wurden in einer Methanol/DMSO (4:1) fixiert wurden. Beide Fixierungsprozeduren wurden bei 4°C über Nacht ausgeführt.

Am darauffolgenden Tag wurden die PFA fixierten Embryonen in einer aufsteigenden Methanolreihe (25-50-75-100% in DEPC-PBS) dehydriert bzw. von Methanol/DMSO (4:1) di-

rekt in 100% Methanol transferiert. Nachfolgend wurden die dehydrierten Embryonen durch Zugabe von $\frac{1}{6}$ Volumen 30%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei 4°C für 2h gebleicht. Danach wurden die Embryonen zweimal in 100% Methanol gewaschen und darin bei -20°C für den weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.1.3. RNA *in situ* Hybridisierung von Mausembryonen

Die Digoxigenin markierten **antisense** Ribonukleotid-Proben wurden von den jeweiligen linearisierten Plasmid-cDNA Klonen unter Verwendung des "Digoxigenin RNA Labeling Mix" (Roche-Diagnostics) erzeugt.

Die „Whole-mount“ RNA *in situ* Hybridisierung erfolgte angelehnt an ein beschriebenes Protokoll (Sporle and Schughart, 1998). Das verwendete Protokoll für Embryonen < E11.5 war wie folgt:

- Rehydrierung der Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe (100-75-50-25% in DEPC-PBS);
- Zweimal 5 min waschen in DEPC-PBT (=DEPC-PBS, 0.1% Tween 20);
- Zweimal 5 min inkubieren in RIPA-Puffer;

RIPA-Puffer: 0,05% SDS; 150mM NaCl; 1% NP40; 0,5% Deoxycholate;

100mM EDTA; 50mM Tris-HCl pH 8.0 in DEPC-H₂O

- Zweimal 5 min waschen in DEPC-PBT;
- Nachfixieren der Embryonen in 4% PFA/0.2% Glutaraldehyd in PBT für 20 min;
- Zweimal 5 min waschen in DEPC-PBT.

Alle Inkubationsschritte bis hier erfolgen auf Eis und leichtem Schütteln.

- Inkubation der Embryonen in DEPC-PBT/HYBE-Puffer (1:1) bei Raumtemperatur (RT) und ohne zu Schütteln, bis die Embryonen in der Lösung zu Boden sinken;

HYBE-Puffer: 50% Formamide (deionisiert); 5xSSC; 0,05% Heparin; 0.1% Tween20;

pH 6 eingestellt mit 1M Zitronensäure

20xSSC: 3M NaCl; 0,3M Na-Zitrat pH 7)

- Inkubation der Embryonen in HYBE-Puffer bei RT bis diese wieder absinken;
- Sortieren der Embryonen entsprechend der zu verwendenden Ribonukleotid-Proben in 1,8ml Cryoröhrchen;
- Vorhybridisierung der Embryonen für 3h bei 68°C in 1ml HYBE-Puffer/tRNA (100µg/ml);

- Wechsel der Hybridisierungslösung und Inkubation mit 1ml HYBE-Puffer/tRNA + (5-10µl) Digoxigenin (Dig) markierter Ribonukleotid-Probe über Nacht bei 68°C.

Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen unter stringenten Bedingungen gewaschen und mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Anti-Digoxigenin Antikörper (Roche Diagnostics) inkubiert.

Der Ablauf war wie folgt:

- Zweimal 30 min waschen in HYBE-Puffer bei 68°C;
- 5 min waschen in HYBE/RNase-Puffer (1:1) bei RT;
- 10 min waschen in RNase-Puffer bei RT;
RNase-Puffer: 500mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH 7.5; 0,1% Tween20
- 1h Inkubation in RNase-Puffer+100µg/ml RnaseA bei 37°C;
- 5 min Inkubation in RNase-Puffer/SSC-Fa-T (1:1);
- Zweimal 5 min bei RT und 8 mal 30 min Waschen in SSC-Fa-T bei 68°C;
SSC-Fa-T: 2xSSC; 50% Formamide; 0,1% Tween20
- 5 min Inkubation in SSC-Fa-T/TBST (1:1) bei RT;
- Zweimal 5 min TBST bei RT;
TBST: 136mM NaCl; 2,6mM KCl; 25mM Tris-HCl pH 7.5; 0,1% Tween20
- Zweimal 5 min MABT-Puffer bei RT;
MABT-Puffer: 100mM Maleinsäure; 150mM NaCl; pH 7.5
- 1h Inkubation in 10% Blocking-Reagenz (Roche-Diagnostics);
- Inkubation bei 4°C über Nacht in 1% Blocking-Reagenz+Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente-AP_konjugiert (Roche Diagnostics) (Antikörper Verdünnung: 1/5000).

Die ungebundenen Antikörper wurden nachfolgend für mehrere Tage mit wechselnder TBST-Lösung herausgewaschen. Anschließend erfolgte der colorimetrische Nachweis der jeweiligen Genexpression.

Die Vorgehensweise war wie folgt:

- Waschen der Embryonen in wechselnder TBST-Lösung für mehrere Tage bei 4°C;
- Dreimal 10 min Inkubation der Embryonen in alkalischem Phosphatase Puffer bei RT;
AP-Puffer: 100mM NaCl; 50mM MgCl₂; 100mM Tris-HCl pH 9.5; 2mM Levamisol;
0.1% Tween20
- Färbung der Embryonen in
 - a) BM-Purple (Roche-Diagnostics) + 2mM Levamisol, 0,1% Tween 20 oder

b) BCIP(175µg/ml)/NBT(450µg/ml) (Roche-Diagnostics)

bei 4°C über Nacht im Dunkeln (je nach Probe evtl. länger)

- Abstoppen der Färbung durch einmaliges Waschen in AP-Puffer und anschließender Überführung in 4%PFA/PBS zur Lagerung bei 4°C im Dunkeln.

Zum Teil wurden das Auswaschen der nicht gebundenen Dig-markierten-Ribonukleotide, sowie die Inkubation der Embryonen mit dem Anti-Digoxigenin-AP Antikörper unter zu Hilfenahme des *InsituPro*-Roboters von der Firma ABImed durchgeführt. Das Färben erfolgte “per Hand” wie beschrieben.

2.1.4. “Whole-mount” Immunocytochemie

Die “Whole-mount” Immunocytochemie wurde mit Embryonen durchgeführt, die in Methanol/DMSO fixiert wurden. Der monoklonale Antikörper 40.2D6, der das Islet-1 Protein erkennt (Ericson *et al.*, 1992), wurde von der “Developmental Studies Hybridoma Bank” (verwaltet von der Universität von Iowa, Abteilung für Biowissenschaft) erhalten und in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Der monoklonale Antikörper NN18 (Sigma), der gegen das Neurofilament 160 (NF160) gerichtet ist, sowie der monoklonale Antikörper SDL.3D10, der das β -Tubulin III Protein detektiert, wurden in einer Verdünnung von 1:300 verwendet.

Ein Anti-Maus-IgG Meerrettich-Peroxidase Konjugat (Roche Diagnostics) wurde als sekundärer Antikörper verwendet und in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Für den colorimetrischen Nachweis wurde Diaminobenzidin (Sigma) verwendet.

Das Vorgehen für Embryonen < E11.5 war wie folgt:

- Rehydrierung der Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe (100-75-50-25% in PBS);
- Inkubation in PBSMT zweimal 1h bei 4°C;
PBSMT: 2% Milchpulver; 0,1% Triton-X100 in PBS
- Inkubation in 1ml PBSMT + primärem Antikörper in entsprechender Verdünnung, über Nacht bei 4°C;
- Auswaschen des primären Antikörpers durch mehrstündiges Waschen in PBSMT: dreimal 1h bei 4°C, sowie zweimal 1h bei RT;
- Inkubation in 1ml PBSMT + sekundärem Antikörper in der entsprechenden Verdünnung, über Nacht bei 4°C;

- Auswaschen des sekundären Antikörpers in Vorgehensweise wie des primären Antikörpers;
- Inkubation in PBST 20min bei RT;
 - PBST:** 0,2% Serumalbumin; 0,1% Triton-X100 in PBS
- Inkubation in PBST/DAB (Diaminobenzidine) (30 µg/ml) 40 min bei RT;
- Auslösen der Färbereaktion durch 1µl-weises Zugeben von 30% H₂O₂;
- Stoppen der Färbereaktion durch Überführen der Embryonen in PBT.

Die Embryonen wurden anschließend in einer aufsteigenden Methanolreihe (25-50-75-100%) dehydriert und in Benzylalkohol/Benzylolbenzonat (1:2) aufgeklart, bzw. für die Cryoeinbettung weiterverarbeitet.

2.1.5. Nachweis der Zellproliferation durch BrdU-Markierung

5'-Bromo-Deoxyuridin (BrdU) Inkorporation von Embryonen in utero wurde verwendet, um die Zellproliferation innerhalb des neuronalen Gewebes der Embryonen zu untersuchen. Dazu erhielten E9.5 bzw. E10.5 schwangere Plugmäuse ca. 50µg/g-Körpergewicht BrdU mittels **intraperitoneal** Injektion von 5mg/ml BrdU (Sigma) in PBS verabreicht (Wallin *et al.*, 1994). Die Embryodissektion erfolgte 2 Stunden nach BrdU Injektion. Die Embryonen wurden in 4% PFA/PBS fixiert und wie beschrieben weiterverarbeitet. Nach RNA *in situ* Hybridisierung wurden die Embryonen im Cryotom (siehe unten) geschnitten. Anschließend erfolgte auf den Cryoschnitten der BrdU Nachweis. Die Vorgehensweise war wie folgt:

- Waschen der Objektträger in PBTx zweimal 5 min;
 - PBTx:** PBS; 0.1% TritonX-100
- Inkubation in 0,1% CaCl₂ pH7.6 + 0,1% Trypsin für 10 min;
- Abstoppen des Trypsinverdaus durch Waschen in PBS dreimal 5 min;
- Inkubation in 4M HCl für 15 min, anschließend kurz spülen in PBS;
- Inkubation in PBSMT für 10 min;
- Inkubation mit Anti-BrdU-Peroxidase-Konjugat F_{AB} (Sigma) (1U/ml in PBSMT) über Nacht bei 4°C;
- Waschen der Objektträger in PBS dreimal 30 min;
- Inkubation mit PBS/DAB (30µg/ml) für 20 min;
- Auslösen der Färbereaktion durch zugeben von 30% H₂O₂;

- Abstoppen der Färbereaktion durch Inkubation der Objektträger in PBTx.

Die Objekte wurden anschließend mit Kaisers-Glycerol eingedeckelt und bei RT aufbewahrt.

2.2. Histologische Techniken und Mikroskopie

2.2.1. Cryotom-Einbettung und Histologie

Embryonen aus “Wohle mount” *in situ* RNA Hybridisierungen bzw. Immunocytochemie wurden für die Cryotom-Histologie prozessiert. Die Cryopreservation der Embryonen erfolgte durch Inkubation in 30% Sucrose/PBS bis die Embryonen in der Lösung zu Boden sanken. Anschließend wurden die Embryonen zwei Stunden in 7,5% Gelatine/30% Sucrose/PBS bei 42°C inkubiert. Zum Aushärten wurden die Embryonen samt Gelatine/Sucrose/PBS in Plastik Wägeschälchen gegeben. Anschließend wurden die Embryonen in Blöcken aus der Gelatine geschitten und in, aus Aluminiumfolie, vorgefertigte Behältnisse gegeben und mit Cryoblock (medite Medizintechnik) überschichtet. Das Einfrieren der so behandelten Embryonen erfolgte auf Trockeneis. Anschließend wurden histologische Schitte (35µm) mittels Cryotom (Leica: Jung Frigocut 2800N) angefertigt. Die Cryotomschnitte wurden in Kaiser’s Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt und aufbewahrt.

2.2.2. Semidünnschnitte

Die 1µm dicken histologischen Schnitte wurden von EPON eingebetteten Embryonen mit einem Glasbruchmesser angefertigt. Die EPON Einbettung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Glutaraldehydfixierung der Embryonen 2-5 Stunden in:
 - 4% Sucrose; 3% Glutaraldehyd; 0,1M Cacodylatpuffer; 2mM CaCl₂;
 - Cacodylatpuffer:** 0.2M Natriumcacodylat/HCl pH 7.6
- 3x 20 min waschen der Embryonen in Waschlösung;
 - Waschlösung:** 0,1M Cacodylatpuffer pH 7.4; 4% Sucrose, 2mM CaCl₂
- Chrom-Osmiumsäurefixierung 1-2 h nach Dalton.
 - Chrom-Osmiumsäure-Gemisch nach Dalton:**
 - Pufferlösung (A): 100 ml 5% Kaliumbichromatlg.,+12 ml 2,5N KOH
 - Salzlösung (B): 3,4% NaCl
 - Fixationsgemisch:** 1 Teil A + 1 Teil B + 2 Teile 2% OsO₄-Lösung
- Mehrmals waschen bis keine gelbe Farbe mehr zu sehen ist;

- Dehydrierung der Embryonen in aufsteigender Ethanol-Reihe (30-50-70-90-96% +3x 100%) für ca. 20 min;
- Zweimal 30 min inkubieren in Propylenoxid;
- 1h Inkubation in EPON(gebrauchsfertig):Propylenoxid (1:1);
- Inkubation in EPON (gebrauchsfertig) über Nacht bei 4°C;
- Am nächsten Tag Gefäße mit frischem EPON auffüllen und bei 60°C für 24h polymerisieren.

Die auspolymerisierten Blöckchen wurden mit einem UltracutE Microtom (Leica: Reichert-Jung) 1µm dick geschnitten, mit Toluidinblau gefärbt und mit Eukitt (Riedel-de Haen) eingedeckelt.

2.2.3. Rasterelektronenmikroskopie

Die Embryonen für die Rasterelektronenmikroskopie wurden wie folgt behandelt:

- 15 min in 1% Glutaraldehyd/PBS Lösung pH7.35 fixiert;
- anschließend 15 min in 2% OsO₄/PBS Lösung pH7.35 nachfixiert;
- danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30-50-70-90-96% + 3x 100%) dehydriert;
- mittels kritischem CO₂ getrocknet und mit Platinpartikeln ca. 1-3nm stark bedampft.

Die Platin beschichteten Embryonen wurden in einem Emissions-Rasterelektronenmikroskop (Jeol JMS-6300F; Tokyo, Japan) mit Beschleunigungsspannungen von 5-10kV im sekundären Elektronenmodus analysiert.

2.2.4. Mikroskopie und digitale Bildverarbeitung

Die Mikroskopie der "Whole mount" Embryonen erfolgte an einem MZP-APO Binokular (Leica). Die Mikroskopie der histologischen Schnitte wurde an einem Axioplan Mikroskop (Zeiss) durchgeführt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer CCD Kamera der Firma Fuji (HC-2000). Die aufgenommenen Bilder wurden zum Teil zur Kontrastverstärkung digital nachbearbeitet. Dazu wurden sowohl *Adobe Photoshop* (Ver 3.05, Ver 5.0) als auch *Corel Photopaint* (Ver 7.0) verwendet.

2.3. Bakterielle Techniken

2.3.1. Bakterienstämme

Bei den verwendeten Bakterienstämme handelte es sich um die *E.coli* K12 Substämme DH5 α , HB101 und DH10B.

2.3.2. Herstellung kompetenter *E.coli* K12 Bakterienstämme für CaCl₂ Transfektion

Die Herstellung CaCl₂ Kompetenter *E.Coli* K12 Bakterien erfolgt folgendermaßen:

- 100 μ l einer konzentrierten *E.coli* K12 Bakterienstamm Lösung werden in 200 ml LB-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben inokuliert;
- Die Kultur wird bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die optische Dichte bei 550nm von 0,5 erreicht ist (OD₅₅₀ = 0,5);
- Anschließend wird die Kultur bei 6000g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert;
- Das Bakterienpellet wird danach in 100ml eiskaltem, sterilem CaCa₂/Tris-HCl-Puffer gelöst und 15 min auf Eis belassen;
- Anschließend wird die Bakteriensuspension bei 6000g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert;
- Das Bakterienpellet wird dann in 10 ml CaCl₂-Puffer eiskaltem gelöst und in 50 μ l Aliquots in sterile Eppendorf Plastikcryoröhrchen aufgeteilt;
- Die Cryoröhrchen werden anschließend in flüssigem N₂ schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert;

CaCa₂/Tris-HCl-Puffer : 50mM CaCl₂; 10mM Tris-HCl pH 8.0

CaCl₂-Puffer: 50mM CaCl₂; 20% Glycerol

2.3.3. CaCl₂ Transfektion von kompetenten *E.coli* K12 Bakterien

Teilweise wurden cDNA Klone aus anderen Laboratorien als „Filterspots“ bezogen. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Filterpapier durch Zugabe von 100-200 μ l TE Puffer gelöst.

Die Transfektion erfolgt folgendermaßen:

- 10 μ l der TE-Plasmid-Lösung werden zu 50 μ l kompetenten *E.coli* K12 Bakterien gegeben, geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert;

- Anschließend werden die Bakterien für 45s einem 42°C Hitzeschock ausgesetzt und danach für 2 min auf Eis belassen;
- Anschließend werden die transfizierten Bakterien zu 450µl LB-Antibiotikum-Medium gegeben und für 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert;
- Danach erfolgt das Ausplattieren auf LB-Antibiotikum-Agar und Inkubation der Agar-Petrischalen über Nacht bei 37°C;
- Am darauffolgenden Tag können die gewachsenen Bakterienkolonien in 5 ml LB-Antibiotikum-Medium überimpft werden;
- Die 6ml Kulturen werden über Nacht bei 37°C inkubiert;
- Am darauffolgenden Tag werden 900 µl der Kultur für die Herstellung der Gefrierkulturen verwendet und die restliche Kultur gemäß der Anleitung „QIAGEN Plasmid Mini Kit“ zur Plasmid-DNA Präparation weiterverarbeitet.

TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 7.2, 1mM EDTA

LB-Amp-Agar: 1,5% Bacto-Agar, in LB-Medium, 100µg/ml Ampicilin.

2.3.4. Plasmid Maxipräparation

Die cDNA-Sequenz beinhaltenden Plasmide wurden mittels Plasmid Maxipräparation aus den jeweiligen *E.Coli* K12 Gefrierkulturen gewonnen.

Dazu wurde am Tag vor der Plasmid-Präparation eine 50 ml Vorkultur (LB-Amp-Medium) mit 10µl Gefrierkultur angeimpft und bei 37°C für 5h geschüttelt (ca. 150 rpm). Anschließend wurde die Vorkultur in 150ml Medium überimpft und in einem 2l Erlenmeyerkolben bei 37°C über Nacht geschüttelt (ca. 150 rpm).

Am darauffolgenden Tag wurde die Kultur gemäß der Anleitung des „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) aufbereitet und das Plasmid isoliert.

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch mit Hilfe eines Pharmacia-GeneQuant Photometers ermittelt.

LB-Medium (Luria-Bertani Medium): 1% Bactrypton; 0,5% Bacto-Hefeextrakt;
1% NaCl ; pH 7.0

Antibiotikum: Ampicilin (50mg/ml in H₂O: Stammkonzentration)

LB-Amp-Medium: Endkonzentration Ampicilin im Medium: 100µg/ml

2.3.5. *E.coli* K12 Gefrierkulturen

Die Gefrierkulturen der Plasmid-cDNA beinhaltenden *E.coli* K12 Bakterienstämme wurden durch Mischen von 100 µl „10x Freezing Medium“ mit 900µl Bakterienkultur erzeugt und bei –80°C aufbewahrt.

10x Freezing Medium: 0,9g (NH₄)SO₄; 6,3g K₂HPO₄; 1,8g KH₂PO₄; 0,45g Na-Zitrat;
0,09g MgSO₄; 44g Glycerol

2.4. Bezugsquellen

2.4.1. Chemikalien:

Allgemeine Gebrauchskemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Roth (Karlsruhe), „Life Technologies Gibco Europe“ (Karlsruhe) und der Firma Roche-Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Zefa-Laborbedarf (München) bezogen.

2.4.2. Molekularbiologische Produkte:

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche-Diagnostics (Mannheim), „Life Technologies Gibco Europe“ (Karlsruhe) und „New England Biolabs“ bezogen.

Die verwendeten PCR Oligonukleotide wurden am Inst. für Pathologie, GSF von Herrn Linzner hergestellt.

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA und Restriktionsspaltungen wurden Kits der Firma QIAGEN GmbH (Hagen) verwendet.

2.4.3. cDNA Klone für die Expressionsanalyse:

Die cDNA Klone der verwendeten Gene für die Expressionsanalyse stammten mehrheitlich aus der Plasmid-Bank der Arbeitsgruppe Dr. Martin Hrabè de Angelis.

Nachfolgend sind alle extern erworbenen cDNA Klone aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

cDNA-Klon:*Mouse-serrate-1 (m-ser-1)**Lunatic Fringe (lFng)**Delta like 3 (Dll3)**Notch2**Retinoic Acid Aldehyd Dehydrogenase-2 (RALDH-2)***Dankend erhalten von:**

Dr. Domingos Henrique, Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina, Av. Prof. Egas Moniz, 1699 Lisboa Codex, Portugal

Dr. Tom Gridley, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, 04609

Dr. Sally Dunwoodie Mammalian Development, The National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, UK.

Dr. Michael Lardelli, Department of Genetics, The University of Adelaide 5005, AUSTRALIA

Dr. Ursula Drager, E. Kennedy Shriver Center, Waltham, MA 02452, USA.

**Yin und Yang sind eng miteinander verwurzelt.
Yin wächst aus Yang, Yang wächst aus Yin.
Yin und Yang sind in Bewegung,
beeinflussen und wandeln einander
Das menschliche Leben und alles das Form besitzt geht
nicht über Yin und Yang hinaus.**

Nei Jing (Inner Classic) ca. 100 v. Chr.

3. Ergebnisse

3.1. *Dll1* Expression im ZNS und PNS von E9.5 und E10.5 wildtyp Embryonen

Für die Analyse der wildtyp Expression von *Dll1* im sich entwickelnden Neuralrohr und PNS dienten wildtyp und heterozygote *Dll1^{lacZ}* Embryonen der Stadien E9.5-E10.5. Wie bereits beschrieben, sind die heterozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen phänotypisch unauffällig und die *LacZ* Expression reflektiert die Expression des endogenen *Dll1* Genes (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997). Da die Lebensdauer des LacZ Proteins jedoch länger ist als die der *Dll1* wildtyp RNA, spiegelte die *LacZ* Expression der heterozygoten *Dll1^{lacZ}* ein größeres Zeitfenster der *Dll1* Expression wider.

In E9.5 wildtyp Embryonen zeigte sich eine *Dll1* Expression im ZNS (**Abb.3.1-B, 3.2-B**). Ähnlich der beschriebenen Expression von *X-Delta* im *Xenopus* ZNS (Chitnis *et al.*, 1995) zeigte die genauere Betrachtung des E9.5 wildtyp Neuralrohres mehrere Expressionsdomänen von *Dll1*. Die beiden **dorsalen** und ventralen Expressionsdomänen von *Dll1* erstreckten sich jeweils von der subventrikulären Zone bis in die Mantelzone des Neuralrohrs (**Abb.3.2-A**). Die **ventrale** und dorsale Neuralrohrexpression von *Dll1* wird neueren Untersuchungen zur Folge von zwei unterschiedlichen Cis-regulatorischen Elementen gesteuert (Beckers *et al.*, 2000).

Die *LacZ* Expression in E10.5 heterozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen zeigte, dass *Dll1* zusätzlich zu seiner Expression im ZNS auch in den cranialen und spinalen Ganglien des sich entwickelnden PNS exprimiert wird (**Abb. 3.1-A**).

Neben den Expressionsdomänen im ZNS und PNS waren in E9.5 und E10.5 Embryonen weitere *Dll1* Expressionsdomänen im präsomitischen Mesoderm, als auch in den posterioren Hälften der Somiten der heterozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen sichtbar (**Abb. 3.1-A,B**). Wie bereits beschrieben, spielt *Dll1* hier eine wichtige Rolle in der Ausbildung und dem Erhalt der

Somiten, sowie ihrer a/p-Polarität (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997). Im Verlauf der weiteren fötalen Entwicklung fand sich *Dll1* Expression in vielen sich entwickelnden Organen (Beckers J *et al.*, 1999).

3.2. Morphologische Veränderungen im Neuroepithel der *Dll1^{lacZ}* Mutanten

Phänotypisch ließen sich homozygote *Dll1^{lacZ}* Embryonen bis einschließlich des embryonalen Stadiums E9.5 unter anderem durch ihre unregelmäßig geformten Somiten von ihren heterozygoten und wildtyp Wurfgeschwistern unterscheiden (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal war eine Veränderung der “links-rechts” Körperasymmetrie in einem Anteil der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen (Dr. G. Przemec, Manuskript in Arbeit). Die histologische Betrachtung von E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen ließ deutliche morphologische Veränderungen des Neuralrohrs erkennen. Das Neuroepithel war weniger dicht gepackt, die *Floorplate* erschien vergrößert und Defekte in der *Roofplate* waren sichtbar (**Abb. 3.1-J, 3.7-G,P**).

Ab dem embryonalen Stadium E10.5 waren die phänotypischen Veränderungen der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen gravierender. Die Hirnventrikel erschienen delatiert (**Abb. 3.1-C**) und stellenweise war das Neuroepithel eingerissen (**Abb. 3.1-D,E**). Zusätzlich traten interventrikuläre Blutungen, sowie ein Verlust der **caudalen** Segmentierung auf (**Abb. 3.1-C**; Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997). Verursacht wurden die interventrikulären Blutungen neben den Rissen im Neuroepithel unter anderem durch missgebildete Blutgefäße. Eine immunohistochemische Färbung gegen das endotheliale Protein PECAM (Jackson *et al.*, 1997) zeigte, dass in E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen zahlreiche Blutgefäße das Neuroepithel durchzogen, an der Apikalmembran endeten und sich in die Ventrikel ergossen (**Abb. 3.1-G,H**). Eine Erklärung für dieses Phänomen wurde bislang noch nicht gefunden, lässt aber eine Funktion von *Dll1* für die korrekte Ausbildung der Blutgefäße während der Vaskularisation vermuten. Vermutlich ist das Auftreten der interventrikulären Blutungen der Grund für die frühe Letalität der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen, die *in utero* zwischen den embryonalen Stadien E11.5-E12.0 starben.

Die histologische Analyse der homozygoten E10.5 *Dll1^{lacZ}* Embryonen zeigte, dass die Neuralrohrwände dünner waren als im vergleichbaren Wildtyp, und dass die palisadenförmige Anordnung der Zellen im Neuroepithel nicht mehr vorhanden war (**Abb. 3.1-L**). Die *Floorplate* war deutlich vergrößert und die *Roofplate*, wie bereits beschrieben, an zahlreichen

Stellen entlang der a/p Achse des Neuralrohrs defekt (**Abb. 3.1-L**). Zudem erschienen die Dorsalwurzelganglien in den E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen desorganisiert und kleiner als im vergleichbaren wildtyp Embryo (**Abb. 3.1-L**). Außerdem war entlang der gesamten a/p-Achse im Thorakalbereich der E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* das Auswachsen der spinalen Nerven gestört (**Abb. 3.1-L**). Auf Grund der starken morphologischen Defekte im homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr zum Entwicklungsstadium E10.5 wurden für die molekularbiologische Untersuchung des ZNS im wesentlichen Embryonen des morphologisch unauffälligeren Stadiums E9.5 verwendet.

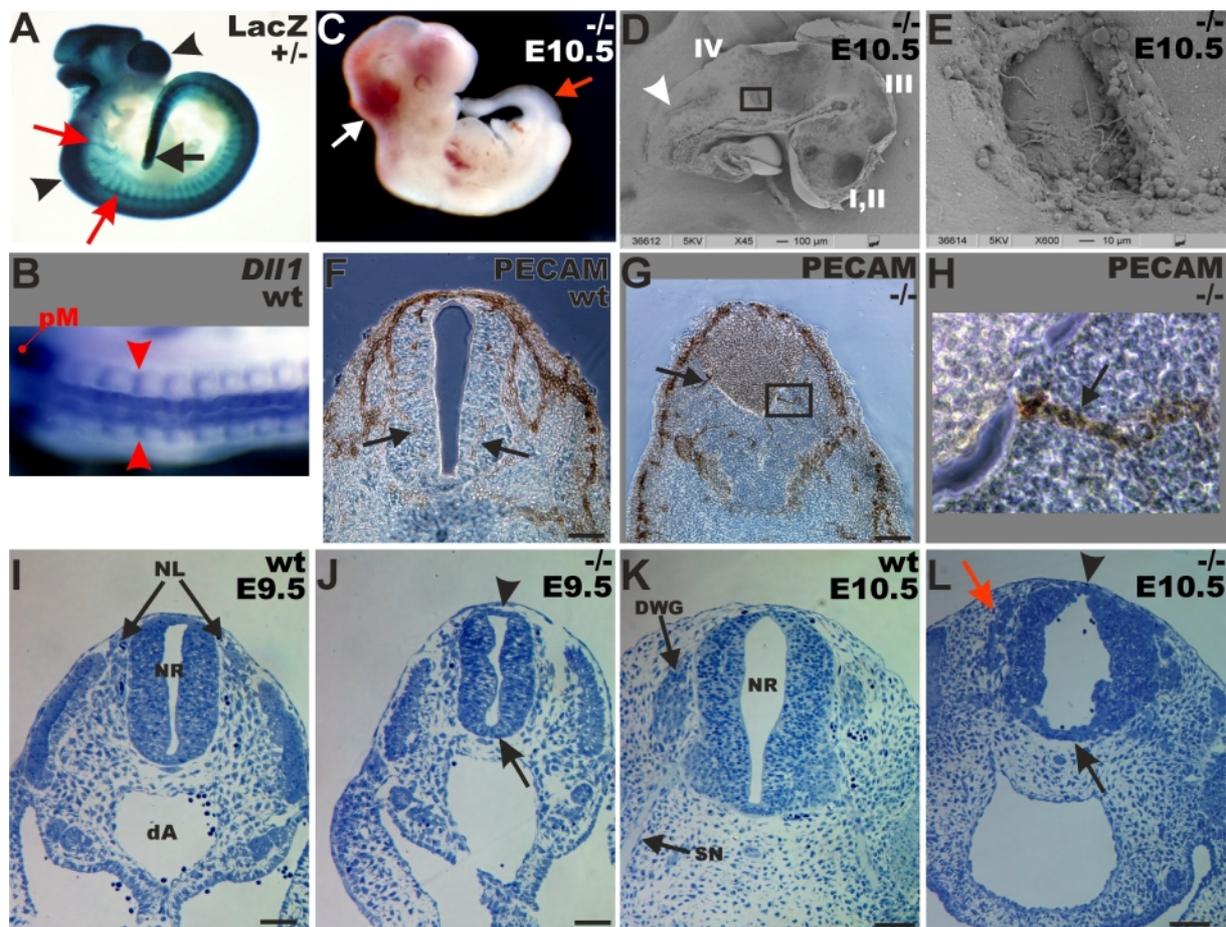


Abbildung 3.1: Dll1 Expression im WT und (histologischer) Phänotyp der *Dll1^{lacZ}* Mutanten.

