

**Die Funktion des Transkriptionsfaktors Nkx6.1 bei  
der Entwicklung von Motoneuronen im Hirnstamm  
von *Mus musculus* ( LINNEAUS, 1758)**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Myriam Müller**

**aus Köln**

Referent: PD Dr. S. Hoffmeister-Ullerich  
Korreferent: Prof. Dr. L. Renwantz  
Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG .....	1
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Die Funktion von Transkriptionsfaktoren während der neuronalen Entwicklung .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Homeodomänen Proteine .....	4
1.1.2 Struktur der Nkx6 Homeodomänen Transkriptionsfaktoren .....	5
1.1.3 Bestimmung der neuronale Identität durch dorsoventrale Musterbildung.....	6
1.1.4 Architektur und Entwicklung des Hirnstamms.....	10
1.1.5 Bestimmung der Identität kranialer Motoneurone durch anteroposteriore Musterbildung.....	12
<b>1.2 Neuronale Migration .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Radiale und tangentielle Migration von Neuronen .....	14
1.2.2 Migration kranialer, branchiomotorischer Neurone .....	15
1.2.3 Mechanismen der neuronalen Migration .....	17
1.2.4 Molekulare Grundlagen der neuronalen Migration .....	18
1.2.4.1 TAG-1 .....	18
1.2.4.2 Ret.....	19
1.2.4.3 Netrin-1 und Netrin Rezeptoren.....	21
<b>1.3 Zielsetzung.....</b>	<b>23</b>
<b>2 ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Nkx6.1 Expression in kranialen Motoneuronen.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Untersuchung der Entwicklung kranialer Motoneuron im späten Embryonalstadium Nkx6.1 mutanter Mäuse .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Migration und Axonwegfindung kranialer, branchiomotorischer Neurone.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Migrationsdefekt der branchiomotorischen Neurone des <i>Nervus facialis</i> .....	29
2.3.2 Darstellung der Migration branchiomotorischer Neurone des <i>Nervus facialis</i> zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien .....	30
2.3.3 Migrationsdefekt der branchiomotorischen Neurone des <i>Nervus trigeminus</i> .....	32
2.3.4 Axonwegfindungsdefekte bei Nkx6.1 mutanten Mäusen.....	33
<b>2.4 Funktion von Nkx6.1 bei der Kontrolle der Migration kranialer, branchiomotorischer Neurone des <i>Nervus facialis</i>.....</b>	<b>36</b>
2.4.1 Analyse der Rhombomer Identität.....	36
2.4.2 Analyse der Spezifizierung branchiomotorischer Neurone des <i>Nervus facialis</i> .....	37
2.4.3 Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen während der Migration branchiomotorischer Neurone des <i>Nervus facialis</i> .....	41
2.4.3.1 TAG-1 Expression .....	41
2.4.3.2 Ret Expression .....	43
2.4.3.3 Unc5h3.....	43
<b>2.5 Nkx6.1 und Nkx6.2 Koexpression in R4.....</b>	<b>44</b>
<b>2.6 Expression von Hox, Gata und Ebf Transkriptionsfaktoren bei Nkx6.1 mutanten Mäusen ....</b>	<b>46</b>
<b>3 DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Funktion von Nkx6.1 bei der Spezifizierung kranialer Motoneurone.....</b>	<b>49</b>