(A,B) *Dll1* Expression: (A) X-Gal-Färbung eines E10.5 heterozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryos. Der Embryo zeigt keinen veränderten Phänotyp. Die *LacZ* Expression entspricht der *Dll1* WT Expression. Expression ist sichtbar im pM (Pfeil), im ZNS (Pfeilspitzen), sowie in den **cranialen** ~ und Dorsalwurzel-Ganglien (rote Pfeile). (B) **Dorsale** Aufsicht auf den Rumpf eines E9.5 WT Embryo nach „**Whole mount**“ RNA *in situ* Hybridisierung (Orientierung: Links=**posterior**, rechts=**anterior**). Expression von *Dll1* ist sichtbar im Neuralrohr, sowie in den posterioren Hälften der Somiten. (C) E10.5 homozygoter *Dll1^{lacZ}* Embryo: Die Hirnventrikel erscheinen hyperplastisch und eine interventrikuläre Blutung ist sichtbar (weißer Pfeil). **Caudal** ist keine Segmentierung zu erkennen (roter Pfeil). (D,E) REM der Hirnventrikel eines E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryos (Einblick in die Ventrikel I/II, III, IV). Das Neuroepithel weist zahlreiche Risse auf (Pfeilspitze, Kasten). (E) Vergrößerung des Kas-

tenausschnittes aus D. Zu sehen ist das aufgerissene Neuroepithel und das darunterliegende Mesoderm. (F-H) Cryotomschnitte von E10.5 Embryonen nach „Whole mount“ Immunocytochemie mit Anti-PECAM zur Markierung der Endothelzellen der Blutgefäße. (F) WT Neuralrohr Querschnitt. Die Blutgefäße (braune Färbung) durchziehen das Neuroepithel medial (Pfeile). (G,H) Im *Dll1^{lacZ}* Mutanten finden sich Blutgefäße die das gesamte Neuroepithel durchziehen und sich in die Ventrikel eröffnen (Pfeil, Kasten). Der gesamte ventrikuläre Raum ist angefüllt mit Blutzellen. (H) Vergrößerung des Kastenausschnittes aus G. Zu sehen ist ein Blutgefäß, das in den Ventrikel mündet (Pfeil). (I-L) 1µm histologische Dünnschnitte durch das Neuralrohr von E9.5 (I,J) und E10.5 (K,L) Embryonen. (I) E9.5 WT. (J) E9.5 *Dll1^{lacZ}*: Das Neuroepithel erscheint weniger dicht und Veränderungen in der *Floor-* (Pfeil) und *Roofplate* (Pfeilspitze) sind auffällig. (K) E10.5 Wildtyp. (L) E10.5 *Dll1^{lacZ}*: Das Neuroepithel erscheint weniger prominent als im Wildtyp. Die *Floorplate* (Pfeil) ist deutlich vergrößert und die *Roofplate* (Pfeilspitze) verändert. Die DWG sind desorganisiert und verkleinert (roter Pfeil), die SN sind nicht erkennbar.

pM, präsomitischen Mesoderm; NR, Neuralrohr; dA, dorsale Aorta; NL, Neuralleistenzellen; DWG, Dorsalwurzelganglion; SN, spinaler Nerv.

((— = 100µm (F,G,K,L); = 50µm (J,K)) (A,C= 25x, B = 50x vergrößert))

3.3. Veränderte Expression von Notch-Signaltransduktionsgenen im ZNS homozygoter *Dll1^{lacZ}* Embryonen

Zahlreiche Gene der Notch-Signaltransduktion wurden identifiziert, die in einem segmentspezifischen Muster wiederholt in den Somiten exprimiert werden. Diese molekularen Marker zeigen, dass bereits neuformierte Somiten in **anteriore** und **posteriore** Zelltypen unterteilt sind. Mutationen in Komponenten des Notch-Signaltransduktionsweges verhindern zwar nicht die Somitogenese an sich, haben jedoch eine Disorganisation der Somiten zur Folge. Der auffälligste Defekt in Notch-Signaltransduktionsmutanten ist dabei die gestörte a/p-Kompartimentalisierung der Somiten und der Verlust der Somitengrenzen (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997; Gossler and Hrabe de Angelis, 1998; Jiang *et al.*, 1998b; McGrew and Pourquie, 1998). Nullmutationen von *Notch-1*, *RBP-Jk* bzw. *Dll1* führen zu einer Missexpression anderer Notch-Signaltransduktionsgene innerhalb der Somiten, sowie einer Veränderung der Kompartimentalisierung der selben (Barrantes IB *et al.*, 1999; Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997). Innerhalb des sich entwickelnden Vertebraten-ZNS werden ebenfalls verschiedene an der Notch-Signaltransduktion beteiligte Gene in bestimmten aneinander grenzenden bzw. überlappenden Domänen exprimiert (Chitnis *et al.*, 1995; de la-Pompa *et al.*, 1997; Dunwoodie *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1997; Matise and Joyner, 1997; Myat *et al.*, 1996). Um der Fragestellung nachzugehen, ob sich die Notch-Signaltransduktionsgene im ZNS, ähnlich wie in den Somiten, in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen, wurde die Expression bestimmter

Notch-Signaltransduktionsgene innerhalb des *Dll1^{lacZ}* mutanten Neuralrohres näher untersucht.

Wie bereits beschrieben, besitzt *Dll1* im E9.5 wildtyp Neuralrohr eine **dorsale** und eine **ventrale** Expressionsdomäne. Dabei scheint die dorsale *Dll1* Expressionsdomäne die *Roofplate* und die **ventrale** Expressionsdomäne die *Floorplate* jeweils von beiden Seiten zu begrenzen (**Abb. 3.2-A**).

Die Expressionsdomänen von *Delta like 3* (*Dll3*), einem weiteren *Drosophila* Delta Homolog (Dunwoodie *et al.*, 1997) liegen im E9.5 wildtyp Neuralrohr innerhalb der *Dll1* Expressionsdomänen. Wobei die *Dll3* Expression jedoch auf die Mantelzone beschränkt ist (**Abb. 3.2-C**). Untersuchungen zur Folge wird *Dll3* von frühen, differenzierenden Neuronen exprimiert und folgt zeitlich der *Dll1* Expression (Dunwoodie *et al.*, 1997). Im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr glich die *Dll3* Expression der wildtyp *Dll1* Expression. *Dll3* erschien hochreguliert und die Expressionsdomänen bis in die subventrikuläre Zone ausgedehnt (**Abb. 3.2-D**). Weiterhin fiel eine ektopische *Dll3* Expressionsdomäne innerhalb des E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Telenzephalons auf, deren Expressionsmuster der *Dll1* wildtyp Expression zu gleichen schien (**Abb. 3.2-E,B**). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *Dll3* möglicherweise partiell für *Dll1* in den homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten substituiert.

Die Expressionsdomänen des Genes *lunatic Fringe* (*lFng*) (Johnston *et al.*, 1997), dessen Funktion möglicherweise notwendig für die Modulation der Notch-Signaltransduktion ist (Barrantes IB *et al.*, 1999), überlappen im E9.5 wildtyp Neuralrohr ebenfalls mit den *Dll1* Expressionsdomänen. Hierbei fällt auf, dass *lFng* von Zellen innerhalb der ventrikulären und subventrikulären Zone exprimiert wird (**Abb. 3.2-G**). Im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr war *lFng* sehr stark herunterreguliert und die Expressionsdomänen in ihrer d/v Ausdehnung stark verkleinert (**Abb. 3.2-H**).

Untersuchungen der *Drosophila* Beinentwicklung haben gezeigt, dass ein Verlust von *Fringe* (*Fng*), dem *Drosophila* Homolog zu *lFng*, zu Fusionierungen von Beinsegmenten und dem Verlust von Gelenken führt. Molekularbiologisch werden dabei Veränderungen in der segmentspezifischen Expression von *Serrate* und *Delta* beschrieben (Rauskolb and Irvine, 1999). Das *Serrate* Homolog *Mouse-Serrate-1* (*m-ser-1*) (Mitsiadis *et al.*, 1997) wird im **medialen** E9.5 wildtyp Neuralrohr in der Mantelzone zwischen der **dorsalen** und **ventralen** Expressionsdomäne von *Dll1* bzw. *lFng* exprimiert (**Abb. 3.2-I**). Es stellte sich also die Frage, ob analog zu den Befunden in *Drosophila* eine Verringerung der *lFng* bzw. der Verlust der *Dll1* Expression innerhalb des homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohrs auch Auswirkungen auf die *m-ser-1* Expression haben könnte. Tatsächlich zeigte sich eine Veränderung in der *m-ser-1* Expression in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten. Die Expressionsdomäne von *m-ser-1* erstreckte sich

in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten. Die Expressionsdomäne von *m-ser-1* erstreckte sich bis in die subventrikulären Zone und war in ihrer d/v-Ausdehnung deutlich vergrößert (**Abb. 3.2-J**).

Ein weiteres Notch-Signaltransduktionsgen, dessen Expressionsdomäne im Neuralrohr direkt an die Expressionsdomäne von *Dll1* grenzt, ist *Notch2* (Lindsell *et al.*, 1996). Im E9.5 wildtyp Neuralrohr wird *Notch2* spezifisch in der *Floorplate* exprimiert (**Abb. 3.2-K**) und grenzt an die ventrale Expressionsdomäne von *Dll1* (**Abb. 3.2-A**). Im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr wurde *Notch2* deutlich überexprimiert und die Expressionsdomäne erschien vergrößert (**Abb. 3.2-L**). Dieser Befund deutete auch molekularbiologisch auf eine Vergrößerung der *Floorplate* in den homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten hin, die bereits histologisch beschrieben wurde (**Abb. 3.1-J,L**). Die Ausdehnung der *m-ser-1* und der *Notch2* Expressionsdomänen im mutanten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr legen die Vermutung nahe, dass die *Dll1* Funktion möglicherweise für die korrekte Eingrenzung der jeweiligen Expressionsdomänen und somit auch der *Floorplate* notwendig ist.

Der potentielle Dll1 Rezeptor Notch1 wird ebenfalls innerhalb der ventrikulären und subventrikulären Zone des sich entwickelnden Neuralrohres exprimiert (**Abb. 3.2-M**). In *RBP-JK* und *Notch1*-Nullmutanten exprimieren mehr Zellen des ZNS *Dll1*. Dies lässt auf eine Überproduktion neuronaler Vorläuferzellen schließen. Der Grund dafür scheint der Verlust der durch Notch1 vermittelten **lateralen** Inhibition zu sein (de la-Pompa *et al.*, 1997). Um der Fragestellung nachzugehen, ob ein Verlust des Liganden Dll1 auf die Expression des potentiellen Rezeptors Notch1 Einfluss nehmen würde, wurde die Expression von *Notch1* in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten näher untersucht. Im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr schien die *Notch1* Expression nur leicht vermindert. Hierbei fiel auf, dass im dorsalen und ventralen Neuralrohr das Notch1 Expressionsmuster der wildtyp Expression glich (**Abb. 3.2-N**). Dieser Befund deutet darauf hin, dass möglicherweise andere Notch1 Liganden die Funktion von Dll1 teilweise substituieren können.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass auch innerhalb des sich entwickelnden Neuralrohres sich die einzelnen Notch-Signaltransduktionsgene in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen können.

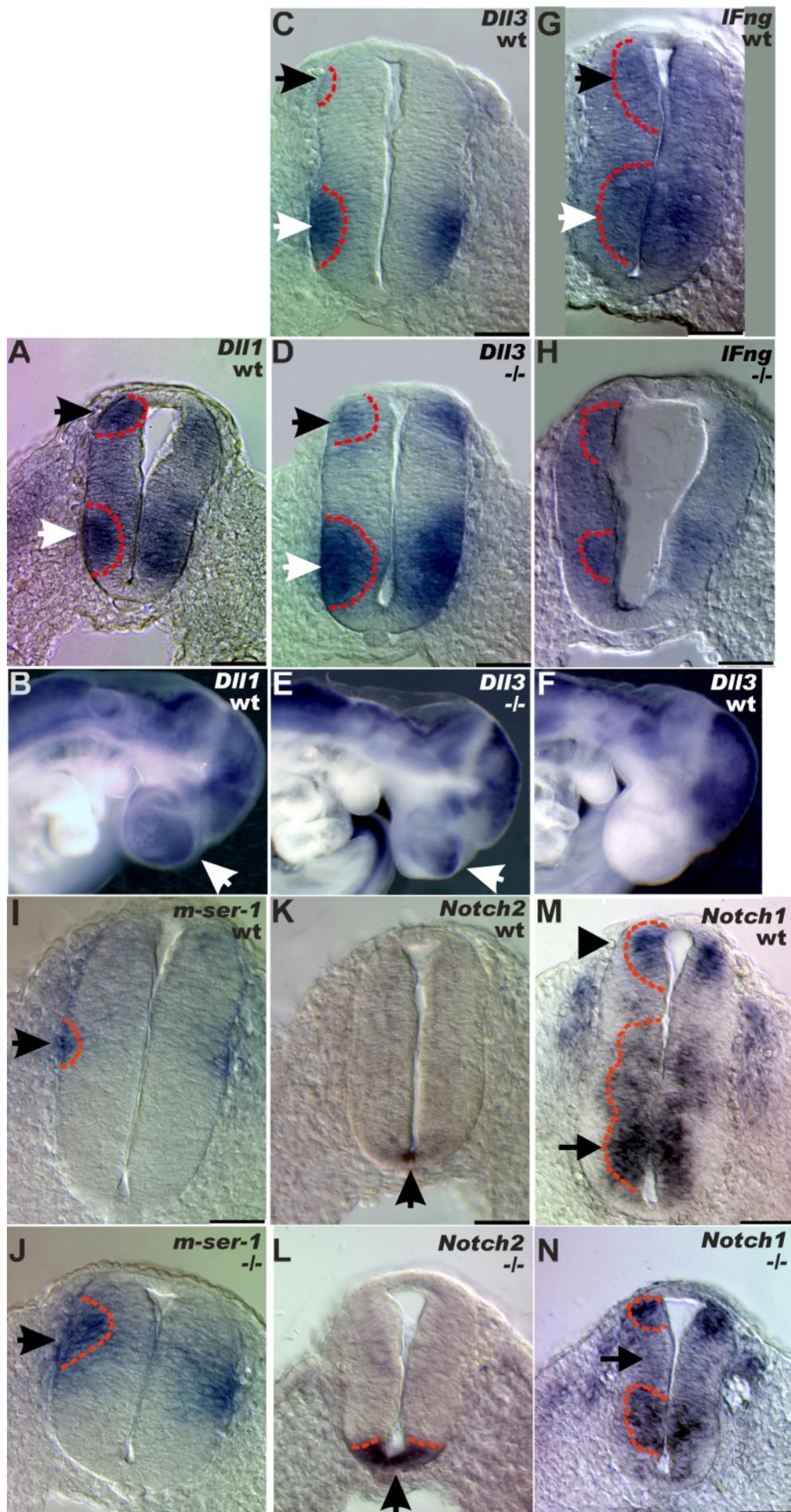


Abbildung 3.2: Veränderte Expression von Notch-Signaltransduktionspartnern im *DII^{lacZ}*-Neuralrohr.

Abb. 3.2: (A,C,D,G-N) 35µm Cryotomsschnitte durch das Neuralrohr (— ≙100µm) und (B,E,F) **laterale** Kopfansicht (40x vergrößert) von E9.5 Embryonen nach *in situ* Hybridisierung. (A,B) *Dll1* Expression im WT: (A) Im E9.5 Neuralrohr zeigt sich eine ventrale (weißer Pfeil) und eine dorsale (schwarzer Pfeil) Expressionsdomäne von *Dll1*, die sich von der subventrikulären Domäne bis zur Mantelzone erstreckt (---- in A). (B) *Dll1* Expression im E9.5 WT Telenzephalon. (C-F) *Dll3* Expression: (C) *Dll3* wird im E9.5 WT Neuralrohr ventral (weißer Pfeil) sowie in geringem Maße dorsal (schwarzer Pfeil) exprimiert. (D) Im mutanten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist die *Dll3* Expression ventral (weißer Pfeil) und dorsal (schwarzer Pfeil) hochreguliert. Im Gegensatz zum WT beschränkt sich die *Dll3* Expressionsdomäne im mutanten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr nicht nur auf die Mantelzone sondern erfasst auch die subventrikuläre Zone des Neuralrohrs (vgl. ---- in C,D) und ähnelt der *Dll1* WT Expression (vgl. A). (E) Im Telenzephalon von E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen zeigt sich eine ektopische *Dll3* Expressionsdomäne (weißer Pfeil). Diese gleicht der *Dll1* WT Expression (weißer Pfeil in B). (F) *Dll3* Expression im WT. (G,H) *IFng* Expression: (G) Im E9.5 WT wird *IFng* in der ventralen (weißer Pfeil) und dorsalen (schwarzer Pfeil) Hälfte des Neuralrohrs exprimiert. (H) Im *Dll1^{lacZ}* mutanten Neuralrohr ist die Expression von *IFng* deutlich verringert und die Expressionsdomänen sind verkleinert (vgl. ---- Linien G,H). (I,J) *m-ser-1* Expression: Die mediale Expressionsdomäne von *m-ser-1* ist im Vergleich zum WT (I) im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr (J) deutlich hochreguliert und ausgedehnt (vgl. ---- in I,J). (K,L) *Notch2* Expression: (K) Im E9.5 WT Neuralrohr wird *Notch2* in der *Floorplate* exprimiert (schwarzer Pfeil). (L) Im homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist die *Notch2* Expression deutlich hochreguliert (schwarzer Pfeil) und ausgedehnt (----), was auf eine vergrößerte *Floorplate* schließen lässt. (M,N) *Notch1* Expression: Im Vergleich zum E9.5 WT Neuralrohr (M) scheint die Expression von *Notch1* im homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr im wesentlichen nur im medialen Neuralrohr verringert (schwarzer Pfeil in N). Die starke, im WT sichtbare ventrale (Pfeilkopf in M) und dorsale (Pfeil in M) Expressionsdomäne scheint auch im mutanten Neuralrohr erhalten zu bleiben.

3.4. Herabregulierung von *Hes-5* und Überexpression von proneuralen Genen im ZNS homozygoter *Dll1^{lacZ}* Embryonen

Die Gene des *Enhancer of split Komplex* (*E(spl)*) von *Drosophila* kodieren für basische „Helix-Loop-Helix“ (bHLH) Transkriptionsfaktoren, die in der Lage sind, die Expression der proneuralen Gene der *achete-scute* (*ac-sc*) und der *atonal* Klasse herunter zu regulieren. Die räumliche und zeitliche Expression der einzelnen *E(spl)* Gene wird von der Aktivierung der Notch-Signaltransduktionskette beeinflusst (Jennings *et al.*, 1995). In Funktionsmodellen der lateralen Inhibition ist die Signaltransduktion von Notch abhängig von dessen Interaktion mit einem seiner Bindungspartnern wie zum Beispiel Delta (Jacobsen *et al.*, 1998; Lieber *et al.*, 1992; Rebay *et al.*, 1991).

Die Expression von *Hes-5*, einem Mitglied des in der Maus homologen *E(spl)* Komplexes ist in den Mausmutanten für Notch1 und RBP-Jκ deutlich herabgesetzt. Zugleich zeigen diese Mausmutanten eine Überexpression der proneuralen Gene wie zum Beispiel *Mash-1* oder *Math4a* (= *neurogenin 2* (*ngn2*)); Maushomologe der *Drosophila ac-sc* bzw. *atonal* Klasse (de la-Pompa *et al.*, 1997). Um herauszufinden, ob der Verlust von *Dll1* Einfluss auf die Notch-Signaltransduktionskette nimmt, wurde die Expression von *Hes-5* und verschiedener proneuraler Gene in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen mittels „Whole mount“ RNA *in situ* Hybridisierung untersucht. Im E9.5 Wildtyp ist die *Hes-5* Expression im **Mesenzephalon**, **Rhombenzephalon** und im Neuralrohr zu finden (**Abb. 3.3-A**). Histologische Analysen zeigten, dass im wildtyp Neuralrohr *Hes-5* entlang der subventrikulären Zone des Neuralrohrs exprimiert wird (**Abb. 3.3-B**). In den homozygoten *Dll1^{lacZ}* E9.5 Embryonen war hingegen die Expression von *Hes-5* in allen Domänen stark reduziert (**Abb. 3.3-D**). Histologisch zeigte sich, dass eine schwache *Hes-5* Expression auf den medialen Bereich des Neuralrohrs beschränkt war (**Abb. 3.3-E**).

Befunde in *Drosophila* zeigen, dass eine Herabsetzung der *E(spl)* Aktivität zu einer Überexpression der proneuralen Gene der *ac-sc* und *atonal* Klasse führt (Skeath and Carroll, 1992). Ergebnisse aus der Untersuchung der *Hes-5* bzw. *Mash1* und *ngn2* (*Math4a*) Expression in Notch1 und RBP-Jκ Mausmutanten (de la-Pompa *et al.*, 1997) führten zu der Vermutung, dass eine Herabsetzung der *Hes-5* Expression in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen eine Überexpression proneuraler Gene mit sich führen würde.

Tatsächlich zeigten verschiedene proneurale Gene eine deregulierte Expression in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen. Im E9.5 Embryonalstadium ist die wildtyp *Mash-1* Expression im ventralen **Telenzephalon**, dem Rhombenzephalon, im Neuralrohr und entlang der dorsalen Aorta zu finden (**Abb. 3.3-G**). Die Analyse histologischer Schnitte durch den Rumpfbereich zeigt, dass *Mash-1* eine dorsale, mediale und ventrale Expressionsdomäne innerhalb der subventrikulären Zone, des Neuralrohrs besitzt (**Abb. 3.3-H**). Es wurde gezeigt, dass es sich bei den *Mash-1* exprimierenden Zellen entlang der subventrikulären Zone um frühe neuronale Vorläuferzellen handelt, die noch zu einem gewissen Grad teilungsfähig sind und ihr endgültiges Zellschicksal noch nicht angenommen haben (Torii *et al.*, 1999). Die Expression von *Mash-1* in E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen war innerhalb des Neuroepithels deutlich verstärkt (**Abb. 3.3-I**). Die histologische Untersuchung des *Dll1^{lacZ}* mutanten Neuralrohrs im Rumpfbereich zeigte, dass die Expression von *Mash-1* besonders innerhalb des dorsalen Neuralrohrs verstärkt war, während die ventrale Expressionsdomäne nicht mehr aufgefunden wer-

den konnte. Dies deutet auf eine Überproduktion neuronaler Vorläuferzellen im dorsalen Neuralrohr, bzw. deren Verlust im ventralen Neuralrohr der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen hin. Auch das proneurale Gen *ngn2* zeigte eine veränderte Expression in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen. In E9.5 Wildtypembryonen wird *ngn2* im ventralen Mesenzephalon, im ventralen Rhombenzephalon und im Neuralrohr exprimiert (Abb. 3.3-K). In E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen zeigte sich eine deutliche Überexpression von *ngn2* vor allem im dorsalen Neuralrohr (Abb. 3.3-L).

Zusammenfassend lassen diese Befunde darauf schließen, dass in *Dll1* Mutanten offensichtlich ein Überschuss an neuronalen Vorläuferzellen ausgebildet wird.

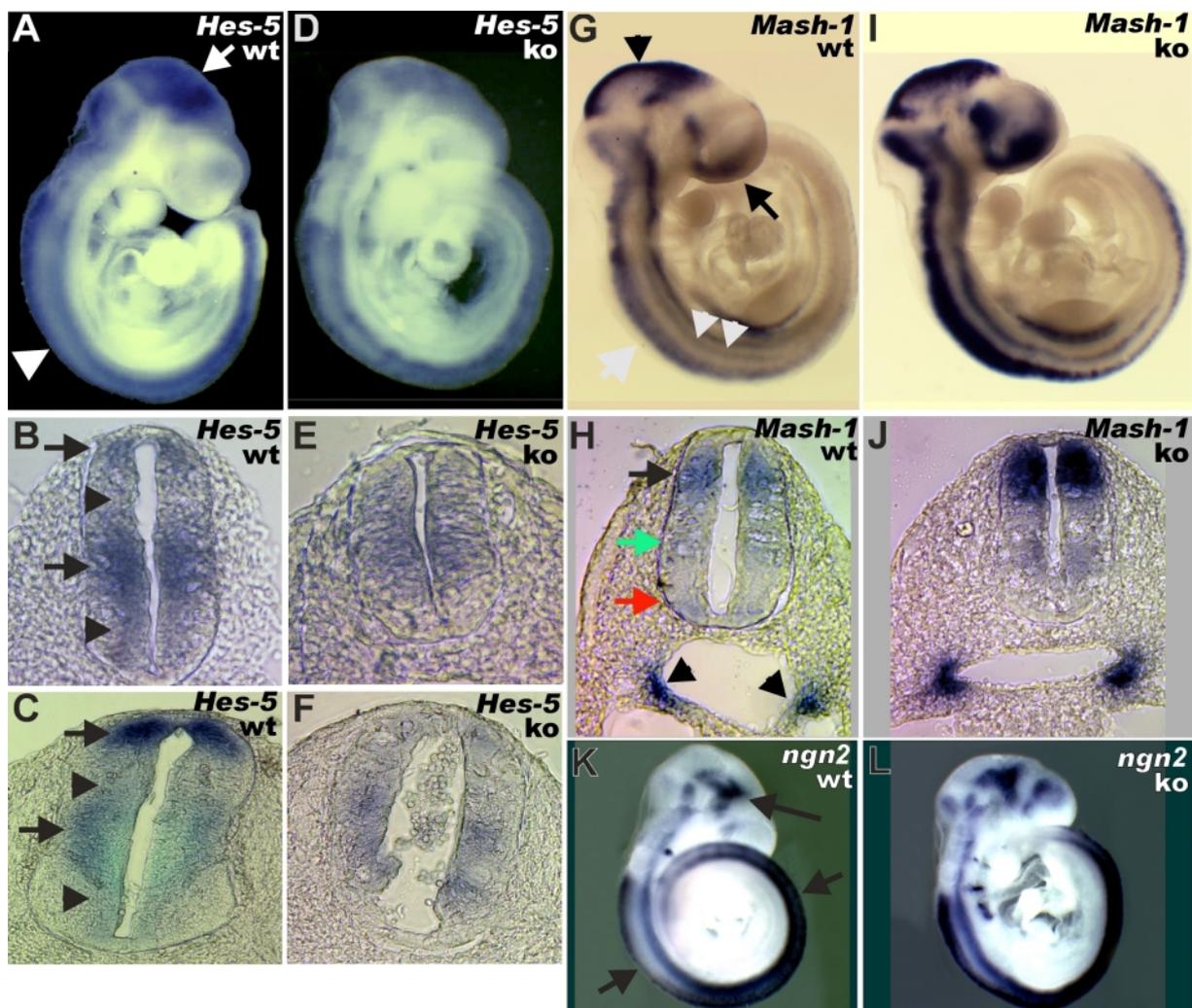


Abbildung 3.3: Herabregulation von *Hes-5* und Überexpression der proneuraler Marker *Mash-1* und *ngn2* im *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr.

„*Wohle mount*“ RNA *in situ* Hybridisierung von E9.5 Mäuseembryonen (A,D,G,I,K,L (40x vergrößert)) und 35µm Cryotomsschnitte durch das Neuralrohr von E9.5 (B,E,H,J) und E10.5 (C,F) Embryonen nach „*Whole mount*“ RNA *in situ* Hybridisierung. (A-F) *Hes-5* Expression: (A) *Hes-5* wird im E9.5 WT im Gehirn (Pfeil) und im Neuralrohr (Pfeilspitzen) exprimiert. (B) Ein Querschnitt durch das E9.5 WT Neuralrohr zeigt eine deutliche

Hes-5 Expression entlang der subventrikulären Zone (Pfeilspitzen) mit zwei Zonen stärkerer Expression (Pfeile). (C) Im E10.5 WT Neuralrohr zeigt sich ebenfalls eine sehr deutliche *Hes-5* Expression im dorsalen und medialen Neuralrohr (Pfeile), sowie entlang der gesamten subventrikulären Zone (Pfeilspitzen). (D) Im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo ist die *Hes-5* Expression deutlich herabreguliert. (E) Querschnitt durch das E9.5 *Dll1^{lacZ}* und (F) E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr Querschnitt mit verringerter *Hes-5* Expression. (G-J) E9.5 *Mash-1* Expression: (G) Im E9.5 WT wird *Mash-1* im Gehirn (Pfeil, Pfeilspitze) und im Neuralrohr (H), sowie im sympathischen Grenzstrang (weiße ~ (G), schwarze Pfeilspitzen (H)) exprimiert. (H) Der Querschnitt durch das E9.5 WT Neuralrohr zeigt deutlich eine dorsale (schwarzer ~), mediale (grüner ~) und ventrale (roter Pfeil) *Mash-1* Expressionsdomäne. (I) Im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo wird *Mash-1* im ZNS überexprimiert. (J) Der Querschnitt durch das *Dll1^{lacZ}* E9.5 Neuralrohr zeigt eine deutliche Überexpression im dorsalen Neuralrohr und einen Verlust der ventralen Expressionsdomäne (vgl. roter Pfeil in H). (K,L) *ngn2* (= *Math4a*) Expression. (K) Das proneurale Gen *ngn2* wird im E9.5 WT im ZNS exprimiert (Pfeile). (L) Im *Dll1^{lacZ}* E9.5 Embryo ist *ngn2* überexprimiert.