3.2	<b>Funktion von Nkx6.1 bei der Migration branchiomotorischer Neurone .....</b>	<b>52</b>
3.3	<b>Mögliche Funktion von Ret und Netrin-1 Rezeptoren bei der Migration branchiomotorischer Neurone des <i>Nervus facialis</i>.....</b>	<b>56</b>
3.4	<b>Axonwegfindungsdefekte bei Nkx6.1 mutanten Mäusen.....</b>	<b>58</b>
3.5	<b>Kontrolle der Migration branchiomotorischer Neurone des <i>Nervus facialis</i> durch weitere Transkriptionsfaktoren .....</b>	<b>59</b>
3.6	<b>Ausblick .....</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>64</b>
4.1	<b>Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen.....</b>	<b>64</b>
4.2	<b>Zusammensetzung gebräuchlicher Medien und Lösungen .....</b>	<b>65</b>
4.3	<b>Verwendete Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierung .....</b>	<b>66</b>
4.4	<b>Verwendete Mäusestämme.....</b>	<b>67</b>
4.5	<b>Verwendete Bakterienstämme .....</b>	<b>68</b>
4.6	<b>Für Klonierungen verwendete Vektoren .....</b>	<b>68</b>
4.7	<b>Verwendete Antikörper .....</b>	<b>68</b>
4.7.1	Primäre Antikörper .....	68
4.7.2	Sekundäre Antikörper.....	69
<b>5</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>70</b>
5.1	<b>Herstellung und Aufbereitung von DNS-Fragmenten .....</b>	<b>70</b>
5.1.1	Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen .....	70
5.1.2	Auftrennung von DNS-Molekülen im Agarosegel .....	70
5.1.3	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	71
5.1.4	Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen .....	71
5.1.5	Modifikation von DNS-Enden.....	71
5.1.5.1	Dephosphorylierung von 5'-Enden .....	71
5.1.5.2	Auffüllen überhängender 5'-Enden .....	72
5.1.6	Herstellung von DNS-Fragmenten mittels "Polymerase Chain Reaction" (PCR).....	72
5.2	<b>Klonierung von DNS-Fragmenten.....</b>	<b>73</b>
5.2.1	Präparation von Vektoren.....	73
5.2.2	Ligation von DNS-Fragmenten mit Vektoren .....	73
5.2.3	Klonierung von PCR-Fragmenten .....	73
5.2.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	74
5.2.5	Transformation von Bakterienzellen .....	74
5.2.6	Sequenzierung von DNS .....	75
5.3	<b>Isolierung und Reinigung von DNS .....</b>	<b>75</b>
5.3.1	Isolierung von Plasmid-DNS Maxipräparation (LifeTechnologies Plasmid Maxiprep System). .....	75
5.3.2	Isolierung von Plasmid-DNS in analytischem Maßstab (Minipräparation).....	76
5.3.3	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung.....	76
5.3.4	Isolierung von genomischer DNS aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung mittels PCR.....	77
5.3.5	Isolierung von genomischer DNS aus Embryonalem Gewebe zur Genotypisierung mittels „Southern blot“ .....	77

---

<b>5.4</b>	<b>Identifizierung von DNS-Fragmenten durch Hybridisierung.....</b>	<b>78</b>
5.4.1	DNS-Transfer von Agarose-Gelen auf Membranen (Southern-Blot).....	78
5.4.2	Hybridisierung von DNS nach Transfer auf Membranen.....	79
5.4.3	Herstellung der radioaktiv markierter DNS Proben .....	79
<b>5.5</b>	<b><i>In situ</i>-Hybridisierung an ganzen Embryonen und Gewebeschnitten.....</b>	<b>80</b>
5.5.1	Herstellung von Embryopuder.....	80
5.5.2	Synthese von DIG markierten RNS Sonden durch in vitro Transkription.....	80
5.5.3	Prähybridisierung von Gesamtembryonen.....	81
5.5.4	Hybridisierung an Gesamtembryonen und Signaldetektion .....	81
5.5.5	Hybridisierung auf Gewebeschnitten und Signaldetektion.....	82
<b>5.6</b>	<b>Immunohistochemie.....</b>	<b>83</b>
5.6.1	Immunofluoreszenz Färbungen .....	83
5.6.2	Peroxidase Färbung .....	84
5.6.3	Immunohistochemie auf ganzen Embryonen und Signaldetektion.....	84
<b>5.7</b>	<b>Fixierung und Weiterverarbeitung von Embryonen .....</b>	<b>85</b>
5.7.1	Perfusion von Mäusen .....	85
5.7.2	Herstellung von Gefrierschnitten.....	86
5.7.3	Herstellung von Paraffinschnitten .....	86
5.7.4	Präparation der embryonalen Hirnstämme .....	87
<b>5.8</b>	<b>Retrograde Markierung der kranialen Nerven .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>

## Zusammenfassung

Der Homeodomänen Transkriptionsfaktor Nkx6.1 spielt eine wichtige Rolle während der Neurogenese. So wurde er als der entscheidende Faktor identifiziert, der für die frühe Spezifizierung der somatomotorischen Neurone im Rückenmark verantwortlich ist. Über seine Funktion bei der weiteren Entwicklung postmitotischer Neurone ist jedoch nur wenig bekannt. Zu diesen Entwicklungsprozessen gehört beispielsweise das Auswachsen korrekter Axonprojektionen, die Synthese charakteristischer Neurotransmitter, sowie die korrekte Migration der Neurone. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Nkx6.1 für die Entwicklung von Motoneuronen im Hirnstamm der Maus untersucht. Abhängig von den Zielmuskeln, lassen sich kraniale Motoneurone in drei Klassen einteilen: die somatomotorischen, die viszeromotorischen und die branchiomotorischen Neurone. Während der Embryogenese werden diese Neurone aus ventral lokalisierten Vorläuferzellen des Neuralrohrs gebildet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass Nkx6.1 sowohl in den Vorläuferzellen, als auch in postmitotischen kranialen Motoneuronen aller drei Klassen nachweisbar war. Um die Funktion von Nkx6.1 für die Entwicklung dieser Neurone zu untersuchen, wurde die Bildung der verschiedenen Motoneuronenklassen bei Nkx6.1 mutanten Mausembryonen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass analog zum Rückenmark, Nkx6.1 auch im Hirnstamm für die Spezifizierung der somatomotorischen Vorläuferzellen verantwortlich ist. Die Spezifizierung viszero- und branchiomotorischer Neurone ist hingegen unabhängig von Nkx6.1. Obwohl die frühe Differenzierung der viszero- und branchiomotorischen Neurone bei Nkx6.1 mutanten Embryonen normal verläuft, ließ die Analyse neonataler Hirnschnitte erkennen, dass die Neurone des *Nervus trigeminus* und des *Nervus facialis* nicht richtig im Hirnstamm positioniert waren. Dies ließ vermuten, dass die Migration der Neurone beider Nerven gestört ist. Diese Hypothese konnte durch retrograde Markierung der Nerven mit dem Fluoreszenz Indikator DiI bestätigt werden. Außer den Migrationsdefekten zeigten sich bei den retrograden Markierungen auch aberrante Projektionen der Axone branchiomotorischer Neurone innerhalb des Hirnstamms. So verließen einige Axone der branchiomotorischen Neuronen des *Nervus trigeminus* und des *Nucleus ambiguus* den Hirnstamm fälschlicherweise mit dem *Nervus facialis*.

Im Folgenden wurde der Mechanismus, der dem Migrationsdefekt der branchiomotorischen Neurone des *Nervus facialis* zu Grunde liegt, näher untersucht. Da die Migration der Neurone durch Signale entlang des Wegs der Neurone gesteuert wird, wurde der Hirnstamm Nkx6.1 mutanter Embryonen sowohl im Hinblick auf Veränderungen der Umgebung der Neurone als auch auf Veränderungen der Neurone selbst untersucht. In den nachfolgenden Analysen konnten keine morphologischen oder molekularen Veränderungen der Umgebung der branchiomotorischen Neurone des *Nervus facialis* nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden zellintrinsische Veränderungen in den migrierenden Neuronen selbst festgestellt. *In situ* Hybridisierungen zeigten, dass prämigrierende Neurone die Zelloberflächenmoleküle Ret und Unc5h3 bei Nkx6.1 mutanten Embryonen ektopisch exprimierten. Der Beginn der ektopischen Expression dieser Rezeptoren korrelierte dabei zeitlich mit dem Auftreten des Defekts in der kaudalen Migration der Neurone des *Nervus facialis*. Diese Ergebnisse weisen auf eine zellautonome Funktion von Nkx6.1 bei der Kontrolle der neuronalen Migration hin. Ob die Migration der Neurone des *Nervus facialis* jedoch unmittelbar über diese Rezeptoren gesteuert wird, müssen weitere Untersuchungen klären,