3.5. *Dll1^{lacZ}* Mutanten zeigen Veränderungen in der neuronalen Differenzierung des ZNS

Nachdem eine Überproduktion neuronaler Vorläuferzellen im ZNS der *Dll1^{lacZ}* Mutanten deutlich wurde, stellte sich die Frage, inwiefern die weitere neuronale Differenzierung im ZNS davon beeinflusst wird.

Während der frühen Entwicklung nehmen neuronale Vorläuferzellen innerhalb des ZNS abhängig von ihrer räumlichen Lage unterschiedliche Eigenschaften an, die das Schicksal ihrer neuronalen Nachfolgerzellen bestimmen. Diese Regionalisierung scheint durch sezernierte induktive Signale zu Stande zu kommen. Diese sind in der Lage bestimmte zellintrinsische Faktoren zu aktivieren, die zu einer Determinierung des jeweiligen Zellschicksals führen (Bang and Goulding, 1996; Lumsden and Krumlauf, 1996). Studien im sich entwickelnden Neuralrohr zeigten, dass bestimmte Neuronenklassen in charakteristischen Regionen entlang der d/v-Achse entstehen (Tanabe and Jessell, 1996). Diese d/v-Regionalisierung des Neuralrohrs wird dorsal durch BMP-abhängige Signale aus dem epidermalen Ektoderm sowie der *Roofplate* dirigiert und bedingt die Ausbildung der dorsalen sensorischen Interneuronen (Lee and Jessell, 1999). Ventral spielen Sonic Hedgehog (Shh)-abhängige Signale aus der Notochorda und der *Floorplate* eine Rolle in der Determinierung von Motoneuronen und bestimmter ventraler Interneuronen (Briscoe *et al.*, 1999; Ericson *et al.*, 1996; Marti *et al.*, 1995; Roelink *et al.*, 1995). Es wurde auch gezeigt, dass unabhängig davon Retinsäure aus dem umliegenden Mesoderm die Generierung bestimmter medialer Interneuronentypen bewirkt (Pierani *et al.*, 1999).

3.5.1. Veränderungen im ventralen ZNS der *Dll1^{lacZ}* Mutanten

3.5.1.1. Vergrößerte *Floorplate* und verstärkte Antwort auf Shh-Signalisierung im ventralen ZNS der *Dll1^{lacZ}* Mutanten

Wie gezeigt (siehe oben) war die *Floorplate* in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten morphologisch vergrößert. Neben der bereits beschriebenen Vergrößerung der *Floorplate*-spezifischen *Notch2*-Expressionsdomäne in den E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten, zeigte sich bereits in den E8.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen die *Floorplate*-spezifische Expressionsdomäne des „winged-helix“ Transkriptionsfaktor HNF-3 β (Weinstein *et al.*, 1994) deutlich vergrößert (**Abb. 3.4-C,D**). Untersuchungen haben gezeigt, dass durch HNF-3 β die Expression von *Shh* in der *Floorplate* induziert wird (Epstein *et al.*, 1999). Es war also auch eine vergrößerte *Shh* Expressionsdomäne in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten zu erwarten. Tatsächlich konnte eine deutlich vergrößerte *Shh* Expressionsdomäne in E9.5 und E10.5 Mutanten beobachtet werden (**Abb. 3.4-G,H**). Zusammenfassend zeigten alle untersuchten *Floorplate*-spezifischen Marker eine vergrößerte Expressionsdomäne. Die Zählung der *Floorplate*-Zellen in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten zeigte zudem, dass die Anzahl der Zellen in den E9.5 und E10.5 Mutanten signifikant vergrößert war (**Tab. 1**). Dies unterstützt den Befund der morphologisch vergrößerten *Floorplate* in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten.

Die vergrößerte *Shh* Expressionsdomäne in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten ließ vermuten, dass im Verhältnis zum Wildtyp auch mehr Shh-Protein gebildet werden könnte. Untersuchungen zur Folge spielt der nach dorsal abnehmende Konzentrationsgradient von Shh ausgehend von der Notochorda und der *Floorplate* für die Differenzierung und Determinierung der ventralen Neuronen eine wichtige Rolle (Ericson *et al.*, 1996). Eine vermehrte Bildung von Shh-Protein auf Grund einer vergrößerten *Floorplate* könnte somit eine Veränderung des d/v-Konzentrationsgradienten bewirken und dadurch die ventrale Neurogenese beeinflussen. Deshalb wurde die Expression von bestimmten Genen näher untersucht, deren Expression in starkem Maße von der Shh-Ortskonzentration abhängt. Eines dieser Gene ist das Shh-Zielgen *Gli1*. *Gli1* kodiert für einen Zinkfingermotiv beinhaltenden Transkriptionsfaktor, der innerhalb der Shh-Signaltransduktion von den Shh-responsiven Zellen im ventralen Neuralrohr exprimiert wird (**Abb. 3.4-I,K**) (Ruiz-i-Altaba, 1997). In E9.5 und E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen war die Expressionsdomäne von *Gli1* innerhalb des Neuralrohrs deutlich nach dorsal ausgedehnt. Daneben fiel eine starke Überexpression von *Gli1* im ventralen Neu-

ralrohr der homozygoten E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryonen auf, die in den E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten nicht mehr vorhanden war (Abb. 3.4-J,L).

Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass in *Dll1^{lacZ}* Mutanten scheinbar nicht nur mehr Shh-Protein produziert wurde, sondern auch dass quantitativ mehr Zellen innerhalb des ventralen Neuralrohrs auf Shh zu reagieren schienen.

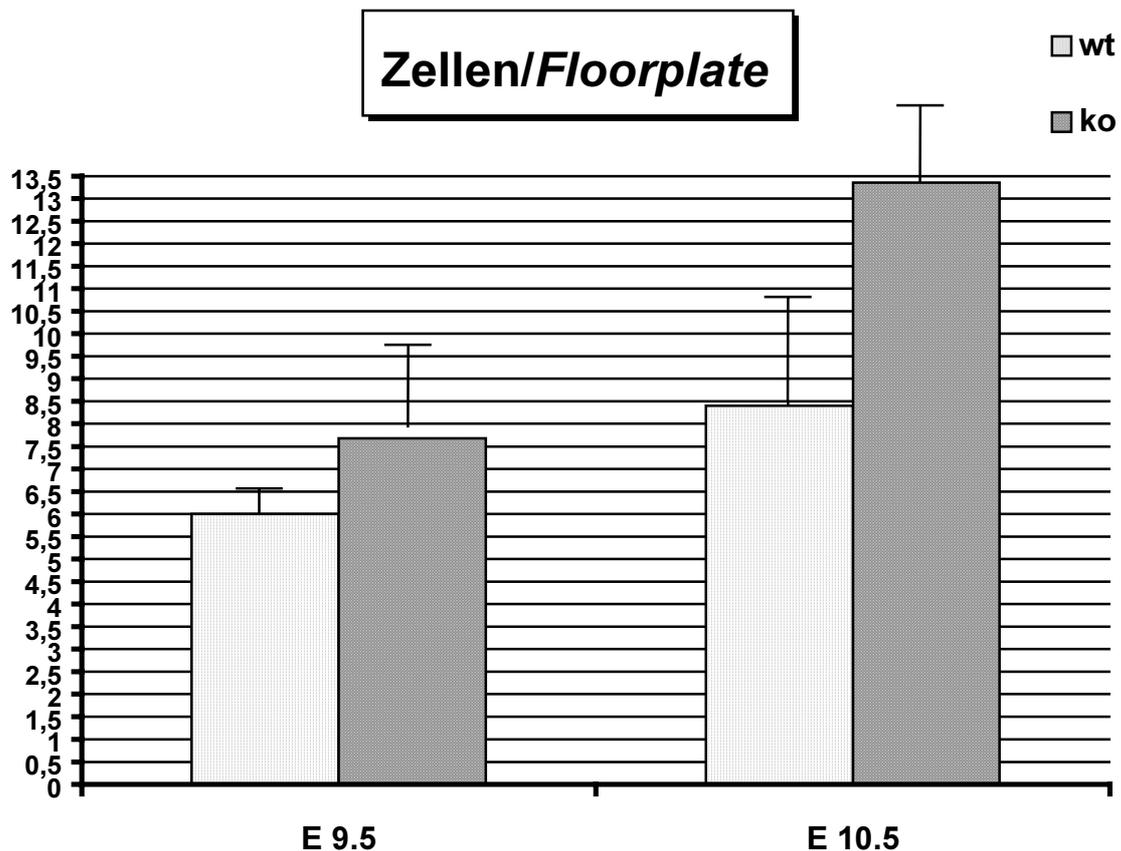


Tabelle 1: Durchschnittliche Anzahl der *Floorplate*-Zellen in E9.5 und E10.5 Wildtyp und *Dll1^{lacZ}* Mutanten: Ausgezählt wurde die Anzahl der *Floorplate*-Zellen in E9.5 wildtyp und *Dll1^{lacZ}* mutanten bzw. E10.5 wildtyp und *Dll1^{lacZ}* mutanten Embryonen entlang einer Strecke von 50µm in Abständen von 10µm. Für die Statistik wurden jeweils 5 Embryonen der entsprechenden Stadien und Genotypen verwendet und die durchschnittliche Anzahl der *Floorplate*-Zellen ermittelt. Die *Floorplate* der *Dll1^{lacZ}* Mutanten der Stadien E9.5 und E10.5 besaß dabei statistisch signifikant mehr Zellen als die vergleichbaren Wildtypen.

(Daten freundlicherweise überlassen von Dr. G. Przemeck)

3.5.1.2. Verfrühte Differenzierung von Motoneuronen im ventralen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten

Um der Frage nachzugehen, ob die Zunahme der Responsivität gegenüber dem Morphogen Shh im ZNS der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten auch einen Einfluss auf die zelluläre Determinierung der neuronalen Zellen bedeutete, wurde die Expression Motoneuronen-spezifischer Gene untersucht. Die Neurogenese im ventralen Neuralrohr verläuft in einer zeitabhängigen Weise von ventral nach dorsal ab, so dass zuerst die Ausbildung der ventralen Motoneuronen erfolgt. Spezifische Marker für die Bestimmung von Motoneuronen sind Gene der LIM Homeobox Familie. Ein Mitglied dieser Familie ist *Islet-1* das als erstes LIM Homeoboxgen in den Motoneuronen des ventralen Neuralrohrs exprimiert wird (Ericson *et al.*, 1992). Im Neuralrohr von E9.5 wildtyp Embryonen zeigt sich eine kleine *Islet-1* Expressionsdomäne bilateral in der sich entwickelnden Mantelzone des ventralen Horns (**Abb. 3.4-M**), die einen Tag später im E10.5 Wildtyp deutlich größer erkennbar ist (**Abb. 3.4-O**). Dahingegen war in E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen die *Islet-1* Expressionsdomäne stark vergrößert und bis auf die subventrikuläre und ventrikuläre Zone des ventralen Neuralrohrs ausgedehnt (**Abb. 3.4-N**). Einen Tag später erschien die *Islet-1* Expressionsdomäne in den E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen jedoch kleiner als die des wildtyp Embryos vergleichbaren Stadiums (**Abb. 3.4-P**). Bei der parallelen Betrachtung der Zellproliferation im E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr fiel gleichzeitig auf, dass die ventrikuläre Zone (gekennzeichnet durch die BrdU-Inkorporation) im *Dll1^{lacZ}* Mutanten Neuralrohr dünner erschien. Dies ließ auf weniger proliferative Zellen im mutanten Neuralrohr schließen. Besonders **lateral** der *Islet-1* Expressionsdomäne war keine Zellproliferation mehr zu sehen (**Abb. 3.4-P**). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass auf Grund fehlender lateraler Inhibition durch Dll1 in der ventrikulären Zone im E9.5 mutanten Neuralrohr eine verfrühte Differenzierung der neuronalen Vorläufer- und Stammzellen stattfindet. Dies hätte zur Folge, dass sich die Population der teilungsfähigen Zellen erschöpft und somit letztendlich quantitativ weniger Zellen ausdifferenzieren. Für einen Verlust neuronaler Vorläufer- und Stammzellen spricht das Expressionsmuster von *Pax6* im Neuralrohr der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten. *Pax6* wird im Wildtyp von neuronalen Vorläufer- und Stammzellen innerhalb der ventrikulären und subventrikulären Zone exprimiert (**Abb. 3.4-Q,S**). Im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr glich die *Pax6* Expression der wildtyp Expression (**Abb. 3.4-R**), jedoch im E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr war die *Pax6* Expression sehr stark reduziert (**Abb. 3.4-T**).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Zunahme der Responsivität gegenüber Shh auch einen Einfluss auf den Verlauf der Neurogenese im ventralen Neuralrohr

hat. Wobei die Überproduktion der früh differenzierenden ventralen Motoneuronen im ventralen Neuralrohr möglicherweise eine frühzeitige Erschöpfung der neuronalen Vorläufer- bzw. Stammzellen zur Folge hat.

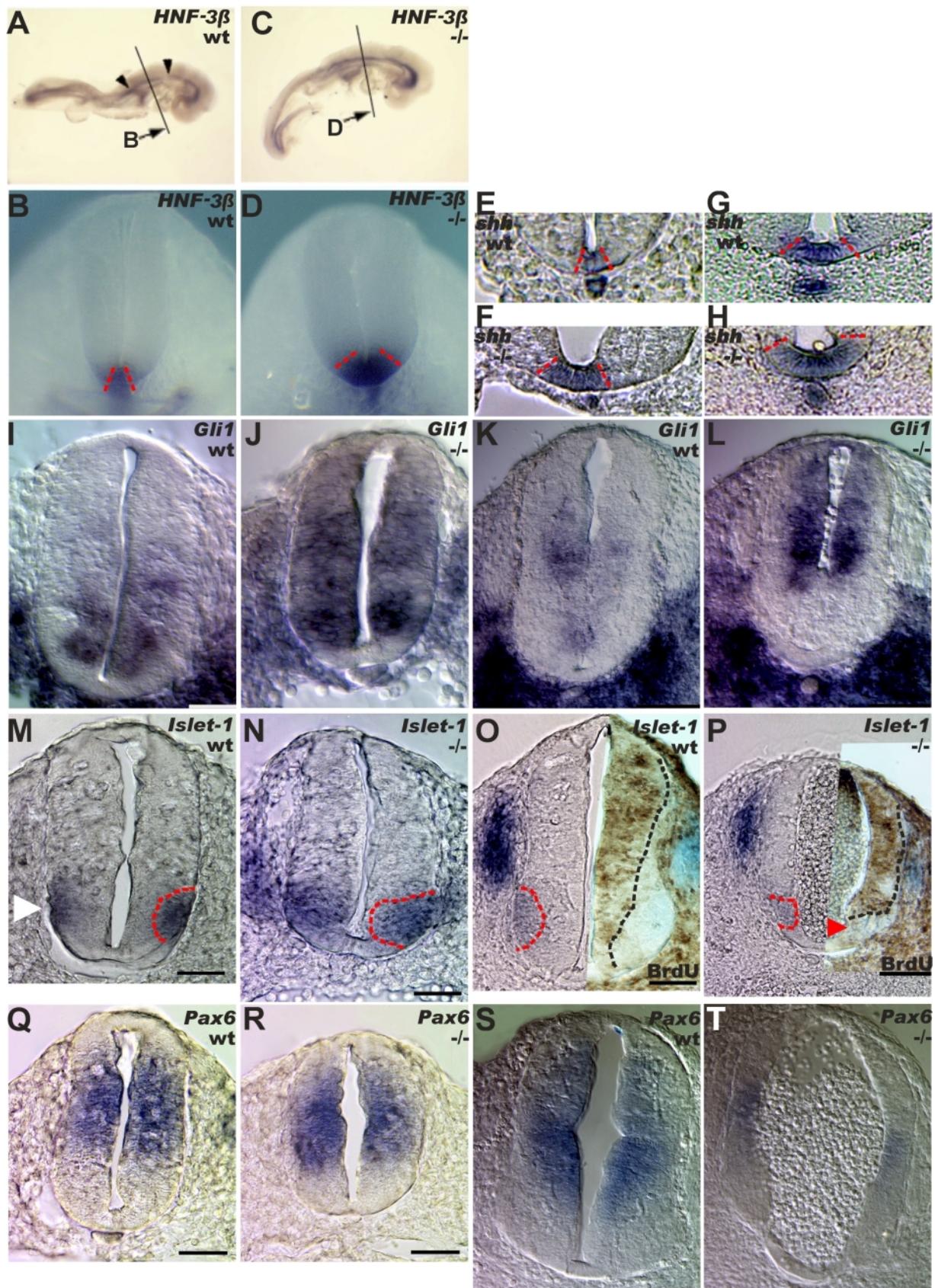


Abbildung 3.4: Vergrößerte *Floorplate* und verstärkte Antwort auf SHH im ventralen *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr (A,C) „Wohle mount“ RNA *in situ* Hybrdisierung von E8.5 Embryonen (B,D); Querschnitte wie indiziert in A und C; (E-T) 35 μ m Crytomschnitte nach „Wohle mount“ RNA *in situ* Hybrdisierung.

(A-D) *HNF-3β* Expression in E8.5 Embryonen: (A,B) Im WT Embryo wird *HNF-3β* in der *Floorplate* exprimiert (Pfeilköpfe in A und Querschnitt in B). (C,D) Im *Dll1^{lacZ}* Embryo ist *HNF-3β* überexprimiert und die Expressionsdomäne ist deutlich vergrößert (vgl. --- in Querschnitten in D und B). (E-H) *Shh* Expression: *Dll1^{lacZ}* Embryonen (F: E9.5; H: E10.5) weisen im Vergleich zu den jeweiligen WT Embryonen (E: E9.5; G: E10.5) eine vergrößerte *Shh* Expressionsdomäne auf (vgl. --- in E,F und G,H). (I-L) *Gli1* Expression: Im WT Neuralrohr (I: E9.5; K: E10.5) wird *Gli1* von Zellen im ventralen Neuralrohr exprimiert, die auf *Shh*-Signalisierung antworten können. (J,K) Im *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr (J: E9.5; K: E10.5) erscheint *Gli1* überexprimiert und die Expressionsdomäne dehnt sich weiter nach dorsal aus. Die starke Überexpression von *Gli1* im ventralen Neuralrohr der E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen war in den E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten nicht mehr vorhanden.

(M-P) *Islet-1* Expression: (M) Im E9.5 WT Neuralrohr wird *Islet-1* von frühen differenzierten Motoneuronen im ventralen Neuralrohr exprimiert (Pfeilkopf). (N) Im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist die *Islet-1* überexprimiert und die Expressionsdomäne beschränkt sich nicht nur auf die Mantelzone sondern reicht bis in die ventrikuläre Zone (vgl. --- in M,N). (O) *Islet-1* Expression im E10.5 WT Neuralrohr und BrdU Markierung proliferierender Zellen des Neuralrohres (rechte Bildhälfte). (P) Die *Islet-1* Expressionsdomäne im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr erscheint kleiner als die WT Expression (O). Auffällig ist ein Fehlen von proliferierenden Zellen im ventralen Neuralrohr auf Höhe der *Islet-1* Expressionsdomäne (Pfeilkopf, rechte Bildhälfte) (Q-T) *Pax6* Expression: (Q) Im E9.5 WT Neuralrohr wird *Pax6* von Zellen innerhalb der ventrikulären Zone exprimiert. (R) Die *Pax6* Expression im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr scheint im Vergleich zum WT unverändert. (S) *Pax6* Expression im E10.5 WT Neuralrohr. (T) Im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist die *Pax6* Expression verringert.

(Größenstandard : I,J,M,N,Q,R — = 50µm; K,L,O,P,S,T — = 100µm)

3.5.2. Reduktion medialer Neuralrohrmarker und Verlust ventraler Interneuronen im *Dll1^{lacZ}* mutanten Neuralrohr

Untersuchungen haben gezeigt, dass Retinsäure in der Lage ist die Expression medialer Interneuronenmarker in Neuralrohrexplantaten zu induzieren (Pierani *et al.*, 1999). Für *In vitro* und *in situ* Analysen dient die Expression, des an der endogenen Retinsäuresynthese beteiligten, Enzyms Retinsäure-Aldehyd-Dehydrogenase-2 (*RALDH-2*) dem Nachweis der Retinsäureproduktion (Niederreither *et al.*, 1997). Im E9.5 wildtyp Embryo wird *RALDH-2* **lateral** des Neuralrohrs im sich entwickelnden Sklerotom der Somiten exprimiert (**Abb. 3.5-A,B**). Da die homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen Defekte in der Somitogenese aufweisen (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997), stellte sich die Frage, ob davon auch die Retinsäureproduktion betroffen sein würde. Tatsächlich zeigten die E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen eine verminderte *RALDH-2* Expression. Dabei war insbesondere die Expression in der **caudalen** Körperhälfte betroffen (**Abb. 3.5-C**). Der Querschnitt durch den Rumpf **posterior** der vorderen Extremitätenknospe zeigte jedoch, dass die *RALDH-2* Expression in der **anterioren** Körperhälfte mit der

wildtyp Expression vergleichbar war (**Abb. 3.5-D**). Dies führte zur Vermutung, dass vor allem im **caudalen** Neuralrohr die Expression Retinsäure-induzierter Gene betroffen sein würde. Das Homeobox-Gen *Dbx2* wird durch Retinsäure induziert und ist ein spezifischer Expressionsmarker medialer Interneuronen-Vorläuferzellen im medialen Neuralrohr. Im E9.5 Wildtyp zeigt sich die *Dbx2* Expressionsdomäne als ein im medialen Neuralrohr von **cranial** nach caudal verlaufendes Band (**Abb. 3.5-E**). Die genauere Betrachtung des E9.5 Neuralrohrs in verschiedenen a/p-Ebenen zeigt, dass die d/v-Ausdehnung der *Dbx2* Expressionsdomäne nach caudal abnimmt (**Abb. 3.5-F,G**). Im darauffolgenden Stadium E10.5 ist die *Dbx2* Expression im wildtyp Neuralrohr als gleichmäßiges Band auffindbar (**Abb. 3.5-K**). Die *Dbx2* Expression im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryo war wie erwartet reduziert. Dabei fiel auf, dass die *Dbx2* Expression der *RALDH-2* Expression weitgehend folgte und im caudalen Neuralrohr nicht mehr vorhanden war (**vgl.: Abb. 3.5-C,H**). Querschnitte durch das mutante E9.5 Neuralrohr auf verschiedenen a/p-Ebenen zeigten, dass die Ausdehnung der *Dbx2* Expressionsdomäne innerhalb des Neuralrohrs auf Höhe der vorderen Extremitätenknospe stark reduziert war (**Abb. 3.5-I**). Weiter caudal war im mutanten E9.5 Neuralrohr nahezu keine Expression von *Dbx2* vorhanden (**Abb. 3.5-J**). Im weiterentwickelten E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr war schließlich gar keine *Dbx2* Expression mehr nachweisbar (**Abb. 3.5-L**).

Wie bereits erwähnt, wird *Dbx2* in Vorläuferzellen medialer Interneuronen exprimiert. Es stellte sich demnach die Frage in wie weit sich die Reduktion der *Dbx2* Expression in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten in der Ausbildung der differenzierten Interneuronen auswirken würde.

Eine der ersten Neuronen die sich aus *Dbx2* exprimierenden Vorläuferzellen differenzieren, sind die ventralen Interneuronen der Klasse V1. Als Marker für postmitotische V1 Interneuronen dient der Homeobox-Transkriptionsfaktor Engrailed1 (*En1*) (**Abb. 3.5-M,N**) (Ericson *et al.*, 1996; Matise and Joyner, 1997; Wurst *et al.*, 1994). Im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryo war die *En1* Expression im Rumpfbereich verringert (**Abb. 3.5-O**). Bei genauerer Betrachtung des homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohres konnte bereits unmittelbar **posterior** der vorderen Extremitätenknospe keine *En1* Expression mehr nachgewiesen werden (**Abb. 3.5-P**). Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass obwohl dem Anschein nach im anterioren Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten die Retinsäureproduktion unverändert war, weniger Zellen im medialen Neuralrohr durch Retinsäuresignalisierung induziert wurden. Darüber hinaus wurden trotz Vorhandenseins *Dbx2* exprimierender Vorläuferzellen, keine V1 spezifischen Interneuronen im mutanten Neuralrohr gefunden. Dies deutet darauf hin, dass *Dll1* möglicherweise in der Diversifizierung verschiedener Neuronenklassen innerhalb des ZNS eine Rolle spielen könnte.

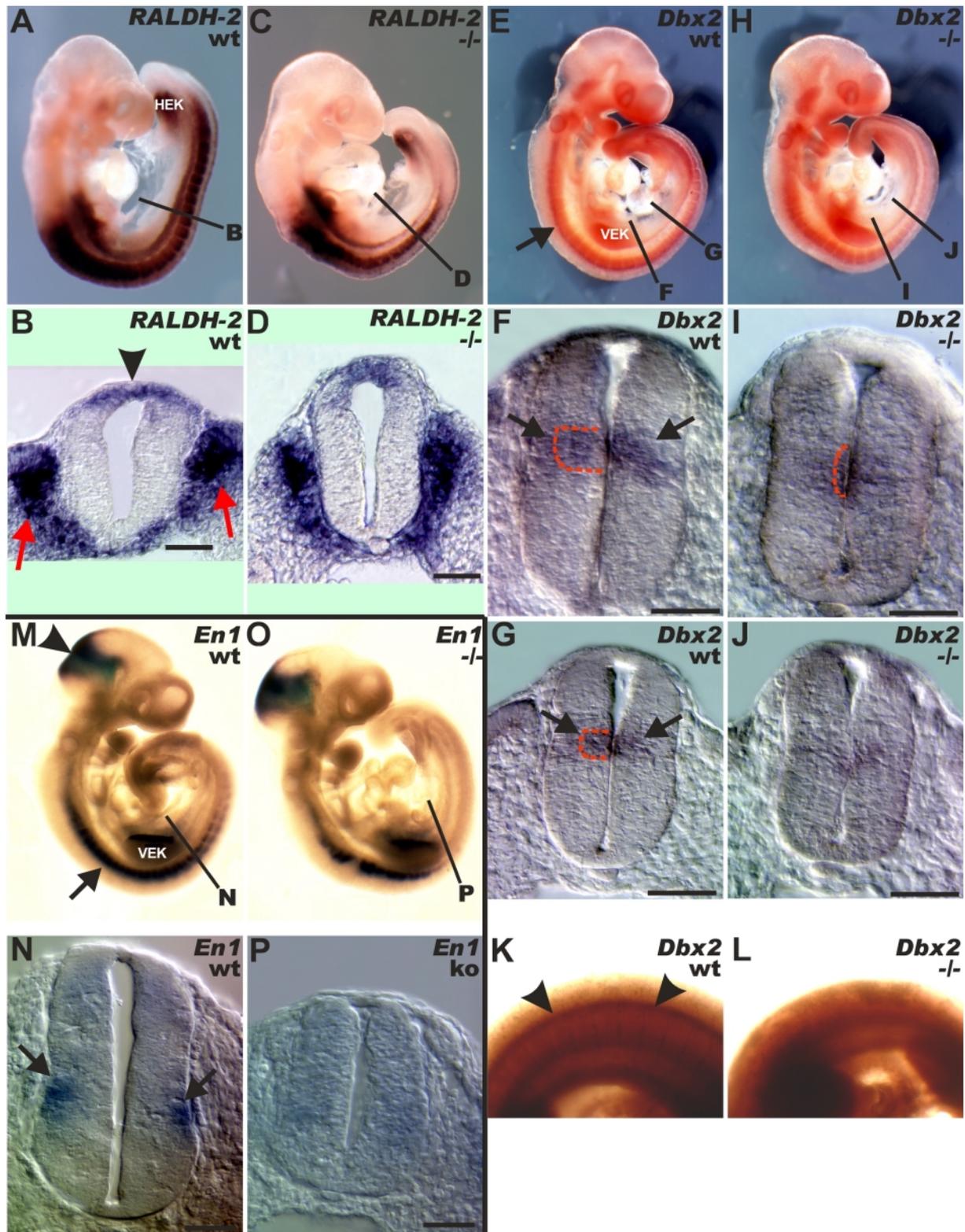


Abbildung 3.5: Verminderte Expression medialer Neuralrohrmarker in *Dll1^{lacZ}* Embryonen.

„Wohle mount“ RNA *in situ* Hybridisierung von E9.5 (A,C,E,H,M,O), E10.5 (K,L) Embryonen und 35µm Cryotomschnitte durch das Neuralrohr von E9.5 Embryonen nach „Wohle mount“ RNA *in situ* Hybridisierung (B,D,F,I,G,J,N,P). (A-D) *RALDH-2* Expression: (A) Im E9.5 WT Embryo dehnt sich die *RALDH-2* Expressionsdomäne von der posterioren Hälfte des Rhombenzephalons nach **caudal** bis zur sich entwickelnden hinteren Extremitätenknospe (HEK) aus. (B) Ein Querschnitt durch das E9.5 WT Neuralrohr zeigt, dass das umliegende Sklerotom (rote Pfeile) und die *Roofplate* (Pfeilspitze) deutlich *RALDH-2* exprimieren. (C) Die *RALDH-2* Ex-

pression im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo ist im Vergleich zum WT nach **caudal** verringert. (D) Ein Querschnitt durch das Neuralrohr auf der dem WT vergleichbaren Ebene zeigt, dass die Expression von *RALDH-2* im Sklerotom unverändert erscheint. Die *Roofplate*-Expression ist jedoch verringert. (E-L) *Dbx2* Expression: (E) Im E9.5 WT Embryo wird *Dbx2* im medialen Bereich des Rhombenzephalons und des Neuralrohrs exprimiert (Pfeil). (F,G) Querschnitte durch das WT Neuralrohr auf den in E markierten a/p-Ebenen: Es zeigt sich, dass im E9.5 Neuralrohr die Expression von *Dbx2* entlang der a/p-Achse nach caudal abnimmt. (H) Im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo ist die Expression von *Dbx2* im Neuralrohr verringert. (I,J) Querschnitte durch das *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr auf den in H markierten a/p-Ebenen: (I) Es zeigt sich, dass bereits auf Höhe der vorderen Extremitätenknospe (VEK) die *Dbx2* Expressionsdomäne verringert ist. (J) Weiter caudal ist die *Dbx2* Expression kaum mehr nachweisbar. (K,L) **laterale** Ansicht auf den Rumpf von E10.5 Embryonen: (K) Im E10.5 WT Embryo ist eine gleichmäßige *Dbx2* Expression im medialen Neuralrohr zu sehen (Pfeilspitzen). (L) Im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist keine *Dbx2* Expression zu erkennen. (M-P) *En1* Expression: (M) Im E9.5 WT wird *En1* in der Mittel-Hinterhirngrenze (Pfeilspitze), im Dermomyotom (Pfeil), sowie in der VEK exprimiert. (N) Ein Querschnitt durch das E9.5 WT Neuralrohr zeigt, dass *En1* in einer bestimmten Klasse ventraler Interneuronen exprimiert wird (Pfeile). (O) Die Expression von *En1* ist im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Dermomyotom vermindert. Die Expressionsdomäne in der Mittel-Hinterhirngrenze erscheint verbreitert. (P) Der Querschnitt durch das *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr auf Höhe der VEK zeigt, dass keine *En1* exprimierenden Interneuronen nachweisbar sind.