Detaillierte Analysen des Migrationsverhaltens der Neurone des *Nervus facialis* zeigten, dass im Gegensatz zu spät migrierenden Populationen eine früh migrierende Population von Neuronen auch bei Nkx6.1 mutanten Embryonen die kaudale Migration initiierte. Dies ließ vermuten, dass andere Faktoren während dieser frühen Phase für die Funktion von Nkx6.1 kompensieren. Ein möglicher Kandidat für eine solche Funktion ist der zu Nkx6.1 hoch homologe Transkriptionsfaktor Nkx6.2. Es konnte gezeigt werden, dass Nkx6.2 in der Tat während der frühen Entwicklung der branchiomotorischen Neurone mit Nkx6.1 koexprimiert wurde, während zu späteren Zeitpunkten nur noch Nkx6.1 nachweisbar war. Der Rückgang der Nkx6.2 Expression korrelierte exakt mit dem Zeitpunkt des Auftretens des Defekts in der kaudalen Migration der Neurone des *Nervus facialis*. Dies weist darauf hin, dass bei Nkx6.1 mutanten Mäusen früh entstehende Populationen von Neuronen des *Nervus facialis* durch Kompensation von Nkx6.2 eine kaudale Migration initiieren können. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Nkx6.1 während der Neurogenese nicht nur eine frühe Funktion bei der Spezifizierung somatomotorischer Vorläuferzellen, sondern auch eine späte Funktion bei der Entwicklung postmitotischer kranialer Motoneurone hat. Dabei kontrolliert Nkx6.1 die Migration und die Axonwegfindung branchiomotorischer Neurone. Die durchgeführten Analysen weisen darauf hin, dass diesem Defekt ein zellautonomer Mechanismus zu Grunde liegt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Funktion von Transkriptionsfaktoren während der neuronalen Entwicklung

Die Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) der Vertebraten ist ein komplexer Prozess, in dessen Verlauf sich eine Vielzahl unterschiedlicher Neuronentypen entwickelt. Neurone entstehen aus multipotenten, mitotisch aktiven Vorläuferzellen in proliferativen Zonen des Neuralrohrs. Nach ihrer letzten Zellteilung exprimieren die postmitotischen Neurone erste neuronale Proteine, welche die Zelle eindeutig als Neuron kennzeichnen. Die Neurone bilden neuronale Fortsätze und separieren sich von der proliferativen Zone. Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden Axone und Dendriten in die jeweiligen Zielgebiete ausgesandt und axonale Verbindungen durch Ausbau von Synapsen stabilisiert. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines Nervennetzes, welches die komplexe, spezifische Leistung des Nervensystems ermöglicht. Welche Mechanismen kontrollieren aber die Ausbildung der unterschiedlichen Neuronenklassen zum richtigen Entwicklungszeitpunkt an der richtigen Position? Die neuronale Identität, die festlegt, zu welcher Neuronenklasse eine Zelle gehört und welche Projektionen später ausgebildet werden, ist bereits in den mitotisch aktiven Vorläuferzellen kodiert. Die Identität der Vorläuferzellen wird durch Signalmoleküle bestimmt, die in unterschiedlicher räumlicher und zeitlicher Verteilung entlang der dorsoventralen (DV) und der anteroposterioren (AP) Achse des Neuralrohrs auf die Vorläuferzellen einwirken. Diese Signale induzieren die Expression spezifischer Faktoren in den multipotenten Vorläuferzellen. Studien haben gezeigt, dass es sich bei einem Großteil dieser Faktoren um Transkriptionsfaktoren handelt, die gewebe- und/oder zellspezifisch exprimiert werden. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die regulierend auf die Transkription von Genen einwirken. Dies geschieht durch Bindung an die DNS und durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Faktoren, die ihre Affinität und Spezifität zu DNS Abschnitten positiv oder negativ beeinflussen. Für die spezifische Bindung an die DNS sind charakteristische Struktur motive der Proteine verantwortlich, die zu den im Verlauf der Evolution am stärksten konservierten Proteinmotiven zählen (Nelson, 1995). Nach diesen

Motiven lassen sich Transkriptionsfaktoren in verschiedene Familien einteilen. Zu den am häufigsten vorkommenden DNS-Bindungsproteinen gehören die Zinkfinger Proteine, die Leuzin-Zipper Proteine, die basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine und die Homeodomänen Proteine. Da der von mir untersuchte Transkriptionsfaktor Nkx6.1 zur Familie der Homeodomänen Transkriptionsfaktoren gehört, werde ich im Folgenden näher auf diese Protein Familie eingehen.

### 1.1.1 Homeodomänen Proteine

Die Entdeckung der Homeodomänen Proteine geht auf Mutantanalysen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurück (McGinnis, 1984a; McGinnis, 1984b; Nüsslein-Volhard, 1980; Scott, 1984). Dabei wurden mutante Larven beobachtet, bei denen die Segmentidentität verloren gegangen war, d.h., dass bei diesen Fliegen ein Körpersegment teilweise oder komplett in ein anderes umgewandelt war. Die anschließende Identifizierung und Charakterisierung der Gene, deren Mutationen für diesen Phänotyp verantwortlich waren, ergab, dass eine Mehrzahl der Gene für Transkriptionsfaktoren kodierte, die ein hoch konserviertes Sequenzmotiv, die Homeobox (Scott, 1992; Scott et al., 1989), aufwiesen. Die Homeobox kodiert für eine Protein-Domäne von 60 Aminosäuren, die für die sequenzspezifische Bindung an die DNS verantwortlich ist. Die Homeodomäne weist ein Helix-Turn-Helix Motiv auf, das sich aus drei  $\alpha$ -Helices zusammensetzt, die durch Polypeptidschleifen voneinander getrennt sind. Bei der Bindung an die DNS wird die dritte Helix der Homeodomäne in die große Furche der DNS eingeführt, während die aminoternale Region mit der darauffolgenden kleinen Furche in Kontakt tritt.

Bei der Fruchtfliege sorgen Homeoboxgene für die unterschiedliche Ausprägung der einzelnen Körpersegmente, aus denen Kopf-, Thorax und Abdominalbereich hervorgehen. Mittlerweile sind Homeoboxgene bei allen Tierspezies (Gehring, 1987; Gehring, 1998; Gehring, 1994b; Gehring, 1994a), sowie bei Pflanzen (Ruberti, 1991; Vollbrecht, 1991) charakterisiert worden. Heute sind mehrere hundert verschiedene Homeoboxgene im Genom höherer Vertebraten bekannt (Biben et al., 1997; Lumsden and Krumlauf, 1996). Auch hier spielen sie häufig eine Rolle bei der Ausbildung verschiedener Körpersegmente. Die Segmentierung der Wirbeltiere ist z.B. noch an Strukturen, wie den Somiten oder dem Rhombencephalons während der frühen Embryonalentwicklung sichtbar. Man kann Transkriptionsfaktoren als Steuerungselemente für die Zellentwicklung betrachten, die dafür

sorgen, dass die Zellen in den frühen Entwicklungsstadien bestimmte Entwicklungswege einschlagen.

### 1.1.2 Struktur der Nkx6 Homeodomänen Transkriptionsfaktoren

Die Gene Nkx6.1 und Nkx6.2 gehören zur Nkx Homeobox-Familie, die mit den NK-Genen (Mellerick, 1995) der Fruchtfliege verwandt ist. Beide Nkx6 Proteine weisen als typisches Strukturmerkmal eine DNS-bindende Homeodomäne auf (Abb.1.1). Des Weiteren besitzen diese Transkriptionsfaktoren ein NK-Dekapeptid, das ihnen ermöglicht, mit anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren. Studien haben gezeigt, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 über ihre NK-Domäne an das Korepressor Protein Groucho binden. Diese Bindung vermittelt die Repressoraktivität der Nkx6 Proteine (Muhr et al., 2001).