((A,C,E,H,M,O = 40x vergrößert), — = 50µm (B,D,F,I,G,J,N,P))

3.5.3. Veränderungen im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten

3.5.3.1. Unveränderte Expression dorsaler ZNS Marker im homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr und Überexpression proneuraler Marker

Um der Frage nachzugehen, ob neben den gefunden Veränderungen im ventralen und medialen Neuralrohr auch Veränderungen im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten vorlagen, wurde die Expression dorsaler ZNS Expressionsmarker näher betrachtet. Die „paired box“ beinhaltenden Homeo-Transkriptionsfaktoren *Pax3* und *Pax7* werden spezifisch in der dorsalen Hälfte des Neuralrohres exprimiert (**Abb. 3.6-A,C,E**). Untersuchungen an *Pax3/Pax7* Doppelmutanten haben gezeigt, dass die Expression beider Gene für die korrekte d/v-Organisation des Neuralrohrs notwendig ist (Mansouri and Gruss, 1998). In den homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen der Stadien E9.5 und E10.5 erschien die *Pax3* und *Pax7* Expression im Neuralrohr generell unverändert (**Abb. 3.6-B,D,F**). Dies lässt darauf schließen, dass die allgemeine d/v-Organisation des Neuralrohrs in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten nicht verändert ist.

Wie beschrieben, wurden die proneuralen Gene *Mash1* und *ngn2* in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten überexprimiert (**Abb. 3.3-I,L**). Besonders auffällig war die starke Überexpression dieser Gene im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten (**Abb. 3.3-J, 3.6-H,J**). Es stellte sich die Frage,

ob neben der Überproduktion proneuraler Zellen im dorsalen Neuralrohr der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen auch mehr differenzierte **dorsale** sensorische Interneuronen vorliegen würden. Es zeigte sich jedoch, dass im E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr die Expression von β -Tubulin-III, einem Zellmatrixprotein spezifisch für sensorische Nervenzellen, im E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr der wildtyp Expression gleich (**Abb. 3.6-H**).

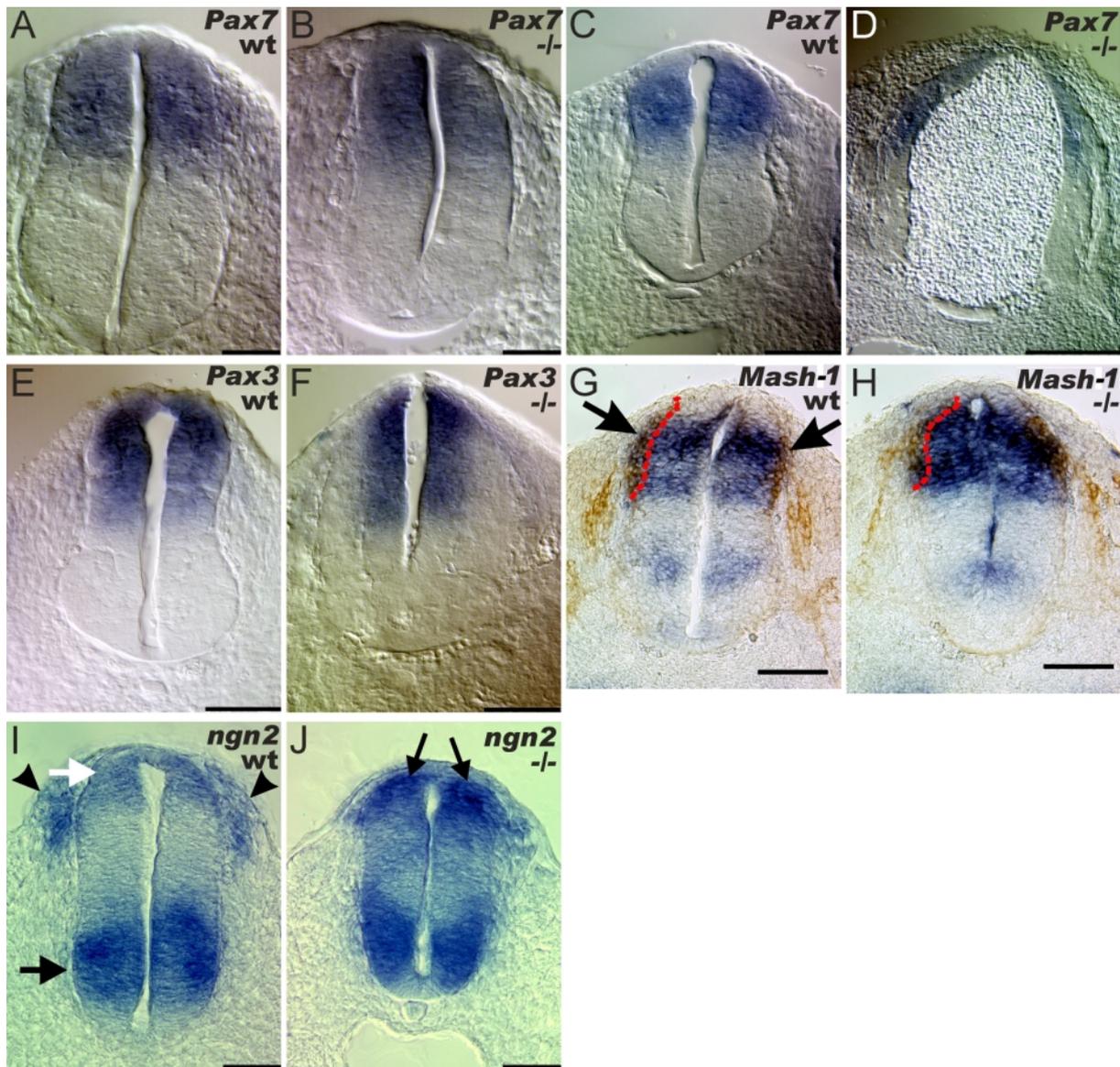


Abbildung 3.6: Unveränderte Expression dorsaler Marker und Überexpression proneuraler Gene im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten.

35 μ m Querschnitte durch das Neuralrohr von E9.5 (A,B,I,J) und E10.5 (C-H) Embryonen nach „Whole mount“ RNA *in situ* Hybridisierung. (Schnittebene: posterior der vorderen Extremitätenknospe). (A-D) *Pax7* Expression: (A) *Pax7* wird im E9.5 Embryo in der dorsalen Hälfte des Neuralrohr exprimiert. (B) Die *Pax7* Expression im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist unverändert. (C) *Pax7* Expression im E10.5 WT Neuralrohr. (D) Die Expression von *Pax7* im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist unverändert. (E,F) *Pax3* Expression : (E) *Pax3* wird in der dorsalen Hälfte des E10.5 WT Neuralrohr exprimiert. (F) Die *Pax3* Expression im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist unverändert. (G,H) *Mash-1* Expression: (G) *Mash-1* wird im E10.5 WT Neuralrohr in der dorsalen Hälfte exprimiert. (H) Die *Mash-1* Expression im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist unverändert. (I,J) *ngn2* Expression: (I) *ngn2* wird im E9.5 WT Neuralrohr in der dorsalen Hälfte exprimiert. (J) Die *ngn2* Expression im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist unverändert. (Pfeile in I und J zeigen auf die Expression von *ngn2* im E9.5 WT Neuralrohr, Pfeile in J zeigen auf die Expression von *ngn2* im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr). (Rote gestrichelte Linien in G und H zeigen auf die Expression von *Mash-1* im E10.5 WT Neuralrohr, Pfeile in H zeigen auf die Expression von *Mash-1* im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr).

dert. (G,H) Doppel-*in situ* Hybridisierung gegen *Mash1* (blau) und Anti- β Tubulin-III (braun). (G) *Mash1* wird im E10.5 WT Neuralrohr deutlich dorsal und in zwei schwächeren Domänen medial und ventral von proneuralen Zellen exprimiert (vgl. auch **Abb. 3.3-H**). β Tubulin-III wird von differenzierten sensorischen Interneuronen (Pfeile) in der Mantelzone des dorsalen Neuralrohrs exprimiert (---- Linie). (H) im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist *Mash1* in der dorsalen Hälfte des Neuralrohrs überexprimiert und die ventrale Expressionsdomäne ist nicht vorhanden (vgl. auch **Abb. 3.3-J**). Die β Tubulin-III Expressionsdomäne erscheint jedoch unverändert (---- Linie). (I,J) *ngn2* Expression: (I) Im E9.5 WT Neuralrohr wird *ngn2* ventral (schwarzer Pfeil) und dorsal (weißer Pfeil), sowie in den auswandernden Neuralleistenzellen exprimiert (Pfeilspitzen). (J) Im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr ist *ngn2* dorsal deutlich überexprimiert (Pfeile). Die ventrale Expression und die Expression in den Neuralleistenzellen erscheint unverändert.

(— = 50 μ m (A,B,I,J); = 100 μ m (C-H))

3.5.3.2. Reduktion der *Wnt1*, *Wnt3a* Expression in der *Roofplate* der *Dll1^{lacZ}* Mutanten

Nachdem bereits morphologische Veränderungen in der *Roofplate* der *Dll1^{lacZ}* Mutanten aufgefallen waren (**Abb. 3.1-J,L**), war von Interesse ob sich auch molekularbiologische Veränderungen in der *Roofplate* der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen finden würden. Die Gene *Wnt1* und *Wnt3a* dienten hierbei als *Roofplate*-spezifische Marker. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression dieser *Wnt*-Gene notwendig für die Spezifizierung dorsaler Neuralrohrzellen und die Aufrechterhaltung der Neuralleistenzellpopulation notwendig ist (Dickinson *et al.*, 1994; Ikeya *et al.*, 1997; McMahan and Bradley, 1990; Takada *et al.*, 1994). Im E9.5 und E10.5 wildtyp Embryo wird *Wnt1* neben der Expression in der *Roofplate* auch in der Mittelhirn-Hinterhirngrenze exprimiert (**Abb. 3.7-A-D**). Bei der Analyse der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen fiel auf, dass die Expression von *Wnt1* herunterreguliert war (**Abb. 3.7-G**). Bei genauerer Betrachtung zeigten sich Expressionslöcher entlang der *Roofplate*. Diese Expressionslöcher befanden sich an Stellen entlang der a/p-Achse des Neuralrohrs in denen die *Roofplate* morphologisch verändert war (**Abb. 3.7-G**). An diesen Stellen hatte es den Anschein als wäre die *Roofplate* verdünnt bzw. eine Hälfte der *Roofplate* von der lateralen Wandung des Neuralrohres abgelöst (**Abb. 3.7-G,P; 3.1-L**). Die Reduktion der *Wnt1* Expression und die auffälligen Expressionslöcher nahmen im E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryo zu (**Abb. 3.7-H**). *Wnt3a* wird im wildtyp Embryo ebenfalls in der *Roofplate* und zudem im anterioren Mesenzephalon, sowie im unsegmentierten präsomitischen Mesoderm exprimiert (**Abb. 3.7-I-K**). Die E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen zeigten eine starke Herabregulierung der *Wnt3a* Expression (**Abb. 3.7-L**). Vor allem in der *Roofplate* war die Expres-

sion stark vermindert und in E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten nicht mehr zu sehen (Abb. 3.7-M,N). Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur innerhalb der morphologisch veränderten *Roofplate* eine veränderte Genexpressionen vorliegt, sondern auch dass die Veränderungen im Laufe der Weiterentwicklung zunehmen. Zudem ist die Expression bestimmter *Roofplate*-spezifischer Gene entlang der gesamten a/p-Achse dereguliert. Dies lässt eine Beteiligung von *Dll1* an der Ausbildung bzw. Aufrechterhaltung einer intakten *Roofplate* vermuten.

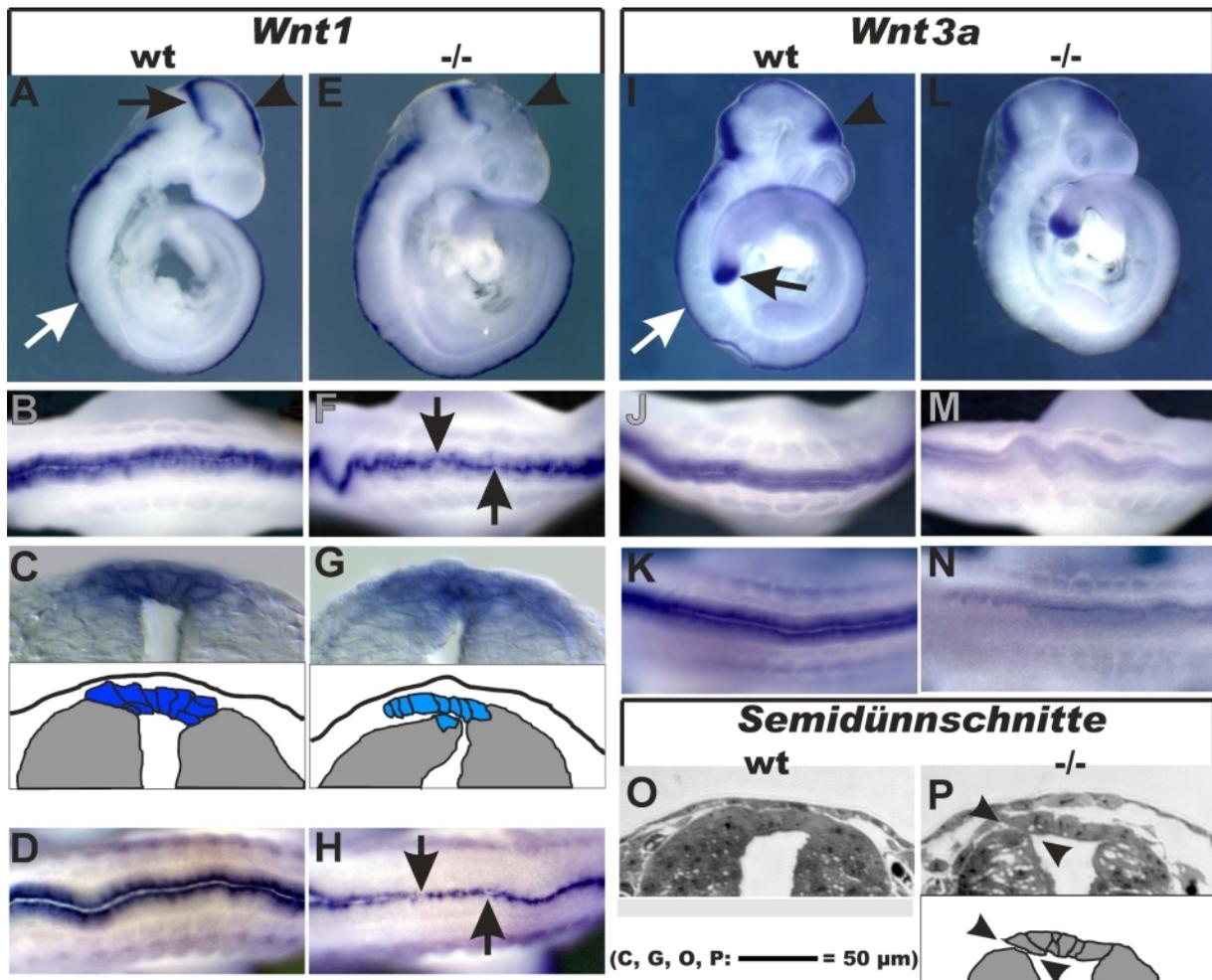


Abbildung 3.7: Verminderte Expression von *Wnt1/-3a* in der *Roofplate* von *Dll1^{lacZ}* mutanten Embryonen.
 „Whole mount“ RNA *in situ* Hybridisierungen von E9.5 (A,B,E,F,I,J,L,M) und E10.5 (K,N,D,H) Embryonen und 35μm Cryotomschnitte von E9.5 Embryonen nach „Whole mount“ RNA *in situ* Hybridisierung (C,G), sowie 1μm histologische Dünnschnitte von E9.5 Embryonen (O,P). (A-H) *Wnt1* Expression: (A) Im E9.5 WT Embryo wird *Wnt1* von den Mittellinienzellen des Mesenzephalons (Pfeilspitze), entlang der Mittel-Hinterhirngrenze (schwarzer Pfeil), sowie in der *Roofplate* (weißer Pfeil) exprimiert. (B) Dorsale Aufsicht auf das E9.5 WT Neuralrohr. (C) Oberer Abschnitt: Querschnitt durch das E9.5 WT Neuralrohr; Deutlich erkennbar ist die *Wnt1* Expression in den *Roofplate*-Zellen. Unterer Abschnitt: Schematische Darstellung des histologischen Schnittes. (D) Dorsale Aufsicht auf das E10.5 WT Neuralrohr. (E) Die *Wnt1* Expression im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo ist im Mittelhirn verringert (Pfeilspitze). (F) Dorsale Aufsicht auf das E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr: Innerhalb der *Roofplate*

erscheint die Expression von *Wnt1* verringert und ist teilweise unterbrochen (Pfeile). (G) Oberer Abschnitt: Der Querschnitt durch das Neuralrohr innerhalb eines in F markierten Bereiches zeigt eine defekte, scheinbar aufgebrochene *Roofplate* mit verminderter *Wnt1* Expression. Unterer Abschnitt: Schematische Darstellung des histologischen Schnittes. (H) Die dorsale Aufsicht auf das E10.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr zeigt eine weitere Verringerung der *Wnt1* Expression und eine Zunahme der Stellen fehlender *Wnt1* Expression innerhalb der *Roofplate* (Pfeile). (L-N) *Wnt3a* Expression: (I) Im E9.5 WT Embryo wird *Wnt3a* im **anterioren** Mesenzephalon (Pfeilspitze), in der *Roofplate* (weißer Pfeil) und im präsomitischen Mesoderm (schwarzer Pfeil) exprimiert. (J) Dorsale Aufsicht auf das E9.5 WT Neuralrohr. (K) Dorsale Aufsicht auf das E10.5 WT Neuralrohr. (L,N) Im E9.5 und im E10.5 (N) *Dll1^{lacZ}* Embryo wird *Wnt3a* in *Roofplate* nahezu nicht exprimiert. (O). Die *Roofplate*-Zellen im E9.5 WT Neuralrohr erscheinen kompakt und mit den lateralen Seiten des Neuroepithels verbunden. (P) An zahlreichen Stellen des E9.5 *Dll1^{lacZ}* Neuralrohres treten Defekte innerhalb der *Roofplate* auf. Die Zellen erscheinen morphologisch dünner und zum Teil von der lateralen Seite des Neuroepithels abgelöst (Pfeilspitzen; schematische Darstellung darunter)

3.6. *Dll1^{lacZ}* Mutanten zeigen Veränderungen in der PNS Entwicklung

3.6.1. Verlust bestimmter sensorischer und Überexpression autonomer Vorläuferzellen des PNS in *Dll1^{lacZ}* Mutanten

Das periphere Nervensystem setzt sich aus verschiedenen Derivaten der Neuralleistenzellen zusammen. Zahlreiche Studien lassen vermuten, dass die Ausbildung der verschiedenen PNS-Derivate durch die koordinative Segregation bestimmter multipotenter Neuralleistenzelllinien in verschiedene, in ihrer Potenz eingeschränktere, Subzelllinien erfolgt (s. Einleitung und (Anderson, 1997)). Die intrinsischen Mechanismen, die an der Segregation der einzelnen Neuralleistenzelllinien beteiligt sind, sind weitgehend unerforscht. Diskutiert wird jedoch die Beteiligung der Notch-Signaltransduktion an der Determinierung der Zelllinienschicksale (Anderson *et al.*, 1997). Eine Expressionsanalyse verschiedener Neuralleistenzellmarker des sich entwickelnden PNS in den homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten bot die Möglichkeit, diese Fragestellung näher zu untersuchen.

Die bHLH Gene *ngn1* und *ngn2* werden spezifisch in unterschiedlichen sensorischen Vorläuferzelllinien des PNS exprimiert (**Abb. 3.6-I; 3.8-A,C,E; 4.4-A**) (Greenwood *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Sommer *et al.*, 1996). Die Expression von *ngn2* im PNS E9.5 homozygoter *Dll1^{lacZ}* Embryonen (**Abb. 3.6-J**) zeigte sich ähnlich der wildtyp Expression (**Abb. 3.6-I**). Das bHLH Gen *NeuroD* wird in den *ngn2*-positiven Zellen zeitlich nach *ngn2* in den sich entwi-

ckelnden Dorsalwurzelganglien exprimiert (**Abb. 3.9-A**) (Greenwood *et al.*, 1999; Lee, 1997). Auch die Expression von *NeuroD* war in E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten unverändert (**Abb. 3.9-D**).

Dahingegen war weder in E9.5 noch in E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten eine *ngn1* Expression in den sich entwickelnden Dorsalwurzelganglien zu erkennen (**Abb. 3.8-B,D,F**). Dies ließ auf einen Verlust von *ngn1*-spezifischen sensorischen Vorläuferzellen schließen.

Neben den sensorischen Vorläuferzelllinien finden sich im entwickelnden PNS des Stadiums E9.5 auch verschiedene Vorläuferzelllinien autonomer Nervenzellen. Eines der am frühesten nachweisbaren autonomen PNS-Derivate ist der zukünftige sympathische Grenzstrang. Dieser entwickelt sich bilateral entlang der dorsalen Aorta. Der bHLH Transkriptionsfaktor *Mash-1* wird in diesen Zellen exprimiert (**Abb. 3.8-G,H**). Im mutanten E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo erschien die *Mash-1* im zukünftigen sympathischen Grenzstrang dahingegen verstärkt (**Abb. 3.8-I**). Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass die *Mash-1* Expressionsdomäne lateral der dorsalen Aorta deutlich vergrößerte war (**Abb. 3.8-J**). Dies ließ vermuten, dass in *Dll1^{lacZ}* Mutanten mehr Zellen den sympathischen Grenzstrang aufbauen.

Die Homeodomänen beinhaltenden Transkriptionsfaktoren *Phox2a* und *Phox2b* werden ebenfalls spezifisch in Vorläuferzellen autonomer, motorischer Nerven des PNS exprimiert (Pattyn *et al.*, 1997). In E9.5 wildtyp Embryonen findet sich die *Phox2b* Expression in allen motorischen Anteilen der **cranialen** Ganglien, sowie im sich entwickelnden *Vagus* Nerv (**Abb. 3.8-K**). *Phox2a* wird in den gleichen Zellen koexprimiert, wobei die Expression von *Phox2a* der *Phox2b* Expression vorangeht. Die Expression von *Phox2a* ist daher ebenfalls in den motorischen Anteilen der cranialen Ganglien zu finden. Die *Phox2a* Domänen sind zum gleichen Entwicklungsstadium jedoch kleiner als die *Phox2b* Expressionsdomänen (**Abb. 3.8-M**). Homozygote *Dll1^{lacZ}* Mutanten zeigten eine deutliche Überexpression beider *Phox*-Gene in den motorischen Anteilen der cranialen Nerven. Besonders auffällig war außerdem eine ektopische Expressionsdomäne innerhalb des ersten Rhombomers (**Abb. 3.8-L,N**).

Eine Zählung von Neuralleistenzellen lateral des Neuralrohres in E9.5 Embryonen über die gesamte Länge eines Segmentes (Intersomit-Somit-Intersomit) zeigte, dass das prozentuale Verhältnis „großer“ zu „kleiner“ migrierender Neuralleistenzellen in den E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen zu Gunsten der „kleinen“ Neuralleistenzellen verschoben war (**Tab. 2**). Dieser Befund ist bislang allerdings noch nicht statistisch untermauert. Er unterstützt jedoch die molekularbiologischen Expressionsdaten, die auf eine Verschiebung des Zellschicksals innerhalb der Neuralleistenzellpopulationen hindeuten.

Zusammengefasst deutet der Verlust bestimmter Expressionsmarker sensorischer Vorläuferzellen und die gleichzeitig auffallende Überexpression autonomer Vorläuferzellmarker im

PNS der *Dll1^{lacZ}* Mutanten auf eine Beteiligung von *Dll1* an der Segregation der Neuralleistenzelllinien.

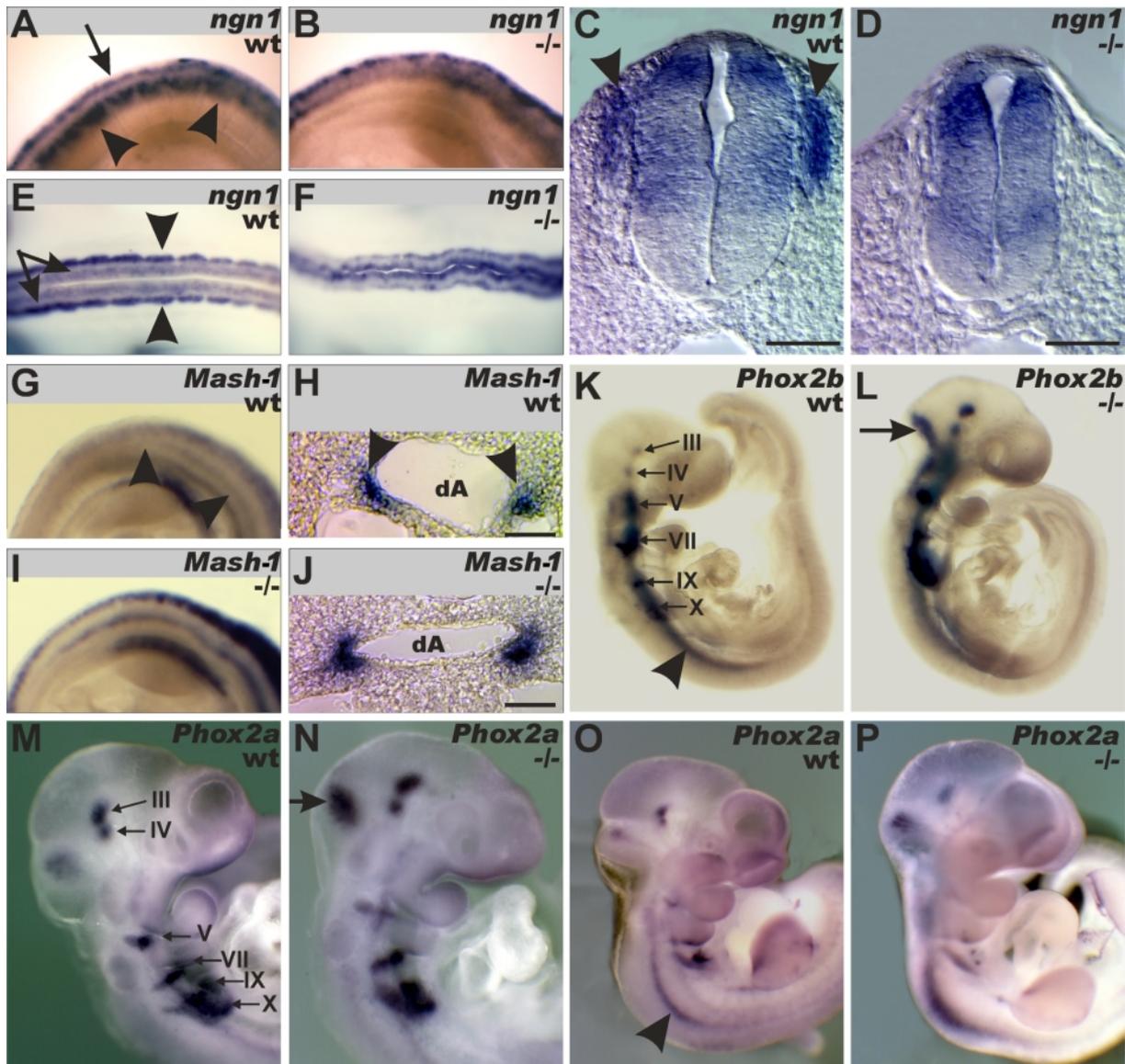


Abbildung 3.8: Verlust von *ngn1* exprimierenden sensorischen PNS-Vorläuferzellen und Überexpression motorischer PNS Marker in *Dll1^{lacZ}* Mutanten

„Whole mount“ RNA *in situ* Hybridisierung von E9.5 (A,B,G,I,K-N) und E10.5 (E,F,O,P) Embryonen, sowie 35µm Cryotomschnitte von E9.5 (C,D,H,J) Embryonen nach „Whole mount“ RNA *in situ* Hybridisierung. (A-F) *ngn1* Expression: (A,B) Laterale Ansicht des Rumpfes: (A) Im WT wird *ngn1* im Neuralrohr (Pfeil), sowie in Vorläuferzellen sensorischer Nerven der Dorsalwurzelganglien (Pfeilspitzen) exprimiert. (B) Im *Dll1^{lacZ}* Embryo scheint *ngn1* herabreguliert. (C,D) Querschnitte durch Neuralrohre im Rumpfbereich: (C) Der Querschnitt durch das WT Neuralrohr zeigt die *ngn1* Expression im Neuralrohr und in migrierenden Neuralleistenzellen (Pfeilspitzen). (D) Im *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr scheint die Expression von *ngn1* unverändert, während eine Expression in den Neuralleistenzellen nicht nachweisbar ist. (E,F) Dorsale Aufsicht auf den Rumpf: (E) Im WT wird *ngn1* ebenfalls im Neuralrohr (Pfeile) und in den sich entwickelnden Dorsalwurzelganglien exprimiert. (F) Der *Dll1^{lacZ}* Embryo zeigt jedoch keine Expression von *ngn1* in den sich entwickelnden Dorsalwurzelganglien. (G-J) *Mash1*

Expression: (G) Im WT wird *Mash1* im PNS von Vorläuferzellen des sympathischen Grenzstranges (Pfeilspitzen) exprimiert. (H) Der Querschnitt durch den WT Rumpf zeigt, dass diese Zellen **lateral** der dorsalen Aorta (dA) liegen (Pfeilspitzen). (I) Im sich entwickelnden *Dll1^{lacZ}* PNS wird *Mash1* überexprimiert. (J) Der Querschnitt durch den *Dll1^{lacZ}* Rumpf zeigt, dass die *Mash1* Expressionsdomänen lateral der dA vergrößert sind. (K,L) *Phox2b* Expression: (K) Im WT wird *Phox2b* in den motorischen Anteilen der sich entwickelnden cranialen Ganglien (gekennzeichnet mit römischen Ziffern), sowie in autonomen Nerven des PNS exprimiert. Deutlich sichtbar ist auch eine Expression im sich entwickelnden *Vagus*-Nerv (Pfeilspitze). (L) Im *Dll1^{lacZ}* Embryo ist *Phox2b* in allen **cranialen** Ganglien überexprimiert, auffällig ist eine ektopische Expression im 1. Rhombomer des Rhombenzephalons (Pfeil). (M-P) *Phox2a* Expression (craniale Ansicht): (M) *Phox2a* wird im WT wie *Phox2b* in den motorischen Anteilen der cranialen Ganglien exprimiert. (N) Im *Dll1^{lacZ}* Embryo des vergleichbaren Stadiums wird *Phox2a* überexprimiert, wobei ebenfalls eine ektopische Expressionsdomäne im 1. Rhombomer auffällt (Pfeil). (O) Im E10.5 WT Embryo wird *Phox2a* deutlich im *Vagus*-Nerv exprimiert (Pfeilspitze). (P) Im *Dll1^{lacZ}* Embryo vergleichbaren Stadiums ist eine Überexpression von *Phox2a* im *Vagus*-Nerv zu erkennen. (Hirnnerven nummeriert: III: Oculomotoris; IV: Trochlearis, V: Trigeminus, VII: Facialis; IX: Glossopharyngialis; X: Vagus) (Vergrößerungen: (A,B, E ,F) = 63x; (G,I, M-P) = 50x; (K,L) = 40x , — = 50 µm (C,D,H,J))

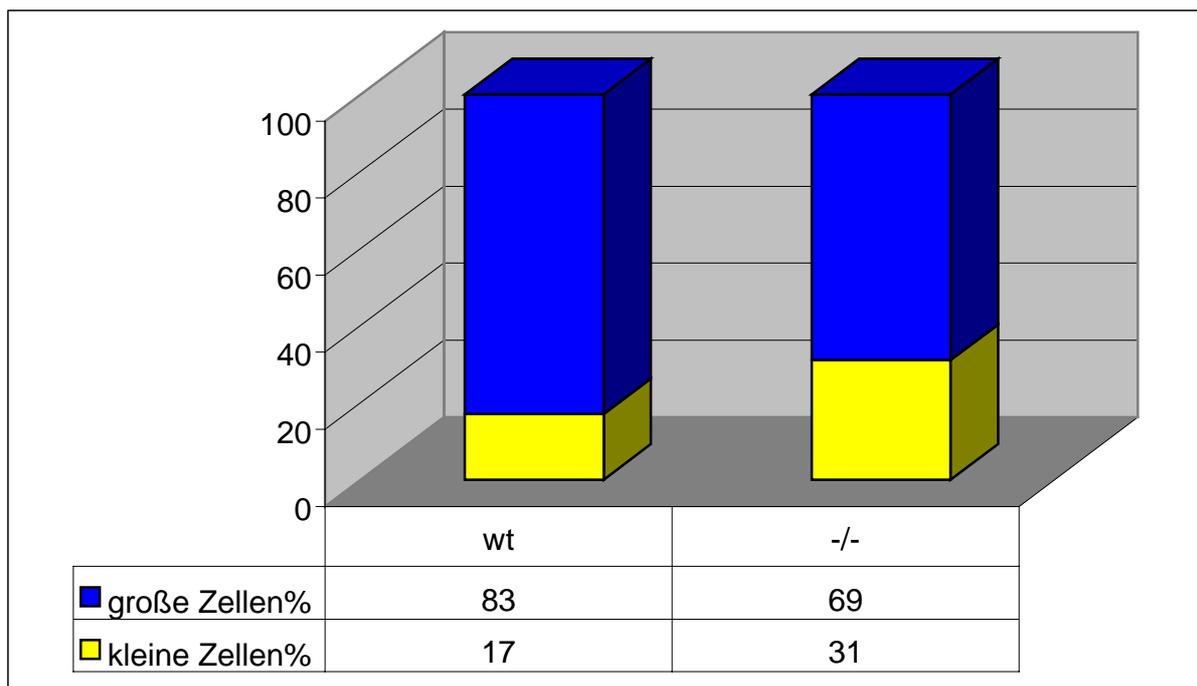


Tabelle 2: Verändertes Verhältnis von „großen“ zu „kleinen“ migrierenden Neuralleistenzellen im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo. Ausgezählt wurden migrierende Neuralleistenzellen entlang eines Segmentes (ca. 100µm) in Abständen von jeweils 10µm. Die Neuralleistenzellen wurden an Hand ihrer Morphologie in „kleine“ und „große“ Vorläuferzellen gruppiert. Innerhalb des ausgezählten WT Segmentes waren 17% der Gesamtzellen „kleine“ und respektive 83% „große“ Zellen. Im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Segment waren verhältnismäßig mehr „kleine“ migrierende Neuralleistenzellen vorhanden. Dabei waren 31% der Gesamtzellen „kleine“ Zellen und 69% „große“ Zellen (Daten freundlicherweise überlassen von Dr. U. Heinzmann).

3.6.2. Verlust von spät migrierenden Neuralleistenzellen und deren Derivate in *Dll1^{lacZ}* Mutanten

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ausbildung der PNS Derivate abhängig von Raum und Zeit ist. Die einzelnen Vorläuferzellpopulationen wandern dabei zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Neuralleisten-Stammzellenpool aus, der sich zwischen dem epidermalen Ektoderm und dem dorsalen Neuralrohr befindet (Henion and Weston, 1997). Die Erhaltung des Neuralleisten-Stammzellenpools ist essentiell für die korrekte Entwicklung der PNS-Derivate. Wichtig für die Aufrechterhaltung der Neuralleistenstammzellen sind dabei *Wnt*-Signale aus der *Roofplate* (Ikeya *et al.*, 1997). Da die Expression von *Wnt1* und *Wnt3a* in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten verändert war, stellte sich die Frage, ob dies auch Auswirkungen auf die PNS-Entwicklung haben würde. Aus diesem Grund wurde die Expression verschiedener PNS-Marker in verschiedenen Stadien der Entwicklung von *Dll1^{lacZ}* Mutanten verfolgt.

Die Expression von *NeuroD* verläuft in einer a/p-abhängigen Weise. Frühe migrierende Neuralleistenzellen, Vorläuferzellen sensorischer Nerven, kommen dabei lateral des Neuralrohres zu liegen und beginnen *NeuroD* zu exprimieren (**Abb. 3.9-A**) (Ma *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, erscheint die *NeuroD* Expression in E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen unverändert (**Abb. 3.9-D**). In E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten konnte ebenfalls kein Unterschied in der d/v-Ausdehnung der *NeuroD* Expressionsdomäne gefunden werden (**Abb. 3.9-E**). Der einzige Unterschied der auffiel, war eine unregelmäßige Expression entlang der a/p-Achse, was möglicherweise auf den Verlust der a/p-Polarisierung der Somiten zurückzuführen ist (**Abb. 3.9-F**).

Gegensätzlich dazu verhielt sich die Expression von *Sox10* in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten. *Sox10* ist ein Sry-verwandter Transkriptionsfaktor, der unter anderem in Glia-Vorläuferzellen des PNS exprimiert wird (Kuhlbrodt *et al.*, 1998). Die Glia-Vorläuferzellen wandern zeitlich nach den Vorläuferzellen sensorischer Nerven aus dem Neuralleisten-Stammzellenpool aus. Im E9.5 wildtyp Rumpf befinden sich die *Sox10* exprimierenden Zellen oberhalb des *Sulcus limitans* zu beiden Seiten des Neuralrohres (**Abb. 3.9-J**). Im Laufe der weiteren Entwicklung wandern die *Sox10* exprimierenden Zellen nach ventral, wobei ständig neue *Sox10* positive Zellen aus dem Stammzellpool nachwandern. In E10.5 Embryonen befinden sich die *Sox10* exprimierenden Zellen entlang der dorsalen und ventralen Wurzel der sich entwickelnden Dorsalwurzelganglien, sowie entlang der auswachsenden spinalen Nerven (**Abb.3.9-H,I**). Dabei ist zu vermerken, dass die dorsale (proximale) *Sox10* Expressionsdomäne von den zeitlich später

auswandernden Glia-Vorläuferzellen ausgebildet wird, während die ventrale (**distale**) Expressionsdomäne den zeitlich früher ausgewanderten Glia-Vorläuferzellen entspricht.

Im E9.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryo glich die *Sox10* Expression der des Wildtypes. Die Mehrheit der *Sox10* exprimierenden Zellen befand sich ebenfalls oberhalb des *Sulcus limitans* (**Abb. 3.9-J**). Zum Stadium E10.5 erschien die *Sox10* Expression in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten deutlich reduziert. Vor allem die **proximalen** Expressionsdomänen waren vermindert (**Abb.3.9-K**). Einzig die ventrale Expressionsdomäne erschien unverändert, war aber entlang des gesamten Rumpfes zu einem Band fusioniert (**Abb. 3.9-K,L**). Letzteres ist möglicherweise auf den Verlust der a/p-Polarisierung der Somiten in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten zurückzuführen. Auffällig war zudem, dass im Rumpfbereich der E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten keine Expression von *Sox10* entlang der spinalen Nerven erkennbar war (**Abb. 3.9-K,L**). Diese Befunde ließen vermuten, dass sich in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen der Neuralleisten-Stammzellpool erschöpfte und somit einen Verlust von spät auswandernden Neuralleistenzellen mit sich brachte.

Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Betrachtung weiterer neuronaler Expressionsmarker des sich entwickelnden PNS. *Islet-1* wird neben seiner Expression in den frühen Motoneuronen des ZNS auch in Vorläuferzellen der Dorsalwurzelganglien in E10.5 wildtyp Embryonen exprimiert (**Abb. 3.9-M**). In den E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten war die *Islet-1* Expression deutlich dorsal reduziert, wobei die verbliebenen ventralen Anteile der Dorsalwurzelganglien fusioniert erschienen (**Abb. 3.9-N**). Ein ähnliches Bild zeigte die Expression des panneuralen Markers Neurofilament in E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten. Die **proximalen** Wurzeln der **cranialen** Nerven, sowie die proximalen Anteile der Dorsalwurzelganglien erschienen in homozygoten *Dll1^{lacZ}* reduziert (**Abb. 3.9-P,R**). Neben den verbliebenen, fusionierten ventralen Resten der Dorsalwurzelganglien, zeigte die Neurofilament Expression, dass im Rumpfbereich der *Dll1^{lacZ}* Mutanten das Auswachsen der spinalen Nerven gestört war (**Abb. 3.9-R**).

Die auftretende Reduktion dorsaler PNS Strukturen in E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten ähnelt, wenn auch in ihrer Stärke abgeschwächt, dem PNS-Phänotyp der *Wnt1/Wnt3a* Doppelmutanten. Diese weisen sehr starke Reduktionen aller proximaler PNS-Strukturen auf (Ikeya *et al.*, 1997). Es scheint daher möglich, dass die Reduktion der *Wnt*-Expression in der *Roofplate* der *Dll1^{lacZ}* Mutanten am späten PNS-Phänotyp der *Dll1^{lacZ}* Mutanten beteiligt ist.

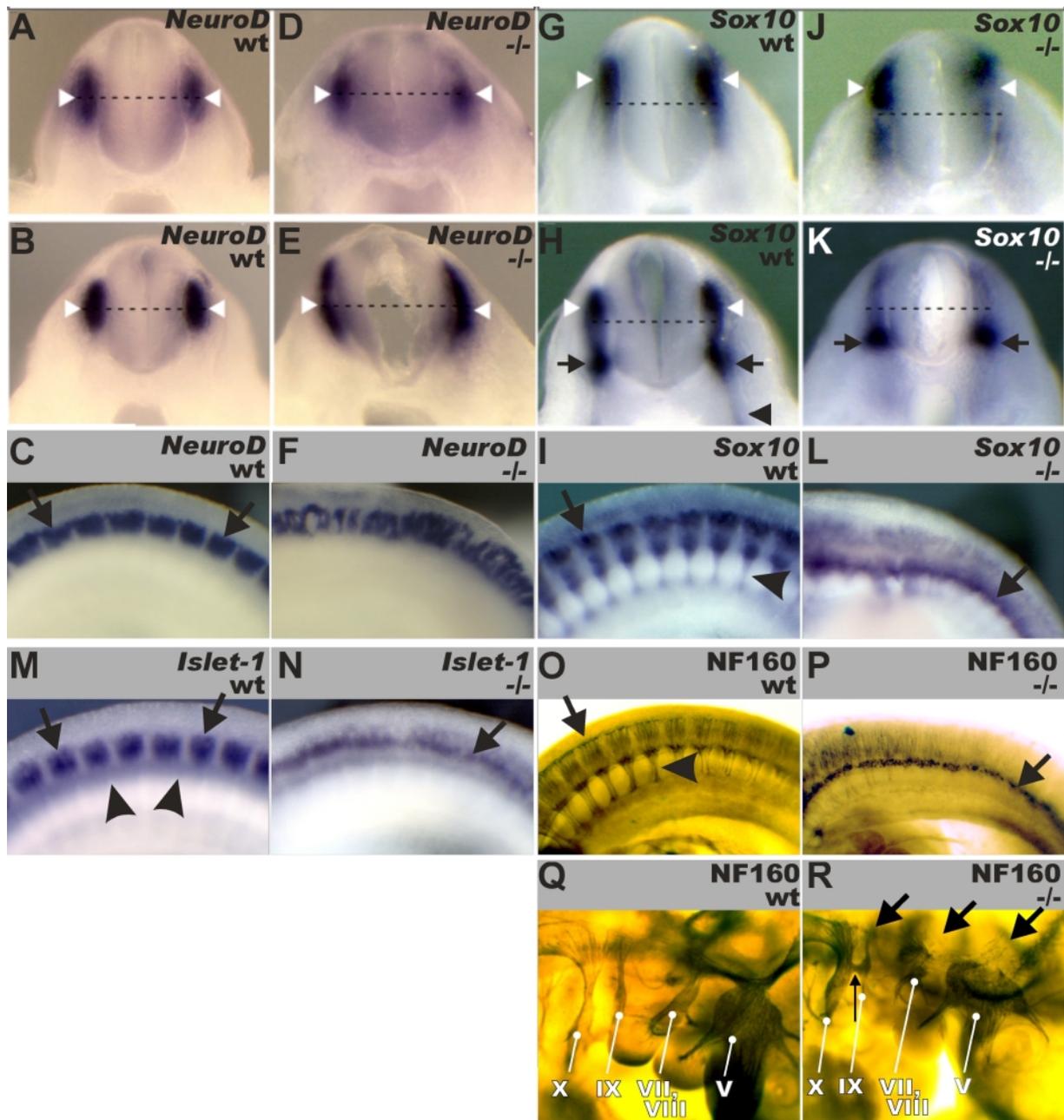


Abbildung 3.9: Unveränderte Expression von *NeuroD* und Verlust proximaler PNS Strukturen auf Grund der Reduktion spät auswandernder Neuralleistenzellen

„Whole mount“ RNA *in situ* Hybridisierungen von E9.5 (A,D,G,J) und E10.5 (B,C,E,F,H,K-N) Embryonen.

„Whole mount“ Immunocytochemie von E10.5 Embryonen (O-R). Ansichten: Neuralrohrquerschnitte (A,B,D,E,G,H,J,L); laterale Rumpfansicht (C,F,I,L-P), laterale Kopfansicht (Q,R).

(A-F) *NeuroD* Expression: (A) Im E9.5 WT befinden sich die *NeuroD* exprimierenden Zellen lateral des Neuralrohrs (Pfeilspitzen) auf Höhe der medialen Achse des Neuralrohrs (*Sulcus limitans* (Sl): ---- Linie). (B) Die *NeuroD* Expression im E10.5 WT ist vergleichbar der E9.5 WT Expression. (C) In der lateralen Ansicht wird die segmentierte Expression von *NeuroD* in den sich entwickelnden Dorsalwurzelganglien (DWG) (Pfeile) deutlich. (D) Im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo scheint die *NeuroD* Expression unverändert, die Zellen liegen lateral des Neuralrohrs auf Höhe des Sl. (E) Gleichermäßen scheint die *NeuroD* Expression im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo unverändert. (F) Die laterale Ansicht lässt eine desorganisierte a/p-Segmentierung der sich entwickelnden DWG in den *Dll1^{lacZ}* Embryonen erkennen. Die d/v-Ausdehnung der *NeuroD* Expressionsdomäne scheint jedoch entlang der

a/p-Achse nahezu unverändert. (G-L) *Sox10* Expression: (G) Im E9.5 WT befinden sich die *Sox10* exprimierenden Zellen (Pfeilspitzen) dorsal des *Sl*. (H) Im E10.5 Embryo ist die *Sox10* deutlich nach ventral ausgedehnt. Zu sehen sind die dorsale (weiße Pfeilspitze) und die ventrale (Pfeil) Wurzel der entwickelnden DWG, sowie die auswachsenden spinalen Nerven (schwarze Pfeilspitze). (I) In der lateralen Ansicht ist die Segmentierung der DWG (Pfeil), mit spinalen Nerven (Pfeilspitze) zu erkennen. (J) Die *Sox10* Expression im E9.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo ist vergleichbar der WT Expression. Die *Sox10* exprimierenden Zellen befinden sich hauptsächlich dorsal des *Sl*, zum Teil finden sich jedoch mehr Zellen ventral des *Sl* (vgl. linke Expressionsdomäne). (K) Im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo ist die *Sox10* Expression im dorsalen Bereich reduziert. Eine deutliche *Sox10* Expression ist nur in der ventralen Wurzel der sich entwickelnden DWG (Pfeile) zu sehen. Eine Expression entlang der spinalen Nerven ist ebenfalls nicht erkennbar. (L) Die laterale Ansicht verdeutlicht die Reduktion der dorsalen DWG-Strukturen, sowie das Fehlen der spinalen Nerven. Klar erkennbar ist die Fusion der verbleibenden ventralen Strukturen (Pfeil). (M,N) *Islet-1* Expression: (M) Im E10.5 WT wird *Islet-1* von Zellen innerhalb der sich entwickelnden DWG (Pfeile) und im ventralen Neuralrohr (Pfeilspitzen) exprimiert. (N) Im vergleichbaren *Dll1^{lacZ}* Embryo zeigt sich ein fusioniertes Expressionsband (Pfeil) von *Islet-1*, dessen dorsale Ausdehnung reduziert ist. (O-R) Neurofilament (NF160) Expression: (O) Im E10.5 WT wird NF-160 in den differenzierten Nerven des PNS exprimiert. Zu erkennen sind die DWG (Pfeil) und die spinalen Nerven (Pfeilspitze). (P) Der E10.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo zeigt eine Verringerung der NF160 Expression in den dorsalen DWG Anteilen. Die verbleibenden ventralen Strukturen sind verkleinert und fusioniert (Pfeil). Entlang des Rumpfes sind im E10.5 *Dll1^{lacZ}* Embryo keine spinalen Nerven erkennbar. (Q) Laterale Aufsicht auf die cranialen Ganglien V, VII/VIII, IX und X im WT. (R) Im *Dll1^{lacZ}* Embryo sind die proximalen Strukturen der cranialen Ganglien reduziert (Pfeile), während die distalen Strukturen unverändert erscheinen. Auffällig ist eine Fusion des IX. und X. Hirnnerves (Dünnere Pfeil). (Hirnnerven nummeriert: V: Trigemini, VII: Facialis; VIII: Cochlearis/Vestibularis; IX: Glossopharyngialis; X: Vagus)

(Vergrößerungen: (A, B, D, E, G, H, I, J, K, Q, R) = 80x; (C, F, I, L-P) = 63x)

**Die Wege der Natur zu erkennen und zu verstehen,
wie sie mit den Abläufen im Menschen in Verbindung stehen,
ist das Ziel**

Zhuang Zi ca. 400 v. Chr.

4. Diskussion

4.1. Verfrühte Zelldifferenzierung führt zur Instabilität des Neuroektoderms

Die Zellen des Neuroektoderms sind Ursprung für alle neuronalen Zelltypen. Während der Neurulation teilen sich die neuronalen Stammzellen im Neuralrohr ohne sich zu differenzieren (Kalyani *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 1997; Temple and Qian, 1996). Nach einer gewissen Zeit setzt dann die Neurogenese ein und die neuronalen Stammzellen beginnen sich in neuronale und gliale Zellen zu differenzieren. Morphologisch kommen die differenzierten nicht mehr proliferierenden Zellen entlang der Basalmembran, in der sogenannten Mantelzone zu liegen (**Abb. 4.1-A**).

Die mechanische Stabilität des Neuroepithels wird in der frühen Phase der Entwicklung durch die neuronalen Stammzellen gewährleistet. Die Stammzellen sind dabei palisadenförmig zwischen der Basal- und Apikalmembran des ZNS angeordnet und erfüllen dadurch eine stützende Funktion. Im entwickelten Neuralrohr wird die Stützfunktion des Neuroektoderms unter anderem durch die Astroglia und Oligodendroglia übernommen.

Der Verlust von *Dll1* führt zu einer übermäßigen Produktion von Neuroblasten und dem gleichzeitigen Verlust von neuronalen Stammzellen. Da durch den Verlust an neuronalen Stammzellen auch deren Stützfunktion im Neuroepithel verloren geht, könnte die Reduktion der selben die Struktur des Neuroepithels destabilisieren. Dies könnte die Ursache für die auftretenden Risse im homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neuroepithel sein (**Abb. 3.1-D,E**).

Darüber hinaus haben Untersuchungen gezeigt, dass die DSL und die LAG Proteine viele Eigenschaften von Adhäsionsproteinen aufweisen und an homotypischen Zelladhäsionen beteiligt sind (de Celis *et al.*, 1993; Fehon *et al.*, 1990; Greenspan, 1990; Rebay *et al.*, 1991).

Das Neuroepithel der *Dll1^{lacZ}* Mutanten erscheint vergleichsweise ungeordnet und weniger dicht gepackt als das wildtyp Neuroepithel. Die Zell-Zell-Interaktion zwischen Notch1 und Dll1 könnte, abgesehen von ihrer Funktion in der Zelldetermination, also auch zur mechanischen Stabilität des Neuroepithels beitragen und damit eine Rolle vergleichbar zu denen der Zelladhäsionsmoleküle übernehmen.

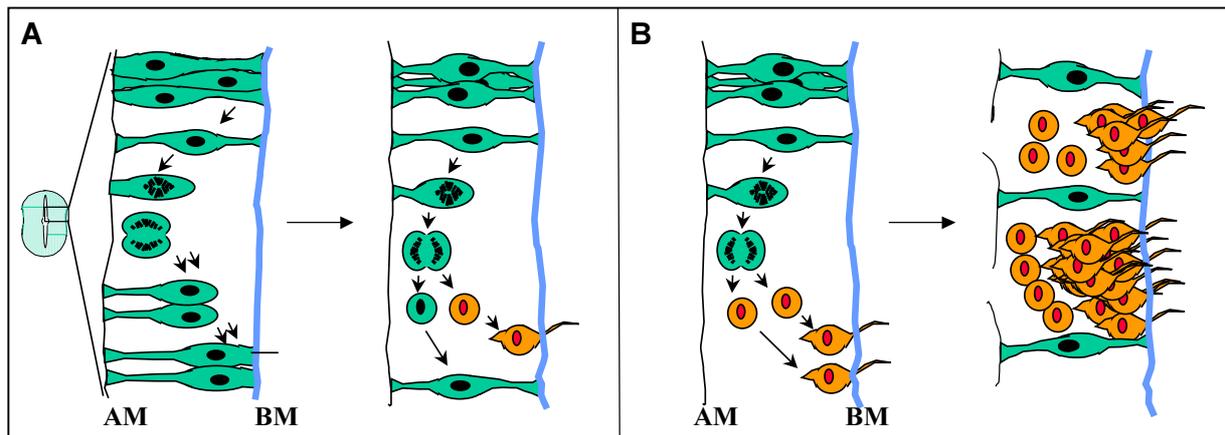


Abb. 4.1: Überproduktion von neuronalen Vorläufern führt zur Instabilität des *Dll1^{lacZ}* Neuroepithels

(A) Neuronale Proliferation und neuronale Differenzierung im Wildtyp ZNS: (linke Bildhälfte): Auf Grund des Schlusses der Neuralplatte zum Neuralrohr befindet sich die Basalmembran (BM) an der Außenseite des Neuralrohres, während die Apikalmembran (AM) das Neuralrohr zum Zentralkanal hin begrenzt. Das Neuroepithel ist anfänglich einschichtig. Die Zellen sind palisadenförmig angeordnet und mit je einem Zellfortsatz an den beiden begrenzenden Membranen befestigt. Die Zellteilung der neuronalen Stammzellen (grün) findet immer an der Apikalmembran statt. Dabei wandert der S-Phasenkern zur Apikalmembran, gleichzeitig rundet sich die Zelle ab in dem sie ihren Zellfortsatz von der Basalmembran ablöst. Im frühen Neuroepithel findet eine symmetrische Zellteilung statt, d.h. aus der mitotischen neuronalen Stammzelle gehen zwei gleichwertige Stammzellen hervor, deren Zellfortsätze sich wieder mit der Basalmembran verbinden. (rechte Bildhälfte): Die differenzierenden Neuroblasten entstehen im weiteren Verlauf der Entwicklung aus einer asymmetrischen Zellteilung der mitotischen neuronalen Stammzellen. Der Spindelapparat ist dabei im Gegensatz zur symmetrischen Zellteilung der Stammzellen nicht **medial**, sondern radial zur Apikalmembran ausgerichtet. Aus dieser kritischen Mitose gehen letztendlich ein Neuroblast (orange) und eine neuronale Stammzelle (grün) hervor. Der Neuroblast wandert zur Basalmembran und differenziert dort zum Neuron. Erst später in der Entwicklung differenzieren die Gliazellen aus den verbleibenden neuronalen Stammzellen und das Neuroektoderm verliert seinen epithelialen Charakter. Die Gliazellen übernehmen schließlich im ausgebildeten Neuralrohr die Stützfunktion der neuronalen Stammzellen des frühen Neuroepithels.

(B) Modell der gestörten neuronalen Proliferation im ZNS der *Dll1^{lacZ}* Mutanten: (linke Bildhälfte): Das Fehlen der durch Dll1 vermittelten **lateralen** Inhibition führt zum Verlust der asymmetrischen Zellteilung während der neuronalen Differenzierungsphase. Dies führt zu einer übermäßigen Produktion neuronaler Vorläuferzellen verbunden mit dem Verlust neuronaler Stammzellen. Mit der massiven Reduktion der neuronalen Stammzellen geht auch deren Stützfunktion im Neuroepithel verloren. Das Neuroepithel wird destabilisiert und reißt an der Apikalmembran ein.

4.2. Dll1 Funktion ist an der d/v-Suborganisation des Neuralrohres beteiligt

Während der neuralen Induktion wird im Ektoderm vom darunterliegenden Mesoderm in Verbindung mit der Notochorda die Neuralplatte induziert. Untersuchungen am Hühnchen zeigten, dass anfänglich alle neuronalen Vorläuferzellen in der Neuralplatte die Homeobox-Gene *Pax3* und *Pax7* exprimieren. Shh Signale ausgehend von der Notochorda führen jedoch zur Repression dieser Gene im ventralen Neuralrohr und zur Aktivierung von ventralen Genen in einer konzentrationsabhängigen Weise (Ericson *et al.*, 1996; Ericson *et al.*, 1997; Goulding *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1991). *Shh*-knock-out Mutanten zeigen eine Dorsalisierung des Neuralrohres. Dabei bleibt die Expression von *Pax7* im nahezu gesamten Neuralrohr erhalten (Pierani *et al.*, 1999). Diese Befunde deuten auf einen „dorsalen-Grundstatus“ der Neuralplatte, der durch ventrale, von der Notochorda ausgehende Signale inhibiert wird. Das Neuralrohr erhält durch dieses Zusammenspiel eine d/v-Organisation mit einer *Pax3/7* positiven dorsalen und einer durch Shh kontrollierten *Pax3/7* negativen ventralen Hälfte.

Die unveränderte Expression von *Pax3* und *Pax7* im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten lässt darauf schließen, dass Dll1 die generelle d/v-Organisation nicht beeinflusst (**Abb. 3.6**)

Die Untersuchungen dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass es neben der generellen „Pax3/7 vs. Shh“ d/v-Organisation des Neuralrohres, eine Suborganisation des Neuralrohres geben muss. An dieser Suborganisation scheinen Notch-Signaltransduktionsgene beteiligt (**Abb. 4.2**).

Wie gezeigt, werden entlang der d/v-Achse des E9.5 Neuralrohres die Gene *Dll1*, *m-ser-1* und *Notch2* in aneinander grenzenden Domänen exprimiert (**Abb. 3.2-A,I,K**). Der Verlust des *Dll1* Genes führt zur Ausdehnung der angrenzenden *m-ser-1* und *Notch2* Expressionsdomänen. Die Vergrößerung der *Notch2* Expressionsdomäne geht mit einer morphologischen Vergrößerung der *Floorplate* einher. Diese tritt in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten statistisch signifikant auf (**Tab. 1**). Dies lässt vermuten, dass eine Funktion der ventralen Neuralrohrexpression von *Dll1* die Festlegung der Größe der *Floorplate* durch Restriktion der *Notch2* Expressionsdomäne ist.

Zieht man das laterale Spezifizierungsmodell in Betracht (Greenwald and Rubin, 1992; Muskavitch, 1994), so scheint es möglich, dass die Ausdehnung der *Notch2* Expressionsdomäne mit der Zunahme von *Floorplate*-spezifischen Zellen und dem gleichzeitigem Verlust ventraler Neuralrohrzellen verbunden ist. Dll1 könnte also auch hier eine Zelldeterminie-

rungsfunktion haben. Eine ähnliche Funktion scheint in Notch1 Mausmutanten vorzuliegen. Hier führt der Verlust des *Notch1* Genes zur einer Überproduktion proneuraler Zellen in Verbindung mit dem Verlust neuronaler Stammzellen. Gleichzeitig fällt eine Überexpression von *Dll1* auf (de la-Pompa *et al.*, 1997).