**Abb.1-1: Struktur der Nkx6 Proteine.** Die Transkriptionsfaktoren Nkx6.1 und Nkx6.2 weisen eine DNS-bindende Homeodomäne (HD) und eine NK-Domäne (NK) auf. Die NK-Domäne ist ein hoch konserviertes Dekapeptid, das Repression vermittelt. Die Bindungsinterferenzdomäne (BID) im carboxyterminalen Bereich hemmt die Bindung des Proteins an die DNS. Nur bei Nkx6.1 befindet sich zwischen der NK-Domäne und der HD ein Serin (S)/Alanin (A) reicher Bereich.

Des Weiteren besitzen die Nkx6 Proteine eine Bindungsinterferenzdomäne (BID) im carboxyterminalen Bereich, welche die Bindung des Proteins an die DNS hemmt. Ein Serin/Alanin reicher Abschnitt, der nur im Nkx6.1 Protein vorliegt, ist vermutlich ebenfalls für Protein-Protein Interaktionen notwendig (Awatramani et al., 2000; Rudnick et al., 1994).

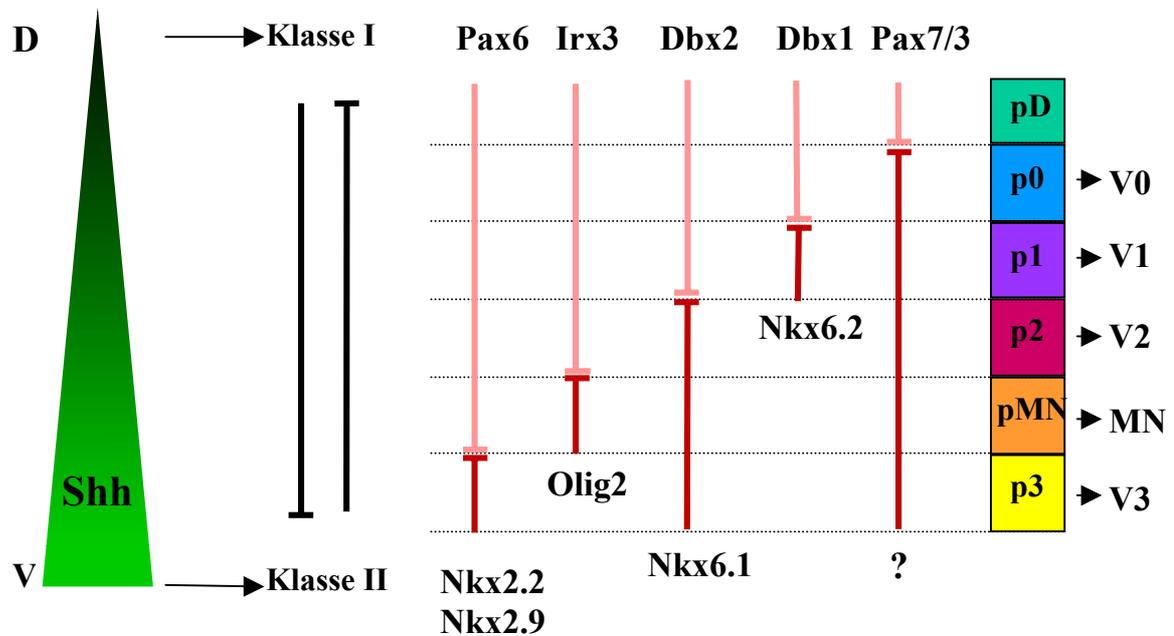
Bei Säugetieren wurde Nkx6.1 zuerst in den endokrinen Zellen des Pankreas nachgewiesen (Jensen et al., 1996; Rudnick et al., 1994). Im ZNS wurde Nkx6.1 zuerst beim Huhn, nachfolgend auch bei der Maus identifiziert (Qiu, 1998). Bei der Durchmusterung einer Maus Rückenmarks cDNS Bibliothek mit einer Nkx6.1 Sonde des Huhns wurde neben dem murinen Nkx6.1 auch der Homeodomänentranskriptionsfaktor Gtx (glia and testis-specific homeobox gene) nachgewiesen, der auf Grund der starken Homologie zu Nkx6.1 auch unter