Die Ausdehnung der *m-ser-1* Expressionsdomäne könnte dem zu Folge auch eine Veränderung neuronaler Zelltypen im **medialen** Neuralrohr mit sich führen (**siehe unten: Verlust ventraler Interneuronen**).

Da Notch2 einen potentiellen Rezeptor von Dll1 darstellt (Lindsell *et al.*, 1996), könnte die Restriktion der *Notch2* Expressionsdomäne durch direkte Ligand-Rezeptor-Interaktion stattfinden. Bei der Restriktion der *m-ser-1* Expressionsdomäne verhält sich dies möglicherweise anders, da bislang noch keine Interaktionen zwischen den Notch-Liganden berichtet wurden. Die Restriktion der *m-ser-1* Expressionsdomäne wird möglicherweise nicht durch direkte Dll1 Funktion moduliert, sondern könnte dahingegen durch Modulatorproteine der Fringe-Familie erfolgen. Während der *Drosophila* Flügelentwicklung spielt Fringe (*fng*) bei der Limitierung der Notch-Aktivität auf die d/v-Grenze eine wichtige Rolle (Irvine and Wieschaus, 1994). Der eigentliche biochemische Funktionsmechanismus des Fng-Proteins ist bislang unbekannt. Genetische Studien haben jedoch gezeigt, dass *fng* als Modulator der Notch-Signaltransduktion funktioniert. Das *fng* Gen wird normalerweise im dorsalen Kompartiment der Flügelscheibe exprimiert. Dort inhibiert Fng die Notch-Aktivierung durch Ser, während es die Notch-Aktivität, ausgelöst durch Dll, zu verstärken scheint (Fleming *et al.*, 1997; Klein and Arias, 1998b; Panin *et al.*, 1997).

Ähnlichkeiten zur *Drosophila* Flügelentwicklung finden sich in der Vertebraten Extremitätenentwicklung. Mutationen in den *Drosophila* *Ser* bzw. *fng* Homologen *Jagged-2* (*Jag-2*) und *radical Fringe* (*rFng*) führen zu Abnormalitäten in der Extremitätenentwicklung, wie z.B. **Syndactylie** (Jiang *et al.*, 1998a; Laufer *et al.*, 1997; Moran *et al.*, 1999; Rodriguez-Esteban *et al.*, 1997; Sidow *et al.*, 1997).

Während der Somitogenese wird *lunatic Fringe* (*lFng*) im präsomitischen Mesoderm in Streifen exprimiert (Barrantes IB *et al.*, 1999). Mutationsanalysen haben gezeigt, dass die lFng Funktion notwendig für die korrekte Ausbildung der a/p-Suborganisation der Somiten ist (Zhang and Gridley, 1998).

Im Neuralrohr grenzt die dorsale und ventrale Expressionsdomäne von *lFng* die mediale Expression von *m-ser-1* ein (**Abb. 3.2-G**). Die Ausdehnung der *m-ser-1* Expressionsdomäne im mutanten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr könnte, in Anlehnung an die Beobachtungen in *Drosophila* und während der Somitogenese, somit eine Folge der stark reduzierten *lFng* Expression sein.

Die Defekte der *Roofplate* im *Dll1^{lacZ}* mutanten Neuralrohr könnten ebenfalls direkt mit dem Verlust der *Dll1* Expression zusammenhängen. Auffällig in der mutanten *Dll1^{lacZ}* *Roofplate* ist, dass die Defekte mit dem Fortschreiten der Entwicklung zunehmen. Dieser Prozess scheint ähnlich den Vorgängen während der Somitogenese der *Dll1^{lacZ}* Mutanten. Hier wurde gezeigt, dass sich ursprünglich die Somiten in korrekter Weise ausbilden, jedoch im Verlauf der Entwicklung die Somitengrenzen verschwinden. Die Funktion des in den posterioren Hälften der Somiten exprimierten *Dll1* Genes scheint somit notwendig für die Aufrechterhaltung der Somitengrenzen (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997). Im wildtyp Neuralrohr wird die *Roofplate* bilateral von der dorsalen *Dll1* Expression eingegrenzt (**Abb. 3.2-A**). In Anlehnung an die Vorgänge während der Somitogenese liegt der Schluss nahe, dass eine Funktion von Dll1 im dorsalen Neuralrohr die Aufrechterhaltung einer intakten *Roofplate*-Struktur sein könnte.

Dies lässt auf zwei verschiedene Funktionen der ventralen und dorsalen *Dll1* Expressionsdomäne im Bezug auf die beiden Mittellinienstrukturen (*Floorplate*, *Roofplate*) schließen. Einerseits scheint die ventrale Funktion von Dll1 für Bestimmung der *Floorplate*-Größe wichtig, während andererseits die Aufrechterhaltung der intakten *Roofplate* durch die dorsale *Dll1* Expression beeinflusst wird (**Abb. 4.2**). Bereits auf der Ebene der Transkription wird die ventrale und dorsale Dll1 Neuralrohrexpression von verschiedenen cis-regulatorischen Elementen gesteuert (Beckers *et al.*, 2000).

Möglicherweise sind auch unterschiedliche Prozessierungsmechanismen der Transkripte bzw. der translatierten Proteine vorhanden, die zu unterschiedlichen Dll1-Proteinvarianten mit unterschiedlichen Funktionen in der dorsalen bzw. ventralen Expressionsdomäne führen könnten.

In Kulturüberständen von *Drosophila* Zellkulturen wurde eine biologisch aktive lösliche Form des Delta Proteins (DIEC) bestehend aus der gesamten extrazellulären Domäne beschrieben. Diese nimmt *in vitro* Einfluss auf die Notch-Signaltransduktion (Fitzgerald and Greenwald, 1995; Klueg *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 1999; Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997). Einer neueren Studie zur Folge verhindern lösliche Formen des humanen Dll1 Homologs die Differenzierung der **haematopoethischen** Stammzellen (Han *et al.*, 2000). Diese Befunde lassen vermuten, dass *in vivo* die DSL-Proteine auch in einer löslichen Form auftreten und biologische Aktivität besitzen könnten..

Ein cytochemischer Nachweis verschiedener potentieller Dll1 Formen mit Hilfe verschiedener Dll1 spezifischer Antikörper könnte sich hierbei als sehr hilfreich erweisen.

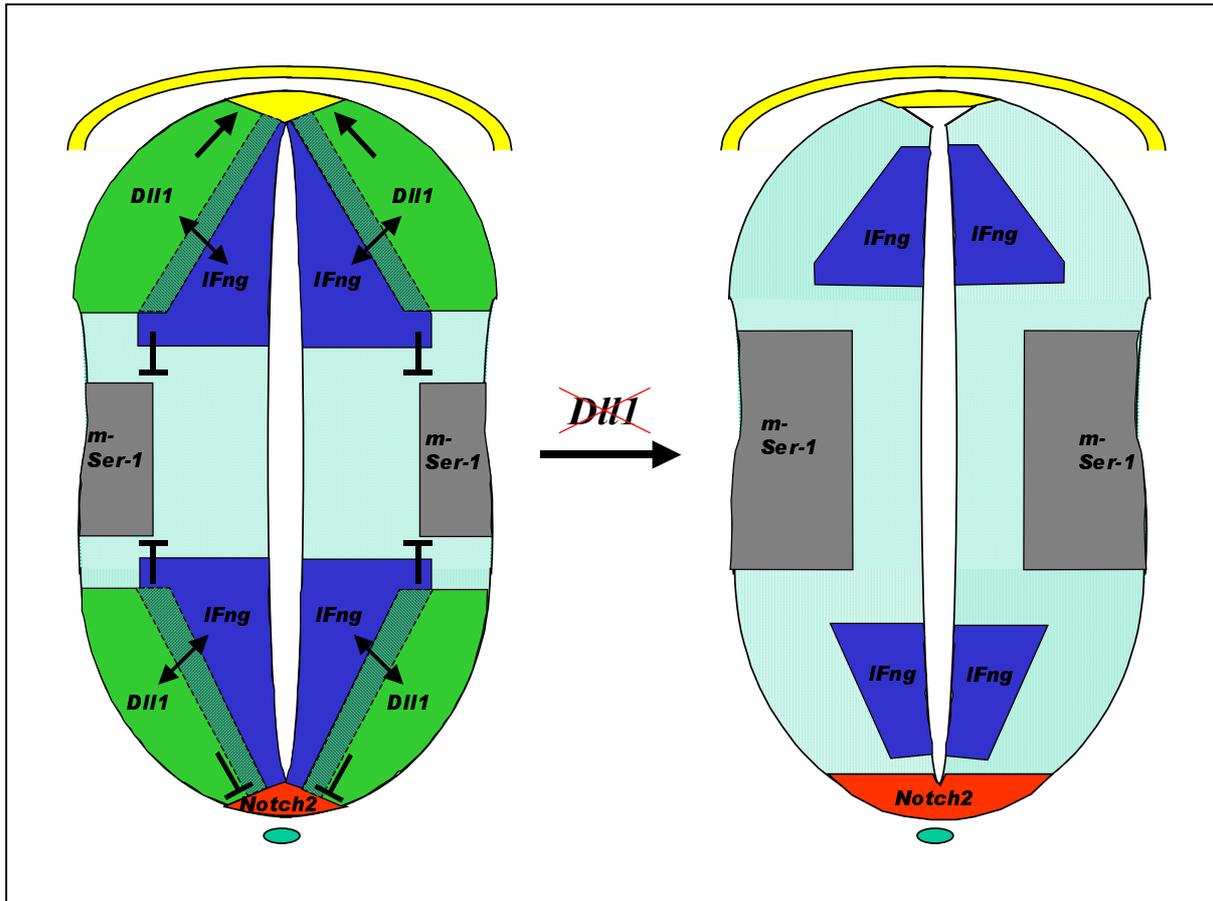


Abb. 4.2: Schemadarstellung der Suborganisation des Neuralrohres durch Notch-Signaltransduktionsgene und deren mögliche Interaktion:

Diese Modell bezieht sich im besonderen auf die potentielle Funktion von *Dll1* im Bezug auf die Suborganisation des Neuralrohres durch die Notch-Signaltransduktionsgene.

linke Bildhälfte: *Dll1*, *IFng*, *m-ser-1* und *Notch2* werden in angrenzenden Domänen entlang der d/v-Achse des Neuralrohres exprimiert und scheinen diese zu spezifizieren. Die ventrale und die dorsale Expressionsdomäne von *Dll1* scheinen unterschiedlichen Einfluss auf die beiden Mittellinienstrukturen des Neuralrohres auszuüben. Im ventralen Neuralrohr scheint *Dll1* die *Notch2* Expressionsdomäne zu restringieren und dadurch die Größe der *Floorplate* zu beeinflussen. Die Restriktion der *Notch2* Expression läuft möglicherweise über eine direkte Interaktion des Liganden *Dll1* mit dem Rezeptor *Notch2*. Im dorsalen Neuralrohr könnte die Expression von *Dll1* dahingegen notwendig für die Aufrechterhaltung einer intakten *Roofplate* notwendig sein.

Die Expression von *IFng* ist beim Verlust von *Dll1* stark reduziert. Da sich die Expressionsdomänen dieser beiden Gene überlappen könnte die Expression von *IFng* durch die *Dll1* Funktion beeinflusst werden.

Bislang wurden noch keine direkten Interaktionen zwischen Notch-Liganden berichtet. Die Eingrenzung der *m-ser-1* Expressionsdomäne könnte indirekt über das Modulatorprotein *IFng* erfolgen, dessen Expressionsdomänen direkt an die mediale *m-ser-1* Expression angrenzen. Es ist jedoch unklar, ob ein möglicher Einfluss von *IFng* auf die *m-ser-1* Expression direkt oder sekundär über kompliziertere Wege erfolgt.

rechte Bildhälfte: Schemadarstellung der veränderten Expression der beschriebenen Gene und Strukturen im Neuralrohr, nach Verlust von *Dll1*.

4.3. Partielle Substitution von *Dll1* durch *Dll3*

Die Expressionsdomänen von *Dll3* überlappen im Neuralrohr mit der *Dll1* Expression. Der Verlust von *Dll1* führt zur Ausdehnung der *Dll3* Expressionsdomänen im ventralen und dorsalen Neuralrohr, sowie dem Auftreten ektopischer *Dll3* Expressionsdomänen im Telenzephalon (**Abb. 3.2-D,E**). Für dieses Phänomen bestehen mehrere Interpretationsmöglichkeiten.

Zum einen könnte *Dll1* direkt an der Regulation der *Dll3* Expression beteiligt sein, in dem es die zeitliche und räumliche Expression von *Dll3* durch Repression beeinflusst. Dafür sprechen die auftretenden ektopischen Expressionsdomänen im Vorderhirn der *Dll1^{lacZ}* Mutanten.

Zum anderen gilt *Dll3* als Marker früh differenzierter Neuronen (Dunwoodie *et al.*, 1997). Dunwoodie *et al.*, zeigten auch, dass *Dll3* und *Dll1* nicht in den selben Zellen exprimiert werden. Sie gehen davon aus, dass die *Dll1* Expression der von *Dll3* in den gleichen Zellen vorangeht. Damit würden die *Dll3* exprimierenden Zellen im ZNS einen fortgeschritteneren Differenzierungsstatus als die *Dll1* exprimierenden Zellen darstellen. Trifft dieses Modell zu, dann würde das bedeuten, dass der Verlust der durch *Dll1* vermittelten lateralen Inhibition eine Überproduktion von neuronalen Zellen mit sich führt. Diese Interpretation würde sehr gut zu den gängigen Modellen der durch Notch-Signaltransduktion vermittelten Vorgänge während der Neurogenese passen (Chitnis *et al.*, 1995; Henrique *et al.*, 1995).

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit ermittelten Daten lässt jedoch eine dritte komplexere Interpretation zu. Betrachtet man die Expression von *Dll3* in den E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten so stellt man fest, dass sie der wildtyp *Dll1* Expression gleicht (**vgl. Abb. 3.2-A,D und 3.2-B,E**). Interpretiert man die deregulierte Expression von *Dll3* als ein Anzeichen verfrühter Neurogenese, dann müsste die Expression von *Dll3* im weiterentwickelten Wildtyp der Expression in Mutanten jüngeren Stadiums ähnlich sein. Dies trifft jedoch nicht für die ektopische *Dll3* Expressionsdomäne im Telenzephalon der Mutanten zu. Diese ist nicht in ähnlichem Maße in wildtyp Embryonen älteren Stadiums zu finden.

Weiterhin impliziert die These, dass die *Dll1* Expression der *Dll3* Expression in den gleichen Zellen vorangeht, dass womöglich die eigentliche Segregation der proneuralen von den neuronalen Stammzellen einzig über die durch *Dll1* vermittelte laterale Inhibition stattfindet. Trifft dies zu, so sollte eine deutliche Reduktion der *Notch1* exprimierenden Stammzellen auftreten. Dieser Phänotyp wäre kongruent mit dem Phänotyp der *Notch1* Mutanten. In diesen führt der Verlust der durch *Notch1* vermittelten lateralen Inhibition zur deutlichen Überexpression von *Dll1* und proneuralen Zellmarken (de la-Pompa *et al.*, 1997).

In den *Dll1^{lacZ}* Mutanten ist die *Notch1* Expression in den Bereichen der *Dll3* Expression jedoch weitgehend unverändert (**Abb. 2N**). Ebenso auffällig ist, dass die reduzierte *IFng* Expression in diesen Bereichen verhältnismäßig am stärksten ist (**Abb. 3.2-H**).

Zusammenfassend scheint es daher am wahrscheinlichsten, dass der Verlust von *Dll1* partiell durch *Dll3* substituiert werden kann (**Abb. 4.3**).

Die Expression von *Dll1* und *Dll3* in verschiedenen Zellen könnte auch bedeuten, dass es sich prinzipiell nicht um eine zeitliche Trennung der Expression in gleichen Zellen handelt, sondern, dass *Dll1* und *Dll3* in verschiedenen Zelllinien innerhalb des sich entwickelnden ZNS exprimiert werden. In diesem Kontext würde also der Verlust von *Dll1* eine Verschiebung der Zellsegregation in Richtung „*Dll3*-positive“ Zellen bedeuten. Die *Dll1* Funktion könnte also auch für die Segregation bestimmter Zelllinienschicksale im ZNS notwendig sein.

Unterstützt wird diese Vermutung durch *in vitro* Untersuchungen an homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neurosphären. Neurosphären sind *in vitro* Zellkulturen isolierter neuronaler Stammzellen. Diese können mit Zusatz von Wachstumsfaktoren in Suspensionskultur als schwebende kugelartige Zellverbände gezüchtet werden und durch bestimmte Methoden zur Differenzierung in die verschiedenen neuronalen und glialen Zelltypen gebracht werden (Laywell *et al.*, 1999). Differenzierte *Dll1^{lacZ}* mutante Neurosphären zeigen eine überproportionale Anzahl von Neuronen in Verbindung mit einem Verlust von Astrozyten und Oligodendrozyten (persönliche Kommunikation mit Eliane Mohier; Hrabè-de-Angelis *et al.*, 2000 Manuskript in Arbeit). *Dll1* scheint also durchaus an der Spezifizierung bestimmter Zelltypen im ZNS beteiligt.

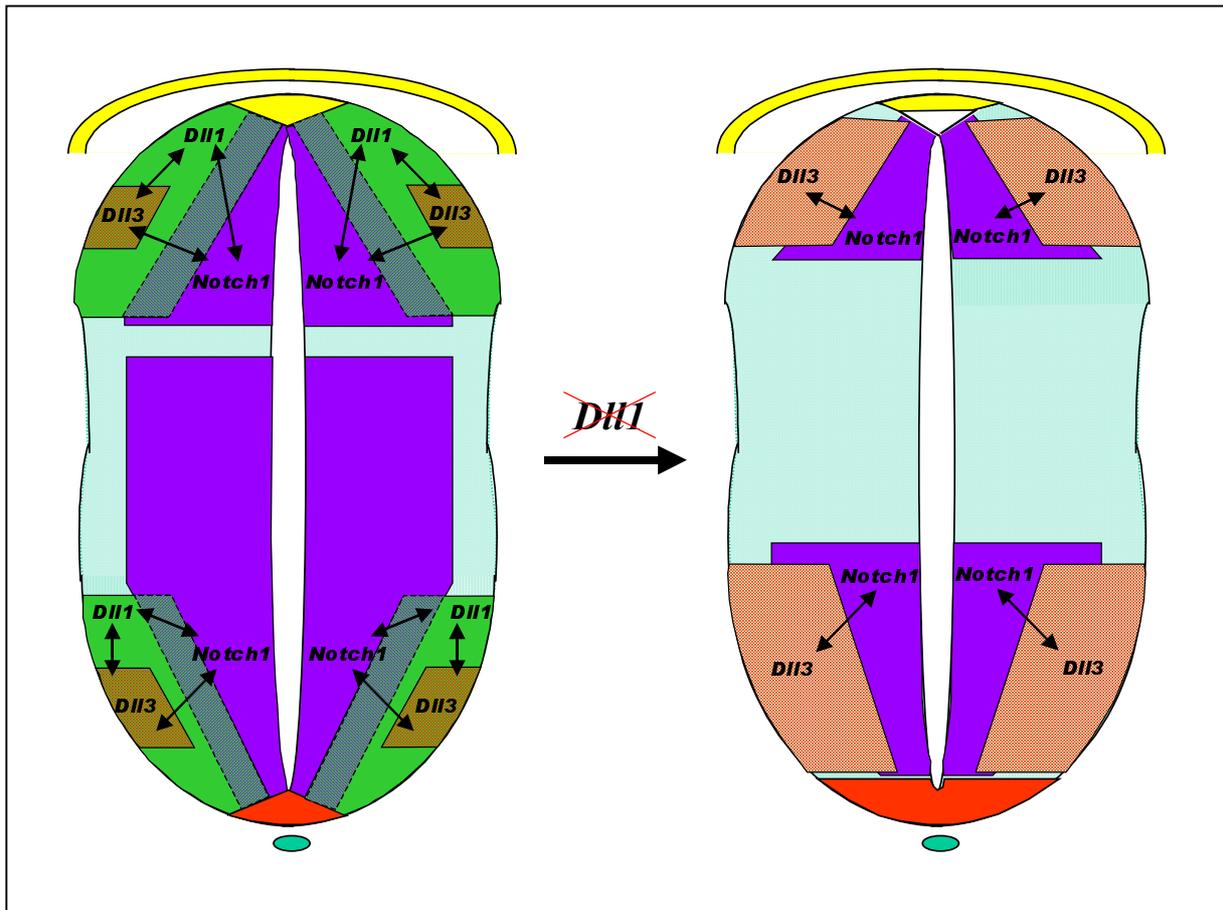


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der möglichen Interaktion von Dll1, Dll3 und Notch1 im Neuralrohr:

linke Bildhälfte: Interaktion findet sowohl zwischen $Dll1 \leftrightarrow Notch1$, als auch zwischen $Dll3 \leftrightarrow Notch1$ und möglicherweise zwischen $Dll1 \leftrightarrow Dll3$ exprimierenden Zellen statt. *Dll1* und *Dll3* werden nicht in den selben Zellen koexprimiert (Dunwoodie *et al.*, 1997). Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass *Dll1* und *Dll3* an der Segregation verschiedener Vorläuferzellen im ZNS beteiligt sind. Zieht man dabei das laterale Inhibitionsmodell zwischen *Dll1* und *Dll3* exprimierenden Zellen in Betracht, so könnte eine Regulation der *Dll3* Expression durch *Dll1* erklärt werden. Beim Verlust von *Dll1* werden dem zur Folge ausschließlich *Dll3*-spezifische Zellen segregiert. Für dieses Modell spricht, dass die *Dll3* Expression in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten der wildtyp *Dll1* Expression gleicht und die *Notch1* Expression in den Domänen der *Dll3* Expression nahezu der wildtyp Expression entspricht. Weitere Unterstützung findet dieses Modell in der Untersuchung der Differenzierung von homozygoten *Dll1^{lacZ}* Neurosphären (siehe Text für genauere Ausführung).

rechte Bildhälfte: Schemadarstellung der veränderten Expression der beschriebenen Gene im Neuralrohr, nach Verlust von *Dll1*.

4.4. *Dll1* und das laterale Inhibitionsmodell

Untersuchungen an *Xenopus* und im Hühnchen haben gezeigt, dass eine Störung der Notch-Signaltransduktion durch die Expression dominant negativer Formen von Delta Homologen zu einem Überschuss an differenzierten Neuronen bei gleichzeitigem Verlust neuronaler Stammzellen führt (Chitnis *et al.*, 1995; Henrique *et al.*, 1995). *Dll1^{lacZ}* Mutanten besitzen einen ähnlichen Phänotyp. In diesen zeigt sich eine deutliche Überexpression der proneuralen Gene *Mash-1* und *ngn2* in bestimmten Regionen des sich entwickelnden ZNS. Die Überexpression der proneuralen Gene geht dabei mit einer deutlichen Reduktion der Expression des *E(spl)*-Homolog *Hes-5* einher. Der neuronale Phänotyp der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten stimmt daher weitgehend mit dem aus *Drosophila* und *C.elegans* bekannten Modell der **lateralen Inhibition** überein (Greenwald and Rubin, 1992; Heitzler and Simpson, 1991; Wilkinson *et al.*, 1994). In Notch1 und RBP-J κ Nullmutanten wurden ähnliche Deregulationen der *Hes-5*, *Mash-1* und *ngn2* Expression beschrieben (de la-Pompa *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen unterstreichen die Interaktion der Dll1 und Notch1 Proteine in der selben Signaltransduktion.

Der präneuronalen Phänotyp der Notch1 und RBP-J κ Nullmutanten ist jedoch viel stärker ausgeprägt als der der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen. So zeigen sie nahezu keine *Hes-5* Expression im Neuralrohr (de la-Pompa *et al.*, 1997), während in *Dll1^{lacZ}* Mutanten eine, wenn auch stark reduzierte Expression von *Hes-5* im Neuralrohr auffindbar ist (**Abb. 3.3-D-F**). Notch1 und RBP-J κ stellen höchstwahrscheinlich zentrale Bestandteile der im ZNS ablaufenden Notch-Signaltransduktionen dar. Dies lässt sich auch aus der viel ausgedehnteren Expressionsdomäne von *Notch1* innerhalb des Neuralrohres schließen. Dll1 hingegen stellt einen von mehreren potentiellen Liganden von Notch1 im Neuralrohr dar. Der Verlust von *Dll1* setzt somit wahrscheinlich nicht die gesamte über Notch1 und RBP-J κ vermittelte Signaltransduktion außer Kraft. Damit könnte die Restexpression von *Hes-5* im Neuralrohr erklärt werden.

4.5. Erhöhte Shh Responsivität im ventralen Neuralrohr

Untersuchungen am Hühnchen haben gezeigt, dass Shh Signale aus der Notochorda und der *Floorplate* notwendig sind für die Differenzierung der neuronalen Zellen im ventralen Neuralrohr (Ericson *et al.*, 1995). Die Konzentration des Morphogens und die Dauer der Exposition gegenüber Shh sind dabei entscheidend welche Identität die Vorläuferzellen im ventralen Neuralrohr annehmen (Ericson *et al.*, 1996; Hynes *et al.*, 1997; Marti *et al.*, 1995; Roelink *et*

al., 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass die zelluläre Antwort auf die extrazelluläre Shh-Signalisierung durch die Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie weitergeleitet und verarbeitet wird (Ruiz-i-Altaba, 1997). Die Art und Weise wie die Segregation zwischen Shh-responsiven und nicht responsiven Vorläuferzellen in bestimmten Regionen des ventralen Neuralrohrs abläuft ist bislang unbekannt.

Die Expression von *Gli1* erscheint in *Dll1^{lacZ}* Mutanten im ventralen Neuralrohr verstärkt und nach dorsal ausgedehnt (**Abb. 3.4-J,K**). Die Ausdehnung der *Gli1* Expressionsdomäne ins dorsale Neuralrohr könnte durch eine Verschiebung des Shh-Konzentrationsgradienten zustande kommen. In den *Dll1^{lacZ}* Mutanten ist durch die vergrößerte *Floorplate* auch die Expressionsdomäne von *Shh* vergrößert. Dies legt die Vermutung nahe, dass in homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen auch mehr Shh-Protein von der vergrößerten *Floorplate* ausgeschüttet wird, was einen veränderten d/v-Konzentrationsgradienten von Shh zur Folge hätte. Dafür spricht auch die Ausdehnung der Expressionsdomäne des Shh-Rezeptors Patched (Ptc) nach dorsal im Neuralrohr homozygoter *Dll1^{lacZ}* Embryonen (nicht gezeigt).

Widersprüchlich dazu ist jedoch die in den E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten unverändert erscheinende *Pax6* Expression im Neuralrohr. Untersuchungen haben gezeigt, dass der von ventral ausgehende Shh-Konzentrationsgradient die Expression von *Pax6* in den neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen im ventralen Neuralrohr negativ beeinflusst (Ericson *et al.*, 1997). Die Überexpression von *Gli1* im *Dll1^{lacZ}* mutanten Neuralrohr deutet zudem auf eine generelle Zunahme an Shh-responsiven, neuronalen Vorläuferzellen im ventralen Neuralrohr hin.

Charakteristisch für den Beginn der Motoneuronendifferenzierung im ventralen Neuralrohr ist die Expression des LIM-Homeoboxgens *Islet-1* (Lundgren *et al.*, 1995; Thor *et al.*, 1999). Die Expressionsdomäne von *Islet-1* im ventralen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten beschränkt sich in E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten nicht nur auf die Mantelzone, sondern ist bis in die subventrikuläre Zone des Neuralrohres ausgedehnt (**Abb. 3.4-N**). Die Überexpression des Motoneuronenmarkers *Islet-1* spricht für eine vorzeitige Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen im ventralen Neuralrohr. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre, dass durch eine Dll1 vermittelte laterale Inhibition die Anzahl der Shh-responsiven Zellen im ventralen Neuralrohr reguliert wird. In diesem Modell würden die Dll1 exprimierenden Zellen verhindern, dass ihre benachbarten Zellen auf Shh-Signale reagieren können, während sie selbst aber responsiv wären und weiter differenzieren könnten. Damit wäre die Möglichkeit für einen zeitlich und räumlich geordneten Ablauf der Zelldifferenzierung geschaffen, wobei stets ein Pool an nicht differenzierenden Stammzellen erhalten bleiben würde.

Untersuchungen am Zebrafisch haben gezeigt, dass der Verlust der lateralen Inhibition während der Neurogenese der Motoneuronen zu einer übermäßigen Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen führt. Das hat zur Folge, dass ein Überschuss an primären Motoneuronen auf Kosten der später differenzierenden sekundären Motoneuronen ausgebildet wird (Appel and Eisen, 1998). Eine verfrühte, übermäßige Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen auf Grund des Verlustes der durch Dll1 vermittelten lateralen Inhibition könnte also zu einer Erschöpfung des neuronalen Vorläuferzellenpools führen. Dadurch wäre auch die letztendlich verminderte Anzahl an *Islet-1* exprimierenden Zellen, sowie der Verlust proliferierender Zellen im ventralen Neuralrohr der E10.5 homozygoten *Dll1^{lacZ}* zu erklären (**Abb. 3.4-P**).

4.6. Verlust ventraler Interneuronen

Für die Differenzierung der medialen Interneuronen im Neuralrohr ist Retinsäure als Morphogen wichtig. Diese wird im Mesoderm synthetisiert und ist in der Lage die Expression von *Dbx2*, einem Marker interneuronenspezifischer Vorläuferzellen, im medialen Neuralrohr zu induzieren (Pierani *et al.*, 1999).

Die Reduktion der Transkription des an der Retinsäuresynthese beteiligten Genes *RALDH-2* in der **caudalen** Körperhälfte der E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten scheint mit den Somitendefekten der homozygoten *Dll1^{lacZ}* zusammenzuhängen. Wie berichtet sind besonders die caudalen Somiten in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten betroffen (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997). Für die Expression von *RALDH-2* scheint die Integrität der Somiten wichtig, da sich bei genauerer Betrachtung eine gewisse a/p-Verteilung des Transkriptes innerhalb derselben zeigt (Daten nicht gezeigt). Ob die Reduktion der *RALDH-2* Expression jedoch direkt mit dem Verlust der Dll1 Funktion zusammenhängt, oder einen Sekundäreffekt darstellt ist bislang noch unklar.

Die vergleichsweise unveränderte Expression von *RALDH-2* in der **anterioren** Körperhälfte der *Dll1^{lacZ}* Mutanten lässt eine unverminderte Retinsäuresignalisierung an das anteriore Neuralrohr vermuten (**Abb. 3.5-D**). Dennoch erscheint die, durch Retinsäure induzierte, Expression von *Dbx2* im homozygoten *Dll1^{lacZ}* Mutanten stark vermindert und ist in den weiterentwickelten E10.5 *Dll1^{lacZ}* mutanten Embryonen nicht mehr vorhanden (**Abb. 3.5-H-L**).

Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Retinsäure induzierte Expression von *Dbx2* im ventralen Neuralrohr durch hohe Shh-Konzentration negativ reguliert wird (Pierani *et al.*, 1999). Die mögliche Verschiebung des Shh-Konzentrationsgradienten in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten, könnte dadurch die verminderte *Dbx2* Expression im medialen Neuralrohr bewirken. Es

könnte sich hier also um einen sekundären Effekt handeln, der durch die vergrößerte *Floorplate* und die damit verbundene mögliche vermehrte Ausschüttung von Shh bedingt wird.

Die Verminderung der *Dbx2* Expression könnte aber auch auf einen Verlust neuronaler Vorläuferzellen im medialen Neuralrohr zurück geführt werden. Für diese Vermutung sprechen die sehr stark reduzierte *Notch1* Expression (**Abb. 3.2-N**) und die Überexpression von *m-ser-1* im medialen Neuralrohr (**Abb. 3.2-J**). Wie bereits erwähnt, beobachtet man in *Notch1* Mutanten einen Verlust neuronaler Vorläuferzellen im Verbindung mit der Überexpression von *Dll1* (de la-Pompa *et al.*, 1997). Dies legt die Vermutung nahe, dass *Dll1* möglicherweise auch am Erhalt der neuroanalen Stammzellpopulation im medialen Neuralrohr beteiligt sein könnte.

Da *Dll1* im E9.5 Neuralrohr scheinbar nicht innerhalb der *m-ser-1* Expressionsdomäne exprimiert wird, bleibt bislang unklar, ob und wie die Dll1-Funktion am Erhalt der medialen Stammzellpopulation beteiligt ist. Neuere *in vitro* Studien haben gezeigt, dass lösliche Formen des homologen humanen Dll1 die Differenzierung der **haematopoethischen** Vorläuferzellen verhindert und somit am Erhalt der Vorläuferzellpopulation beteiligt ist (Han *et al.*, 2000). Demzufolge wäre eine direkte Beeinflussung der medialen Stammzellpopulation über lösliche Dll1 Formen vorstellbar. Die cytochemische Analyse etwaiger verschiedener Proteinformen von Dll1 könnte in diesem Fall mehr Klarheit verschaffen.

Da die Neurogenese im Neuralrohr zeitlich betrachtet von ventral nach dorsal fortschreitet, differenzieren die ventralen Interneuronen im medialen Neuralrohr als erstes aus. Die *En1* exprimierenden V1 Interneuronen sind eine der ersten Interneuronenklassen, die aus *Dbx2* exprimierenden Vorläuferzellen hervorgehen. Die Spezifizierung der *En1* exprimierenden V1 Interneuronen ist dabei ebenfalls von der Retinsäuresignalisierung, sowie vom Shh-Konzentrationsgradienten abhängig (Pierani *et al.*, 1999). Erhöhte Shh-Konzentrationen, sowie die Reduktion der Retinsäuresignalisierung können hierbei die Differenzierung der *En1* positiven V1 Interneuronen stören (Ericson *et al.*, 1997; Pierani *et al.*, 1999). Der Verlust der *En1* exprimierenden V1 Interneuronen bereits im **anterioren** Neuralrohr der E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten (**Abb. 3.5-P**) könnte demnach sekundär durch einen veränderten Shh-Konzentrationsgradienten im ventralen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten bedingt sein.

Die veränderte Suborganisation des mutanten *Dll1^{lacZ}* Neuralrohres könnte jedoch auch ein Grund für den Verlust von *En1* spezifischen V1 Interneuronen darstellen. Die Expressionsdomäne von *En1* scheint im E9.5 wildtyp Neuralrohr dorsal von der *m-ser-1* und der ventral von der *Dll1* Expressionsdomäne eingrenzt zu sein (**vgl. Abb. 3.2-A, 3.2-I, 3.5-N**). Der Ver-

lust *En1* exprimierender Zellen könnte somit möglicherweise auf die Ausdehnung der *m-ser-1* Expressionsdomäne nach Verlust von *Dll1* zurück geführt werden.

4.7. Reduktion von sezernierten *Roofplate*-Faktoren beeinflusst die neuronale Differenzierung im dorsalen *Dll1^{lacZ}* Neuralrohr

Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei *Mash-1* exprimierenden Zellen im ZNS um bedingt teilungsfähige neuronale Vorläuferzellen handelt, die sich in ihrer Kompetenz von den neuronalen Stammzellen unterscheiden (Torii *et al.*, 1999). Die Überexpression von *Mash1* im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten lässt deshalb auf eine vermehrte Produktion weiterentwickelter, bedingt teilungsfähiger, neuronaler Vorläuferzellen schließen.

Wie bereits erwähnt, scheint *Dll1* an der Regulation der Anzahl an responsiven neuronalen Vorläuferzellen beteiligt. Im Gegensatz zum dorsalen Neuralrohr tritt eine Überexpression von *Mash-1* im ventralen Neuralrohr möglicherweise deshalb nicht in Erscheinung, weil die *Mash-1* exprimierenden Zellen auf Grund der *Shh*-Exposition verfrüht terminal zu Motoneuronen differenzieren (**siehe oben**). Dafür spricht auch der Verlust der ventralen *Mash-1* und *Gli1* Expressionsdomäne (**Abb. 3.3-J; 3.4-L; 3.6-H**) sowie die Überexpression des Motoneuronenmarkers *Islet-1* im ventralen Neuralrohr der E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten (**Abb. 3.4-N**).

Obwohl scheinbar mehr responsive *Mash-1* exprimierende Vorläuferzellen im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten ausgebildet werden, scheint die terminale neuronale Differenzierung zum embryonalen Stadium E10.5 gemessen an der β -Tubulin-III Expression unverändert.

Für die Differenzierung der dorsalen Neuronen des Neuralrohres sind, den Vorgängen im ventralen Neuralrohr vergleichbar, Morphogene notwendig. Diese Signale werden hauptsächlich von der *Roofplate* ausgeschüttet (Liem *et al.*, 1997; Liem *et al.*, 1995; Monsoro-Burq *et al.*, 1996). Vor allem *Wnt1*- und *Wnt3a*-Proteine aus der *Roofplate* spielen als Morphogene bei der Differenzierung der dorsalen Neuronen eine wichtige Rolle (Ikeya *et al.*, 1997). Die Reduktion der *Wnt1/Wnt3a* Expression, sowie der *RALDH-2* Expression in der *Roofplate* der homozygoten *Dll1^{lacZ}* Embryonen (**Abb. 3.7; 3.5-D**), lassen auf eine Reduktion der von der *Roofplate* ausgeschütteten Morphogene schließen. Die Reduktion von Morphogenen im dorsalen Neuralrohr der *Dll1^{lacZ}* Mutanten könnte bewirken, dass sich die Mehrzahl der *Mash-1*

exprimierenden Vorläuferzellen nicht terminal ausdifferenzieren und in ihrem bedingt teilungsfähigen Zustand verbleiben.

Dies könnte bedeuten, dass die Notch-Signaltransduktion primär nur an der Segregation prä-neuraler Vorläuferzellen aus den neuronalen Stammzellen beteiligt ist und dagegen die terminale Differenzierung kaum beeinflusst.

4.8. Wnts und Dll1 Interaktion

Die Reduktion der *Roofplate*-Marker, im besonderen die verringerte *Wnt1/Wnt3a* Expression in *Dll1^{lacZ}* Mutanten könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein.

Wie bereits beschrieben, scheint die Funktion von Dll1 im dorsalen Neuralrohr wichtig für die Aufrechterhaltung einer intakten *Roofplate*-Struktur. Die Dll1 Funktion könnte demnach auch sekundär notwendig sein, um die *Wnt1/Wnt3a* exprimierende Zellpopulation in der *Roofplate* aufrechtzuerhalten. Dafür spricht die Abnahme der *Wnt1* Expression im Verlauf der embryonalen Entwicklung der *Dll1^{lacZ}* Mutanten (**Abb. 3.7-H**). Zahlreiche Studien in *Drosophila* deuten jedoch auf ein direktes Zusammenspiel der Notch- mit der Wnt-Signaltransduktion (**siehe Einleitung**).

In der Maus wurde bereits gezeigt, dass die von der *Roofplate* sezernierten *Wnt1* und *Wnt3a* Proteine die *Notch2* Expression beeinflussen können. Der Verlust von *Wnt1/Wnt3a* führt dabei zum Verlust der *Notch2* Expression im Dermomyotom (Ikeya and Takada, 1998). Eine reziproke Regulation der *Wnt* Expression in Abhängigkeit von der Notch-Signaltransduktion wurde bislang nur in *Drosophila* gezeigt (Couso *et al.*, 1995; Neumann and Cohen, 1996). Hier führt der Verlust von Notch im sich entwickelnden Flügel zu einer Reduktion der *wingless* (*wg*) Expression, dem *Drosophila* Homolog der Vertebraten *Wnt*-Gene (Rulifson and Blair, 1995).

Die in dieser Studie beobachtete Reduktion der *Wnt1/Wnt3a* Expression nach Verlust von *Dll1*, legt die Möglichkeit eines Einflusses von Dll1 auf die Expression der *Wnt*-Gene in der *Roofplate* nahe. In Analogie zur Fliege könnte die, durch Dll1 aktivierte, Notch1 Aktivität Einfluss auf die *Wnt1* Expression nehmen. Die beobachtete Restexpression von *Wnt1* in *Dll1^{lacZ}* Mutanten wäre somit mit der vorhandenen Notch1 Restaktivität in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten erklärbar. Die Notch1 Restaktivität scheint jedoch im Verlauf der weiteren embryonalen Entwicklung der *Dll1^{lacZ}* Mutanten abzunehmen, da die Expression des Notch1-Zielgenes *Hes-5* im dorsalen Neuralrohr der E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten nicht mehr nachweisbar ist (**Abb.**

3F). Damit könnte auch die Abnahme der *Wnt1* Expression in der *Roofplate* der *Dll1^{lacZ}* Mutanten im weiteren Verlauf der Entwicklung in Verbindung stehen.

Die bereits in E9.5 homozygoten Embryonen kaum nachweisbare *Roofplate*-Expression von *Wnt3a* deutet jedoch auch auf einen möglichen Notch1 unabhängigen Mechanismus hin. Möglicherweise ist die Dll1 Funktion direkt an der Regulation der Expression der *Wnt3a* Expression beteiligt.

Für die Zukunft wäre eine Expressionsanalyse der Notch-Signaltransduktionsgene im Neuralrohr der *Wnt1/Wnt3a* Doppelmutanten sicherlich hilfreich für ein tieferes Verständnis der Interaktion zwischen beiden Signaltransduktionswege.

4.9. Dll1 Beteiligung an der Segregation sensorischer PNS-Vorläuferzelllinien

Zahlreiche Derivate des ausgewachsenen Vertebratenorganismus, wie zum Beispiel das PNS, haben ihren entwicklungspezifischen Ursprung in den Neuralleistenzellen. Verschiedene Studien zeigen, dass die Neuralleistenzellen eine multipotente Zellpopulation darstellen, deren Differenzierungsschicksal durch Umgebungsfaktoren und Morphogene beeinflusst wird (Baker *et al.*, 1997; Le Douarin *et al.*, 1993). Daneben gibt es auch Untersuchungen die zeigen, dass die Neuralleistenzellpopulation verschiedene Zelllinien beinhaltet oder erzeugt, deren entwicklungspezifisches Schicksal bereits festgelegt ist (Anderson, 1997; Anderson *et al.*, 1997; Henion and Weston, 1997).

Klonale Analysen von Neuralleistenzellen *in vivo* und *in vitro* haben bislang eine Vielzahl an Faktoren identifiziert, die während der PNS Entwicklung spezifisch in sensorischen oder autonomen Vorläuferzelllinien exprimiert werden (Anderson, 1999; Bronner-Fraser and Fraser, 1988). Mutationsanalysen dieser Faktoren lassen verschiedene Modelle der Segregation der sensorischen und autonomen Zellen bzw. Zelllinien während der Entwicklung des PNS zu (Greenwood *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 1999).

Eines dieser Modelle postuliert das Vorhandensein zweier verschiedener Klassen an determinierten Neuralleisten-Vorläuferzelllinien während der Entwicklung der sensorischen und autonomen Zellen des PNS (Greenwood *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999) (**Abb. 4.4-A**). Hierbei scheint die erste Klasse (V_{S1}) ein rein sensorisches Zellschicksal zu besitzen und sich primär zu großen sensorischen Neuronen zu entwickeln. Aus der zweiten Klasse ($V_{S2/A}$) hingegen sollen sich sowohl autonome als auch sensorische PNS-Vorläuferzellen entwickeln können.

Die sensorischen Vorläuferzellen die dabei aus den $V_{S2/A}$ Zellen entstehen, differenzieren letztendlich primär zu kleinen sensorischen Neuronen aus.

Zahlreiche Untersuchungen in verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass die Notch-Signaltransduktion an der Entscheidung von Zellschicksalen durch **laterale Spezifizierung** beteiligt ist (Apelqvist *et al.*, 1999; Heitzler and Simpson, 1991; Radtke *et al.*, 1999; Roehl and Kimble, 1993). Der Verlust von *Dll1* bzw. von *RBP-J κ* führt beispielsweise dazu, dass sich in der entwickelnden Pankreas ein Überschuss an **endokrinen** Zellen ausbildet, während die Vorläufer der **exokrinen** Zellen verloren gehen (Apelqvist *et al.*, 1999). Repopulationsexperimente von bestrahlten SCID Mäusen mit *Notch1* defizienten Knochenmarkszellen lassen darauf schließen, dass Notch1 während der **Hämatopoese** an der Segregation der T-Vorläuferzelllinie beteiligt ist (Radtke *et al.*, 1999).

Die Expression von *ngn2* und *NeuroD* erscheint in *Dll1^{lacZ}* Mutanten nahezu unverändert. Die Veränderungen entlang der a/p-Achse sind dabei eher auf die defekte Segmentierung zurückzuführen. Dies lässt den Schluss zu, dass Dll1 scheinbar nicht an der Determinierung und Segregation der V_{S1} -Neuralleistenzelllinie beteiligt ist.

Der Verlust der *ngn1* Expression in *Dll1^{lacZ}* Mutanten spricht jedoch für den Verlust der V_{S2} -Neuralleistenzellen, die sich primär zu den kleinen sensorischen Neuronen der Dorsalwurzelganglien entwickeln. Die gleichzeitige Überexpression der autonomen Zellmarker *Mash-1*, *Phox2a* und *Phox2b* (Blaugrund *et al.*, 1996; Pattyn *et al.*, 1997) ist ein deutlicher Hinweis auf eine Überproduktion autonomer PNS Vorläuferzellen in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten (**Abb. 3.8**). Dieser Phänotyp könnte damit erklärt werden, dass die Dll1 Funktion notwendig für die Segregation der $V_{S2/A}$ -Zelllinie in die sensorische Vorläuferzelllinie V_{S2} ist (**Abb. 4.4-B**).

Dll1 könnte dabei direkt an einer asymmetrischen Zellteilung der $V_{S2/A}$ -Zellen in ihre autonomen und sensorischen Vorläufer-Nachkommen beteiligt sein, oder aber instruierend auf die V_{S2} -Zellen wirken und deren Weiterentwicklung fördern. Zieht man aber das gängige Model der lateralen Inhibition in Betracht, so spricht der Verlust der *ngn1* exprimierenden Zellen und die gleichzeitige Überexpression der autonomen PNS-Marker in den E9.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten eher für eine direkte Beteiligung von Dll1 an der asymmetrischen Zellteilung der $V_{S2/A}$ Zellen. Diese Befunde sind der erste offenbare Hinweis einer direkten Beteiligung der Notch-Signaltransduktion an der Segregation der Neuralleistenzelllinien.

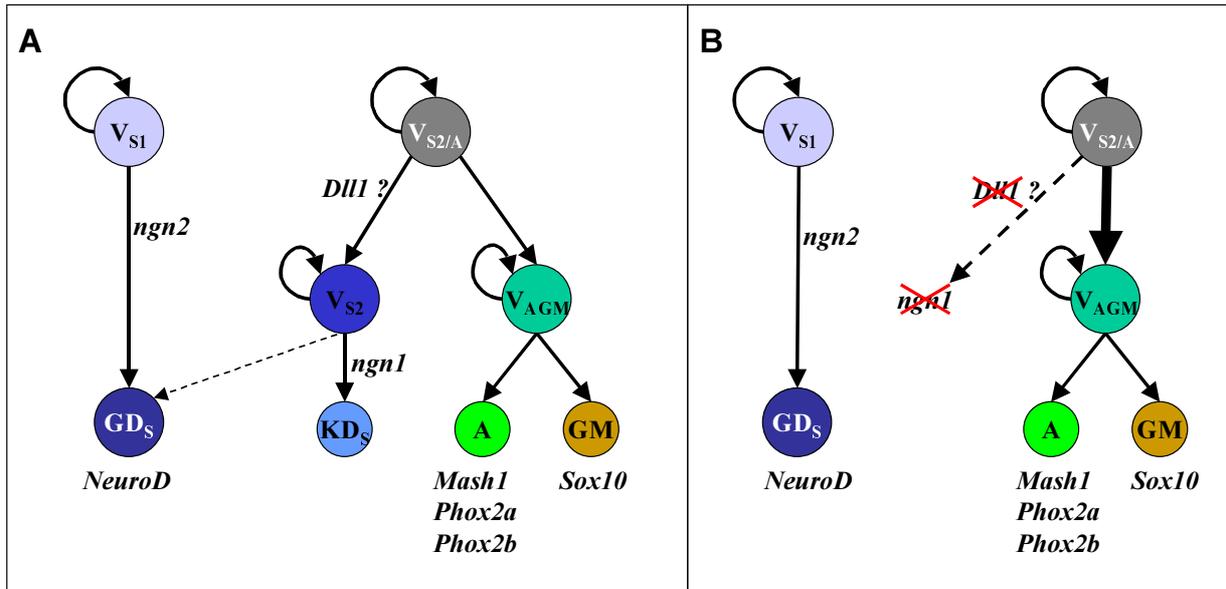


Abb. 4.4: Mögliche Beteiligung von Dll1 an der Segregation sensorischer PNS Vorläuferzellen

(A) *In vivo* werden zwei Klassen von sensorischen Vorläuferzellen (V_{S1} , $V_{S2/A}$) postuliert. Der bHLH Transkriptionsfaktor *ngn2* wird spezifisch in der V_{S1} -Zelllinie exprimiert. Aus ihr entwickeln sich primär die großen sensorischen Neuronen der Dorsalwurzelganglien (GD_S). Die $V_{S2/A}$ -Zelllinie segregiert sowohl sensorische (V_{S2}) als auch autonome Vorläuferzellen (V_{AGM}). Die sensorische Vorläuferzelllinie V_{S2} exprimiert spezifisch den bHLH Transkriptionsfaktor *ngn1*. Aus ihr entwickeln sich primär die kleinen sensorischen Neuronen (KD_S) des spinalen PNS. Aus der autonomen Vorläuferzelllinie V_{AGM} segregieren die Vorläufer der autonomen Neuronen (A) und die der Glia-Melanozyten (GM). (adaptiert nach (Greenwood *et al.*, 1999)).

(B) Segregation der sensorischen Neuronen in $Dll1^{lacZ}$ Mutanten: Die Segregation der V_{S1} Vorläuferzelllinie scheint in den $Dll1^{lacZ}$ Mutanten nicht gestört. Das Fehlen der *ngn1* Expression und die Überexpression der autonomen Marker (*Mash1*, *Phox2a/2b*) sprechen für den Verlust der V_{S2} -Zelllinie und eine Zunahme der autonomen Neuronenvorläufer und möglicherweise deren Vorläuferzelllinie V_{AGM} . Dies lässt auf eine Funktion von Dll1 in der Segregation der $V_{S2/A}$ -Zelllinie in ihre Nachfolgerzelllinien V_{S2} und V_{AGM} schließen. Hierbei ist eine direkte Beteiligung von Dll1 an einer potentiellen asymmetrischen Zellteilung wahrscheinlich.

(Die Kreispeile sollen auf die Fähigkeit der „Selbsterneuerung“ der jeweiligen Vorläuferzelllinie hindeuten. Die Gennamen unterhalb der jeweiligen Zelllinie bezeichnen spezifisch exprimierte Gene in den selben)

4.10. Erschöpfung des Neuralleisten-Stammzellpools

Während der Neurulation wandern die induzierten Neuralleistenzellen aus dem lateralen Neuroektoderm aus und nehmen mesenchymalen Charakter zwischen dem dorsalen Neuralrohr und dem epidermalen Ektoderm an. Aus dieser Stammzellpopulation wandern in verschiedenen Wellen die unterschiedlichen Neuralleistenzelllinien aus (Henion and Weston, 1997). Dabei entsprechen die ventralen PNS Strukturen entwicklungspezifisch früh ausgewanderten Neuralleistenzellen, während die dorsalen PNS Strukturen von spät auswandernden Neural-

leistenzellen ausgebildet werden. Für den ordentlichen Aufbau der Neuralleistenderivate muss ein steter Nachschub an auswandernden Neuralleistenzellen aus der Neuralleiste und somit die Aufrechterhaltung des Neuralleisten-Stammzellpools gewährleistet sein. Für die Erhaltung dieser Zellpools scheinen die Wnt-Signale aus der *Roofplate* eine wichtige Rolle zu spielen (Dickinson *et al.*, 1994; McMahon and Bradley, 1990; Takada *et al.*, 1994). In *Wnt1/Wnt3a* Doppelmutanten wird der Neuralleisten-Stammzellpool nicht erneuert. Die damit verbundene Erschöpfung der Stammzellpopulation verhindert den Nachschub an spät auswandernden Neuralleistenzellen und hat einen Verlust der dorsalen PNS Strukturen zur Folge (Ikeya *et al.*, 1997).

Einen vergleichbaren, wenn auch schwächeren Phänotyp zeigen die *Dll1^{lacZ}* Mutanten. Die Reduktion der *Sox10*, *Islet-1* und Neurofilament Expression in der dorsalen Körperhälfte der E10.5 *Dll1^{lacZ}* Mutanten lässt dabei ebenfalls auf eine Reduktion der proximalen PNS Strukturen schließen. In Analogie zum PNS Phänotyp der *Wnt1/Wnt3a* Doppelmutanten könnte die verminderte Expression von *Wnt1/Wnt3a* in den *Dll1^{lacZ}* (Abb. 3.7) eine Erschöpfung des Neuralleisten-Stammzellpools bewirken. Der, gegenüber den *Wnt1/Wnt3a* Doppelmutanten, schwächere Phänotyp in der Reduktion der proximalen PNS-Strukturen (Abb. 3.9) könnte dadurch erklärt werden, dass in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten eine Restexpression von *Wnt1* vorliegt, die einen gewissen Grad an Selbsterneuerung des Neuralleisten-Stammzellpools ermöglicht. Die Reduktion der proximalen PNS-Strukturen in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten könnte also einen von Dll1 rein sekundär beeinflussten Effekt darstellen.

Dennoch ist eine direkte Beteiligung von Dll1 am Erhalt der Neuralleisten-Stammzellpopulation nicht auszuschließen. Wie bereits erwähnt, haben *in vitro* Studien gezeigt, dass die lösliche Form des humanen Dll1 Proteins die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen inhibieren kann (Han *et al.*, 2000). Es wäre demnach vorstellbar, dass lösliche Dll1-Formen aus dem dorsalen Neuralrohr neben den Wnt-Signalen aus der *Roofplate* direkt zum Erhalt der Neuralleisten-Stammzellpopulation beitragen, indem sie die Differenzierung der Neuralleistenzelllinien negativ beeinflussen. Da *Dll1* auch in den Neuralleistenzellen exprimiert wird (Abb. 3.1-A) könnte diese Art der Regulation auch über eine Art *Feed-back*-Mechanismus zwischen sich differenzierenden Neuralleistenzellen und den verbleibenden Stammzellen ablaufen.

Mehr Aufschluss könnte hier die immunhistochemische Analyse der verschiedenen potentiellen Dll1 Proteinformen geben.

4.11. Ausblicke

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass *in vivo* neben der bekannten membranassoziierten Form von Dll1 auch eine biologisch aktive lösliche Form von Dll1 existiert (Han *et al.*, 2000; Klueg *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 1999). Die Herstellung von Antikörpern gegen die membranassoziierte und die lösliche Form von Dll1 könnte helfen, die unterschiedlich erscheinenden Funktionen von Dll1 während der Neurogenese und anderer entwicklungspezifischer Vorgänge weiter aufzuklären.

Ein Zusammenhang zwischen der Notch- und der Wnt-Signaltransduktion ist bekannt, die genauen Interaktionspunkte und regulatorischen Elemente sind jedoch bislang weitgehend unbekannt. Die genauere Expressionsanalyse der Notch-Signaltransduktionsgene in *Wnt1/Wnt3a* Doppelmutanten könnte hierbei zusätzliche Erkenntnisse ermöglichen.

Vorstellbar wären auch funktionelle Studien an Hühnchenembryonen mit konstitutiv aktiven Notch-Signaltransduktionskomponenten oder Überexpression von *Wnt*-Genen. Hierbei könnte sich die neue Methode der *in ovo* Elektroporation von Hühnchenembryonen als effizientes Mittel der Wahl erweisen (Itasaki *et al.*, 1999).

Eine weiter aufzuklärende Fragestellung ist die Ursache der Reduktion der spinalen Nerven in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten (**Abb 3.1-L; 3.9-K,L,P**). Es gibt Hinweise, dass für das Auswachsen der spinalen Nerven Retinsäure notwendig ist (Maden *et al.*, 1996). Die Retinsäuresignalisierung scheint eng mit der Hox-Signaltransduktion verbunden zu sein (Marshall *et al.*, 1992; Niederreither *et al.*, 2000). Es gibt Beobachtungen, dass die Expression bestimmter Hox-Gene in *C. elegans* für die korrekte Migration neuronaler Vorläufer bzw. in der Maus für das Auswachsen von Nerven wichtig ist (Salser and Kenyon, 1994; Studer *et al.*, 1996). Da der Retinsäurestoffwechsel in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten offenbar gestört ist stellt sich die Frage in wie fern die Expression der Hox-Gene verändert sein könnte. Darüber hinaus ist diese Fragestellung interessant, da es zahlreiche Segmentpolaritätsmutanten gibt, in denen die Notch-Signaltransduktion in bestimmten Segmenten entlang der a/p-Achse mehr bzw. weniger stark gestört erscheint (Hrabe-de-Angelis *et al.*, 1997; persönliche Kommunikation Dr. Imai). Da der „Hox-Genecode“ die a/p-Regionen des Körpers determiniert, stellt sich die Frage, ob möglicherweise ein regulatorischer Zusammenhang zwischen der Expression der Hox-Gene und der Notch-Signaltransduktion besteht. Die Analyse der Hox-Expression in den *Dll1^{lacZ}* Mutanten bzw. anderen Segmentpolaritätsmutanten wie z.B.: Tail-Kink , oder Pudy (Lyon and Searle, 1989) könnte sich hierbei als nützlich erweisen.

4.12. Spekulationen

Rein spekulativ bleiben bislang die folgenden Überlegungen.

Während der Wundheilung werden zum Teil Prozesse reaktiviert, die während der embryonalen und fötalen Entwicklung eines Organismus ablaufen. Auch die Reaktivierung der Notch-Signaltransduktion scheint während Wundheilungsprozessen eine Rolle zu spielen. Mitsiadis *et al.* zeigten, dass die Delta-Notch-Signaltransduktion nach Zahnverletzungen reaktiviert wird und womöglich zur Wundheilung beiträgt (Mitsiadis *et al.*, 1999). Sie zeigten, dass das gesunde Gewebe zwar Delta1, aber keinen der Notch-Rezeptoren exprimiert. Nach Verletzung des Gewebes zeigte sich schließlich eine Überexpression von *Delta1* und eine Reaktivierung der *Notch*-Expression. Da *in vitro* und *in situ* Studien zeigen, dass die Notch-Signaltransduktion instruierend auf Zellschicksale wirkt (vgl. diese Studie; Han *et al.*, 2000; Radtke *et al.*, 1999), könnte die Reaktivierung der Notch-Signaltransduktion während der Wundheilung für den geordneten Wiederaufbau des geschädigten Gewebes notwendig sein.

Vorstellbar wäre sich diese Eigenschaft in Methoden der modernen Molekularmedizin zu Nutze zu machen, beispielsweise durch einen möglichen gentherapeutischer Einsatz zur Unterstützung der Wundheilung.

Darüber hinaus gibt bereits mehrere Ansätze neurologische Erkrankungen mit Hilfe von embryonalen Stammzellen zu therapieren (Barinaga, 2000; Pedersen, 1999). Dies wirft momentan jedoch noch große ethische Konflikte auf. Neure Studien haben gezeigt, dass die Astrogliazellen des erwachsenen ZNS Stammzellcharakter besitzen (Doetsch *et al.*, 1999a; Doetsch *et al.*, 1999b). Die Vorstellung isolierte Astrogliazellen, *in vitro* zu kultivieren und für therapeutische Zweck zu verwenden erscheint denkbar und zur Zeit ethisch vertretbar. Der molekularbiologische Gebrauch der Notch-Signaltransduktion könnte sich hierbei als sehr nützlich erweisen, um in *in vitro* Stammzellkulturen die Ausdifferenzierung der selben zu verhindern, bzw. durch die instruierende Potenz der einzelnen Notch-Signalmoleküle die Generation bestimmter Zelllinien zu unterstützen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das *Drosophila Delta* Homolog *Delta-like-1 (Dll1)* der Maus eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung sowohl des zentralen Nervensystems (ZNS) als auch des peripheren Nervensystems (PNS) einnimmt.

Im ZNS scheint *Dll1* an der Regulation der Anzahl an neuronalen Vorläuferzellen, sowie am Erhalt der neuronalen Stammzellpopulation beteiligt zu sein. Eine Beteiligung an der Segregation bestimmter neuronaler Zelltypen im ZNS scheint ebenfalls möglich, zumal *in vitro* Studien an Neurosphären zeigen, dass beim Verlust von *Dll1* bestimmte Klassen von Gliazellen nicht ausgebildet werden. Darüber hinaus spielt die Funktion von *Dll1* offenbar eine wichtige Rolle in der regionalen Suborganisation des Neuralrohres, sowie in der Einschränkung der *Floorplate*-Größe und dem Erhalt einer intakten *Roofplate*.

Während der PNS Entwicklung wird seit längerem eine Beteiligung der Notch-Signaltransduktion an der Segregation der verschiedenen Neuralleistenzelllinien vermutet (Anderson *et al.*, 1997; Greenwood *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde zum ersten mal ein direkter Zusammenhang zwischen einer Notch-Signaltransduktionskomponenten und der Segregation von Neuralleistenzelllinien hergestellt. Dabei ist *Dll1* möglicherweise direkt an der Ausbildung der *ngn1*-spezifischen sensorischen Neuralleistenvorläuferzelllinie beteiligt. *Dll1* könnte zudem direkten Einfluss auf den Erhalt des Neuralleisten-Stammzellpools nehmen.

Es wurde bereits gezeigt, dass in der Maus die Wnt-Signaltransduktion Einfluss auf die Expression der Notch-Signaltransduktionsgene nehmen kann (Ikeya and Takada, 1998). In Analogie zu Befunden in *Drosophila* (Couso *et al.*, 1995; Neumann and Cohen, 1996), bestärken die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung, dass auch im Säugtier die Notch-Signaltransduktion reziprok regulatorischen Einfluss auf die *Wnt*-Expression nehmen kann.

6. Abkürzungen

°C	Grad Celsius	rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro min)
µg	Mikrogramm	RT	Raumtemperatur
µl	Mikroliter	s	Sekunde(n)
µM	Mikromolar	SI	Sulcus Limitans
a/p	antero/postero	SDS	Sodiumdodecylsulfat
Abb.	Abbildung	SSC	Natriumzitatpuffer
CCD	Charge Coupled Device	T	Tween20
cDNA	copy DNA	Tab.	Tabelle
d/v	dorso/ventral	Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurate
DNA	Desoxyribonukleinsäure	U	Units
DWG	Dorsalwurzelganglion	vgl.	vergleiche
E	Embryonalstadium	vs.	(lat.versus): gegen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	VEK	vordere Extremitätenknospe
FA	Formamid	WT	wiltyp
g	Gramm		
h	Stunde(n)		
HEK	hintere Extremitätenknospe		
M	Molar		
mg	Milligramm		
min	Minute(n)		
mM	Millimolar		
NP40	Nonidet P40		
o/n	Über Nacht (over night)		
p.a.	per analysis (Analysereinheitsgrad)		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PFA	Paraformaldehyd		
pS	präsomitisches Mesoderm		
RNA	Ribonukleinsäure		

7. Glossar

anterior	der vordere; dem Vorderende zu; vorne
antisense	nicht kodierend; komplementär (Nukleotidsequenz)
caudal	am Schwanz, am Körperende gelegen
cryo-	gefrier-; gefroren
cranial	schädelwärts; am Vorderende gelegen
distal	weiter entfernt (von der Mittellinie) Ggs. proximal
dorsal	z. Rücken gehörig; rückseitig; oben; Ggs. Ventral
endokrin	in das Blut absondernd (Drüsen)
exokrin	nach außen absondernd (Drüsen); Körperoberfläche; Darmlumen
Floorplate	ventrale Mittellinienzellstruktur des Neuralrohres; Bodenplatte
Hämatopoese	Blutbildung
in ovo	im Ei
in situ	(lat. Am natürlichen Ort): in natürl. Lage; im Körper
in utero	in der Gebärmutter
in vitro	(lat. im Glas): außerhalb des lebenden Organismus
intraperitoneal	innerh. des Bauchfells; (klin.) im Bauchfell
lateral	seitlich, auf der Seite, auswärts
medial	mittig; in der Mitte; zentral
Mesenzephalon	Mittelhirn (3. Ventikel)
Neuroblast	nicht ausgereifte Nervenzelle
posterior	nachkommend; hinten; am Körperende gelegen
Proliferation	Zellvermehrung; aktive Zellteilung; (path.: Wucherung)
proximal	nah; der Körpermitte zu gelegen; Ggs. distal
Rhombenzephalon	Rautenhirn; Hinterhirn (4. Ventikel)
Roofplate	dorsale Mittellinienzellstruktur des Neuralrohres; Scheitelplatte
rostral	(lat. rostrum: Schnabel): davor; in Richtung Vorderende
Sulcus limitans	d/v-Mittelachse des Neuralrohres
Syndactylie	Entwicklungsstörung mit Verwachsungen bzw. nicht Trennung von Zehen- oder Fingeranlagen

Telenzaphalon	Vorderhirn (1. und 2. Ventrikel)
transversal	quer, schrägliegend
Vaskularisation	Gefäßbildung; Neubildung von Gefäßen
ventral	an der Bauchseite; zum Bauchgehörig; unten
Whole mount	im ganzen (Embryo)

8. Literaturverzeichnis

- Anderson, D. J. (1997). : Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. : *Trends Genet* 13, 276-80.
- Anderson, D. J. (1999). Lineages and transcription factors in the specification of vertebrate primary sensory neurons [In Process Citation]. *Curr Opin Neurobiol* 9, 517-24.
- Anderson, D. J., Groves, A., Lo, L., Ma, Q., Rao, M., Shah, N. M., and Sommer, L. (1997). Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 493-504.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H. (1999). :Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-81.
- Appel, B., and Eisen, J. S. (1998). : Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. : *Development* 125, 371-80.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* 268, 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). :Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-6.
- Ashburner, M. (1982). :The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. III. Hypomorphic and hypermorphic mutations affecting the expression of hairless. *Genetics* 101, 447-59.
- Axelrod J. D., Matsuno K., Artavanis-Tsakonas S., and N., P. (1996). : Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. : *Science* 271, 1826-32.
- Bailey, A. M., and Posakony, J. W. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* 9, 2609-22.
- Baker, C. V., Bronner-Fraser, M., Le Douarin, N. M., and Teillet, M. A. (1997). Early- and late-migrating cranial neural crest cell populations have equivalent developmental potential in vivo. *Development* 124, 3077-87.
- Bang, A. G., and Goulding, M. D. (1996). Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr Opin Neurobiol* 6, 25-32.
- Barinaga, M. (2000). Fetal neuron grafts pave the way for stem cell therapies [news]. *Science* 287, 1421-2.
- Barrantes IB, Elia AJ, Wunsch K, De Angelis MH, Mak TW, Rossant J, Conlon RA, Gossler A, and JL, d. I. P. (1999). :Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr Biol* 1999 9, 470-80.
- Barsh, G. S. (1996). The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 12, 299-305.

- Beckers J, Clark A, Wunsch K, Hrabe De Angelis M, and A, G. (1999). :Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech Dev* 84, 165-8.
- Beckers, J., Caron, A., Hrabé de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J., and Gossler, A. (2000). Distinct regulatory elements direct Delta1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech Dev* in press.
- Bettenhausen, B., Hrabe-de-Angelis, M., Simon, D., Guenet, J. L., and Gossler, A. (1995). : Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. : *Development* 121, 2407-18.
- Blair, S. S. (1996). Notch and Wingless signals collide [see comments]. *Science* 271, 1822-3.
- Blaugrund, E., Pham, T. D., Tennyson, V. M., Lo, L., Sommer, L., Anderson, D. J., and Gershon, M. D. (1996). Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development* 122, 309-20.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). : Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. : *Cell* 90, 281-91.
- Bonstein, L., Elias, S., and Frank, D. (1998). Paraxial-fated mesoderm is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 193, 156-68.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L., and Ericson, J. (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398, 622-7.
- Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E. (1988). Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335, 161-4.
- Cadigan, K. M., and Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-305.
- Cagan, R. L., and Ready, D. F. (1989). Notch is required for successive cell decisions in the developing *Drosophila* retina. *Genes Dev* 3, 1099-112.
- Campos-Ortega, J. A. (1993). Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* 24, 1305-27.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-13.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., and Kintner, C. (1995). : Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. : *Nature* 375, 761-6.

- Couso, J. P., Knust, E., and Martinez Arias, A. (1995). Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*. *Curr Biol* 5, 1437-48.
- Crittenden, S. L., Troemel, E. R., Evans, T. C., and Kimble, J. (1994). GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line. *Development* 120, 2901-11.
- de Celis, J. F., Barrio, R., del Arco, A., and Garcia-Bellido, A. (1993). Genetic and molecular characterization of a Notch mutation in its Delta- and Serrate-binding domain in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4037-41.
- de Celis, J. F., and Bray, S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 3241-51.
- de la-Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J., and Conlon, R. A. (1997). : Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. : *Development* 124, 1139-48.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain [see comments]. *Nature* 398, 518-22.
- Diaz- Benjumea, F. J., and Cohen, S. M. (1995). : Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. : *Development* 121, 4215-25.
- Dickinson, M. E., Krumlauf, R., and McMahon, A. P. (1994). Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120, 1453-71.
- Dickinson, M. E., Selleck, M. A., McMahon, A. P., and Bronner-Fraser, M. (1995). Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development* 121, 2099-106.
- Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J., and Hui, C. C. (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in *Gli2* mutant mice. *Development* 125, 2533-43.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-16.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11619-24.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* 10, 421-34.
- Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., and Jessen, K. R. (1995). Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15, 585-96.

- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M., and Beddington, R. S. (1997). : Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. : *Development* 124, 3065-76.
- Echelard, Y., Vassileva, G., and McMahon, A. P. (1994). Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS. *Development* 120, 2213-24.
- Epstein, D. J., McMahon, A. P., and Joyner, A. L. (1999). Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development* 126, 281-92.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1996). : Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. : *Cell* 87, 661-73.
- Ericson, J., Muhr, J., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1995). : Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. : *Int J Dev Biol* 39, 809-16.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van-Heyningen, V., Jessell, T. M., and Briscoe, J. (1997). : Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. : *Cell* 90, 169-80.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M., and Yamada, T. (1992). : Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. : *Science* 256, 1555-60.
- Evans, T. C., Crittenden, S. L., Kodoyianni, V., and Kimble, J. (1994). Translational control of maternal glp-1 mRNA establishes an asymmetry in the *C. elegans* embryo. *Cell* 77, 183-94.
- Fainsod, A., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1994). On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *Embo J* 13, 5015-25.
- Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-34.
- Ferguson, E. L., Sternberg, P. W., and Horvitz, H. R. (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans* [published erratum appears in *Nature* 1987 May 7-13;327(6117):82]. *Nature* 326, 259-67.
- Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* 121, 4275-82.
- Fleming, R. J., Gu, Y., and Hukriede, N. A. (1997). Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 124, 2973-81.
- Fleming, R. J., Scottgale, T. N., Diederich, R. J., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene Serrate encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 4, 2188-201.

- Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87, 651-60.
- Frise, E., Knoblich, J. A., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11925-32.
- Galli-Taliadoros, L. A., Sedgwick, J. D., Wood, S. A., and Korner, H. (1995). Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods* 181, 1-15.
- Gonzalez-Gaitan, M., and Jackle, H. (1995). Invagination centers within the *Drosophila* stomatogastric nervous system anlage are positioned by Notch-mediated signaling which is spatially controlled through wingless. *Development* 121, 2313-25.
- Gossler, A., and Hrabe de Angelis, M. (1998). Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 38, 225-87.
- Goulding, M. D., Lumsden, A., and Gruss, P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117, 1001-16.
- Greenspan, R. J. (1990). The Notch gene, adhesion, and developmental fate in the *Drosophila* embryo. *New Biol* 2, 595-600.
- Greenwald, I. (1985). *lin-12*, a nematode homeotic gene, is homologous to a set of mammalian proteins that includes epidermal growth factor. *Cell* 43, 583-90.
- Greenwald, I., and Rubin, G. M. (1992). Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell* 68, 271-81.
- Greenwood, A. L., Turner, E. E., and Anderson, D. J. (1999). Identification of dividing, determined sensory neuron precursors in the mammalian neural crest. *Development* 126, 3545-59.
- Grunwald, D. J., and Streisinger, G. (1992). Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet Res* 59, 103-16.
- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J., and Joyner, A. L. (1993). : Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. : *Cell* 75, 463-76.
- Guo, M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17, 27-41.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D., and Lewis, J. (1998). : Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. : *Development* 125, 359-70.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-14.
- Hammerschmidt, M., Brook, A., and McMahon, A. P. (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet* 13, 14-21.

- Han, W., Ye, Q., and Moore, M. A. (2000). A soluble form of human delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells [In Process Citation]. *Blood* 95, 1616-25.
- Hardy, J., and Israel, A. (1999). Alzheimer's disease. In search of gamma-secretase [news; comment]. *Nature* 398, 466-7.
- Heitzler, P., and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G., and Melton, D. A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-95.
- Henderson, S. T., Gao, D., Christensen, S., and Kimble, J. (1997). Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 8, 1751-62.
- Henderson, S. T., Gao, D., Lambie, E. J., and Kimble, J. (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* 120, 2913-24.
- Henion, P. D., and Weston, J. A. (1997). Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124, 4351-9.
- Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, S. D., and Peterson, M. G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265, 92-5.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-90.
- Hrabe de Angelis, M., and Balling, R. (1998). Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res* 400, 25-32.
- Hrabe-de-Angelis, M., McIntyre, J., and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1. *Nature* 386, 717-721.
- Hsieh, J. J., and Hayward, S. D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560-3.
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M., and Harland, R. M. (1998). The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1, 673-83.
- Hynes, M., Stone, D. M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A., and Rosenthal, A. (1997). Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* 19, 15-26.
- Ikeya, M., Lee, S. M., Johnson, J. E., McMahon, A. P., and Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389, 966-70.
- Ikeya, M., and Takada, S. (1998). Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development* 125
- Irvine, K. D., and Wieschaus, E. (1994). fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* 79, 595-606.

- Itasaki, N., Bel-Vialar, S., and Krumlauf, R. (1999). 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat Cell Biol* 1, E203-E207.
- Jackson, D. E., Loo, R. O., Holyst, M. T., and Newman, P. J. (1997). Identification and characterization of functional cation coordination sites in platelet endothelial cell adhesion molecule-1. *Biochemistry* 36, 9395-404.
- Jankowska, E., and Lindstrom, S. (1972). Morphology of interneurons mediating Ia reciprocal inhibition of motoneurons in the spinal cord of the cat. *J Physiol (Lond)* 226, 805-23.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch [see comments]. *Nature* 377, 355-8.
- Jen, W. C., Wettstein, D., Turner, D., Chitnis, A., and Kintner, C. (1997). : The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. : *Development* 124, 1169-78.
- Jennings, B., de Celis, J., Delidakis, C., Preiss, A., and Bray, S. (1995). :Role of Notch and achaete-scute complex in the expression of Enhancer of split bHLH proteins. :*Development* 121, 3745-3752.
- Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1998a). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* 12, 1046-57.
- Jiang, Y. J., Smithers, L., and Lewis, J. (1998b). Vertebrate segmentation: the clock is linked to Notch signaling. *Curr Biol* 8, R868-71.
- Johnston, S. H., Rauskolb, C., Wilson, R., Prabhakaran, B. I., Irvine, K. D., and Vogt, T. F. (1997). : A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. : *Development* 124, 2245-54.
- Kalyani, A., Hobson, K., and Rao, M. S. (1997). Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev Biol* 186, 202-23.
- Kimble, J., and Simpson, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 333-61.
- Klein, T., and Arias, A. M. (1998a). Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in *Drosophila*. *Dev Biol* 194, 196-212.
- Klein, T., and Arias, A. M. (1998b). Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during *Drosophila* wing development. *Development* 125, 2951-62.
- Klueg, K. M., Parody, T. R., and Muskavitch, M. A. (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol Biol Cell* 9, 1709-23.
- Kodoyianni, V., Maine, E. M., and Kimble, J. (1992). Molecular basis of loss-of-function mutations in the glp-1 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 3, 1199-213.
- Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., and Nye, J. S. (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1683-8.

- Kopczynski, C. C., Alton, A. K., Fechtel, K., Kooh, P. J., and Muskavitch, M. A. (1988). Delta, a Drosophila neurogenic gene, is transcriptionally complex and encodes a protein related to blood coagulation factors and epidermal growth factor of vertebrates. *Genes Dev* 2, 1723-35.
- Kusumi, K. *et al.* The mouse pudgy mutation disrupts *Delta* homologue *Dll3* and initiation of early somite boundaries. *Nature Genet.* 19, 274–278 (1998).
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I., and Wegner, M. (1998). : Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. : *J Neurosci* 18, 237-50.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* 125, 2403-14.
- Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., and Harland, R. M. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin [see comments]. *Science* 262, 713-8.
- Lambie, E. J., and Kimble, J. (1991). Two homologous regulatory genes, *lin-12* and *glp-1*, have overlapping functions. *Development* 112, 231-40.
- Lardelli, M., Dahlstrand, J., and Lendahl, U. (1994). The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* 46, 123-36.
- Larsson, C., Lardelli, M., White, I., and Lendahl, U. (1994). The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* 24, 253-8.
- Laufer, E., Dahn, R., Orozco, O. E., Yeo, C. Y., Pisenti, J., Henrique, D., Abbott, U. K., Fallon, J. F., and Tabin, C. (1997). Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Jul 24;388(6640):400]. *Nature* 386, 366-73.
- Laywell, E. D., Kukekov, V. G., and Steindler, D. A. (1999). Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals. *Exp Neurol* 156, 430-3.
- Le Douarin, N. M., Ziller, C., and Couly, G. F. (1993). Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: in vivo and in vitro studies. *Dev Biol* 159, 24-49.
- Lecourtois, M., and Schweisguth, F. (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* 9, 2598-608.
- Lee, J. E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7, 13-20.
- Lee, K. J., and Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22, 261-94.

- Lemke, G. E., and Brockes, J. P. (1984). Identification and purification of glial growth factor. *J Neurosci* 4, 75-83.
- Lewis, J. (1996). : Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. : *Curr Opin Neurobiol* 6, 3-10.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M. W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev* 7, 1949-65.
- Lieber, T., Wesley, C. S., Alcamo, E., Hassel, B., Krane, J. F., Campos-Ortega, J. A., and Young, M. W. (1992). Single amino acid substitutions in EGF-like elements of Notch and Delta modify Drosophila development and affect cell adhesion in vitro. *Neuron* 9, 847-59.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., and Jessell, T. M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127-38.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-79.
- Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A., and Weinmaster, G. (1996). Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci* 8, 14-27.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80, 909-17.
- Liu, J. P., and Jessell, T. M. (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* 125, 5055-67.
- Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T., and Anderson, D. J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev* 5, 1524-37.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-12.
- Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109-15.
- Lundgren, S. E., Callahan, C. A., Thor, S., and Thomas, J. B. (1995). Control of neuronal pathway selection by the Drosophila LIM homeodomain gene apterous. *Development* 121, 1769-73.
- Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F., and Anderson, D. J. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* 13, 1717-28.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hind-brain and other neural defects. *Curr Biol* 6, 417-26.
- Mansouri, A., and Gruss, P. (1998). Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mech Dev* 78, 171-8.
- Marsh, J. L., and Theisen, H. (1999). Regeneration in insects. *Semin Cell Dev Biol* 10, 365-75.

- Marti, E., Bumcrot, D. A., Takada, R., and McMahon, A. P. (1995). : Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. : *Nature* 375, 322-5.
- Martinez Arias, A. (1998). Interactions between Wingless and Notch during the assignment of cell fates in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* 42, 325-33.
- Marusich, M. F., and Weston, J. A. (1991). Development of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 1, 221-9.
- Matise, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A., and Joyner, A. L. (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* 125, 2759-70.
- Matise, M. P., and Joyner, A. L. (1997). : Expression patterns of developmental control genes in normal and Engrailed-1 mutant mouse spinal cord reveal early diversity in developing interneurons. : *J Neurosci* 17, 7805-16.
- Matsunami, N., Hamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Kuze, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Kawaichi, M., and Honjo, T. (1989). A protein binding to the J kappa recombination sequence of immunoglobulin genes contains a sequence related to the integrase motif. *Nature* 342, 934-7.
- Mayor, R., Guerrero, N., and Martinez, C. (1997). Role of FGF and noggin in neural crest induction. *Dev Biol* 189, 1-12.
- Mayor, R., Morgan, R., and Sargent, M. G. (1995). Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121, 767-77.
- McGrew, M. J., and Pourquie, O. (1998). Somitogenesis: segmenting a vertebrate. *Curr Opin Genet Dev* 8, 487-93.
- McKanna, J. A. (1993). Primitive glial compartments in the floor plate of mammalian embryos: distinct progenitors of adult astrocytes and microglia support the notoplate hypothesis. *Perspect Dev Neurobiol* 1, 245-55.
- McMahon, A. P., and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-85.
- Mello, C. C., Draper, B. W., and Priess, J. R. (1994). The maternal genes *apx-1* and *glp-1* and establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo. *Cell* 77, 95-106.
- Mickey, K. M., Mello, C. C., Montgomery, M. K., Fire, A., and Priess, J. R. (1996). An inductive interaction in 4-cell stage *C. elegans* embryos involves APX-1 expression in the signalling cell. *Development* 122, 1791-8.
- Mitsiadis, T. A., Fried, K., and Golidis, C. (1999). Reactivation of Delta-Notch signaling after injury: complementary expression patterns of ligand and receptor in dental pulp. *Exp Cell Res* 246, 312-8.
- Mitsiadis, T. A., Henrique, D., Thesleff, I., and Lendahl, U. (1997). Mouse Serrate-1 (Jagged-1): expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4. *Development* 124
- <http://www.biologists.com/Development/124/08/dev2107.html>, 1473-1483.

- Monsoro-Burq, A. H., Duprez, D., Watanabe, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P., and Le Douarin, N. (1996). The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development* 122, 3607-16.
- Moore, K. J. (1999). Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes. *Drug Discovery Today* 4, 123-128.
- Moran, J. L., LeVorse, J. M., and Vogt, T. F. (1999). Limbs move beyond the radical fringe [letter]. *Nature* 399, 742-3.
- Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C., and Anderson, D. J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737-49.
- Moury, J. D., and Jacobson, A. G. (1989). Neural fold formation at newly created boundaries between neural plate and epidermis in the axolotl. *Dev Biol* 133, 44-57.
- Moury, J. D., and Jacobson, A. G. (1990). The origins of neural crest cells in the axolotl. *Dev Biol* 141, 243-53.
- Muhr, J., Jessell, T. M., and Edlund, T. (1997). Assignment of early caudal identity to neural plate cells by a signal from caudal paraxial mesoderm. *Neuron* 19, 487-502.
- Murphy, M., Reid, K., Dutton, R., Brooker, G., and Bartlett, P. F. (1997). Neural stem cells. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2, 8-13.
- Muskavitch, M. A. (1994). Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol* 166, 415-30.
- Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Lewis, J. (1996). : A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. : *Dev Biol* 174, 233-47.
- Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., Gunther, T., Sporle, R., Schughart, K., and Mikoshiba, K. (1997). The expression of the mouse *Zic1*, *Zic2*, and *Zic3* gene suggests an essential role for *Zic* genes in body pattern formation. *Dev Biol* 182, 299-313.
- Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (1998). Xenopus *Zic* family and its role in neural and neural crest development. *Mech Dev* 75, 43-51.
- Neumann, C. J., and Cohen, S. M. (1996). A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the Drosophila wing. *Development* 122, 3477-85.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U. C., Chambon, P., and Dolle, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62, 67-78.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-12.
- Parks, A. L., Turner, F. R., and Muskavitch, M. A. (1995). Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during Drosophila eye development. *Mech Dev* 50, 201-16.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C., and Brunet, J. F. (1997). Expression and interactions of the two closely related homeobox genes *Phox2a* and *Phox2b* during neurogenesis. *Development* 124, 4065-75.
- Pedersen, R. A. (1999). Embryonic stem cells for medicine. *Sci Am* 280, 68-73.

- Pfaff, S., and Kintner, C. (1998). Neuronal diversification: development of motor neuron subtypes. *Curr Opin Neurobiol* 8, 27-36.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T. M. (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97, 903-15.
- Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283, 91-4.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-58.
- Rauskolb, C., and Irvine, K. D. (1999). Notch-mediated segmentation and growth control of the Drosophila leg. *Dev Biol* 210, 339-50.
- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687-99.
- Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J. W., De La Pena, J., Foy, B., Eshelman, B., and Belmonte, J. C. (1997). Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb [see comments] [published erratum appears in Nature 1997 Aug 28;388(6645):906]. *Nature* 386, 360-6.
- Roehl, H., and Kimble, J. (1993). Control of cell fate in *C. elegans* by a GLP-1 peptide consisting primarily of ankyrin repeats. *Nature* 364, 632-5.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., and Jessell, T. M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-55.
- Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., and Simpson, P. (1993). Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature* 362, 557-60.
- Ruiz-i-Altaba, A. (1997). : Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* 90, 193-6.
- Rulifson, E. J., and Blair, S. S. (1995). : Notch regulates wingless expression and is not required for reception of the paracrine wingless signal during wing margin neurogenesis in Drosophila. *Development* 121, 2813-24.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 6, 2620-34.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus* [published errata appear in Nature 1995 Oct 26;377(6551):757 and 1995 Nov 23;378(6555):419]. *Nature* 376, 333-6.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K., and De Robertis, E. M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-90.

- Schmidt, J. E., Suzuki, A., Ueno, N., and Kimelman, D. (1995). Localized BMP-4 mediates dorsal/ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Dev Biol* 169, 37-50.
- Selleck, M. A., and Bronner-Fraser, M. (1995). Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121, 525-38.
- Seugnet, L., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol* 192, 585-98.
- Shah, N. M., Groves, A. K., and Anderson, D. J. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, 331-43.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., and Weinmaster, G. (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122, 3765-73.
- Sidow, A., Bulotsky, M. S., Kerrebrock, A. W., Bronson, R. T., Daly, M. J., Reeve, M. P., Hawkins, T. L., Birren, B. W., Jaenisch, R., and Lander, E. S. (1997). *Serrate2* is disrupted in the mouse limb-development mutant syndactylism. *Nature* 389, 722-5.
- Simpson, P., Ruel, L., Heitzler, P., and Bourouis, M. (1993). A dual role for the protein kinase shaggy in the repression of *achaete-scute*. *Dev Suppl* , 29-39.
- Skeath, J. B., and Carroll, S. B. (1992). : Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. : *Development* 114, 939-46.
- Sommer, L., Ma, Q., and Anderson, D. J. (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 8, 221-41.
- Spana, E. P., and Doe, C. Q. (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. : *Neuron* 17, 21-6.
- Speicher, S. A., Thomas, U., Hinz, U., and Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* 120, 535-44.
- Sporle, R., and Schughart, K. (1998). Paradox segmentation along inter- and intrasomitic borderlines is followed by dysmorphology of the axial skeleton in the open brain (*opb*) mouse mutant. : *Dev Genet* 22, 359-373.
- Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila* [see comments]. *Nature* 398, 522-5.
- Sun, X., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* 124, 3439-48.
- Takada, S., Stark, K. L., Shea, M. J., Vassileva, G., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. (1994). Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev* 8, 174-89.

- Takebayashi, K., Akazawa, C., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1995). Structure and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-5. Identification of the neural precursor cell-specific promoter element. *J Biol Chem* 270, 1342-9.
- Tanabe, Y., and Jessell, T. M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord [published erratum appears in *Science* 1997 Apr 4;276(5309):21]. *Science* 274, 1115-23.
- Temple, S., and Qian, X. (1996). Vertebrate neural progenitor cells: subtypes and regulation. *Curr Opin Neurobiol* 6, 11-7.
- Thomas, U., Speicher, S. A., and Knust, E. (1991). The Drosophila gene Serrate encodes an EGF-like transmembrane protein with a complex expression pattern in embryos and wing discs. *Development* 111, 749-61.
- Thor, S., Andersson, S. G., Tomlinson, A., and Thomas, J. B. (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* 397, 76-80.
- Torii, M., Matsuzaki, F., Osumi, N., Kaibuchi, K., Nakamura, S., Casarosa, S., Guillemot, F., and Nakafuku, M. (1999). Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126
<http://www.biologists.com/Development/126/03/dev1326.html>, 443-456.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., and Kitajewski, J. (1996). Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122, 2251-9.
- Wallin, J., Wilting, J., Koseki, H., Fritsch, R., Christ, B., and Balling, R. (1994). : The role of Pax-1 in axial skeleton development. : *Development* 120, 1109-21.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J., and Lemke, G. (1991). A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205.
- Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T. M., and Darnell, J. E., Jr. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, 575-88.
- Weston, J. A. (1991). Sequential segregation and fate of developmentally restricted intermediate cell populations in the neural crest lineage. *Curr Top Dev Biol* 25, 133-53.
- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567-81.
- Wilkinson, H. A., Fitzgerald, K., and Greenwald, I. (1994). : Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision. : *Cell* 79, 1187-98.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity [see comments]. *Nature* 398, 513-7.

- Wurst, W., Auerbach, A. B., and Joyner, A. L. (1994). : Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. : *Development* 120, 2065-75.
- Wurst, W., Rossant, J., Prideaux, V., Kownacka, M., Joyner, A., Hill, D. P., Guillemot, F., Gasca, S., Cado, D., and Auerbach, A. (1995). A large-scale gene-trap screen for insertional mutations in developmentally regulated genes in mice. *Genetics* 139, 889-99.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-47.
- Ye, Y., Lukinova, N., and Fortini, M. E. (1999). Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants [see comments]. *Nature* 398, 525-9.
- Zhang, N., and Gridley, T. (1998). Defects in somite formation in lunatic fringe-deficient mice. *Nature* 394, 374-7.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., and Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599-606.
- zur Lage, P., and Jarman, A. P. (1999). Antagonism of EGFR and notch signalling in the reiterative recruitment of *Drosophila* adult chordotonal sense organ precursors. *Development* 126, 3149-57.

**Schätze Vergessen und Verwirrung,
verschwende wenig Gedanken,
hab' wenig Verlangen.....
Leere dein Herz um den Geist zu schützen.
Betrachte Langlebigkeit oder Tod,
Gewinn oder Verlust,
Anfang oder Ende ohne Neigung**

Li Dong-yuan.