dem Namen Nkx6.2 bekannt ist (Qiu, 1998). Gtx/Nkx6.2 wurde bereits vor seinem Nachweis im Rückenmark der Maus aus Gliazellen und Hodenkeimzellen adulter Mäuse kloniert (Komuro, 1993). Expressionsstudien der Nkx6 Gene im murinen Neuralrohr haben gezeigt, dass beide Transkriptionsfaktoren in ventralen Vorläuferzellen des Rückenmarks exprimiert werden (Cai et al., 1999). Durch Funktionsanalysen der Nkx6 Faktoren konnte eine Bedeutung dieser Faktoren für die Festlegung der neuronalen Identität verschiedener Populationen von Vorläuferzellen im Neuralrohr aufgedeckt werden (Vallstedt, 2001; Qiu, 1998; Briscoe, 2000; Sander, 2000). Im folgenden Abschnitt werde ich diese Funktionen am Beispiel des Rückenmarks genauer erläutern und anschließend das Modell mit dem im Hirnstamm vergleichen.

### 1.1.3 Bestimmung der neuronalen Identität durch dorsoventrale Musterbildung

Die Position einer Vorläuferzelle entlang der DV-Achse des Neuralrohrs entscheidet unter anderem darüber, ob die Zelle die Identität eines Motoneurons oder eines Interneurons annimmt. Die Spezifizierung ventraler, neuronaler Vorläuferzellen entlang der DV-Achse ist abhängig von der Expression des Glykoproteins Sonic hedgehog (Shh), das von der Bodenplatte und der ventral der Bodenplatte liegenden *Chorda dorsalis* sezerniert wird (Jessel, 2000; Lee, 1999). Dadurch entsteht entlang der DV-Achse des Neuralrohrs ein Shh Konzentrationsgradient, der von ventral nach dorsal abnimmt (Abb.1.2). Die DV Position einer neuronalen Vorläuferzelle legt daher fest, welcher Shh Konzentration die Zelle ausgesetzt ist. Shh induziert in Vorläuferzellen konzentrationsabhängig die Expression zellspezifischer Transkriptionsfaktoren (Briscoe and Ericson, 2001; Lee, 2001). Experimente am Huhn, bei denen Stücke der *Chorda dorsalis* in die dorsale Mittellinie des Rückenmarks transplantiert wurden, zeigten, dass von der *Chorda dorsalis* sezerniertes Shh eine ektopische Expression von Nkx6.1 im dorsalen Neuralrohr induziert (Qiu, 1998). Ähnliche Versuche, bei denen Neuralplatten Explantate des Huhns unterschiedlichen Shh Konzentrationen ausgesetzt wurden, zeigten, dass auch die Expression der Homeodomänen Proteine Nkx2.2, Nkx2.9, Nkx6.2 (Lee, 2001) und des basischen Helix loop Helix (bHLH) Protein Olig2 durch Shh induziert wird, während Shh die Expression der Homeodomänen Proteine Dbx1, Dbx2, Irx3 und Pax6 reprimiert. Transkriptionsfaktoren, die durch Shh aktiviert werden, werden als Klasse II Proteine bezeichnet. Diejenigen, die durch Shh reprimiert werden, zählen zu den Klasse I Proteinen (Briscoe, 2000; Abb.1.2). Dadurch, dass die Vorläuferzellen, abhängig von

ihrer räumlichen Entfernung von der Bodenplatte bzw. der *Chorda dorsalis*, verschiedenen Shh Konzentrationen ausgesetzt sind, entstehen entlang der DV-Achse distinkte Expressionsdomänen verschiedener Transkriptionsfaktoren (Abb.1.2). Vorläuferzellen, die eine bestimmte Kombination von Transkriptionsfaktoren exprimieren, werden als Vorläuferzellen Domäne zusammengefasst.



**Abbildung 1-2: Die Kombination von Transkriptionsfaktoren bestimmt die Zellidentität in spezifischen Vorläuferzellen Domänen.** Der dorsoventrale (DV) Shh Gradient induziert die Expression von Klasse II Transkriptionsfaktoren bzw. reprimiert Klasse I Transkriptionsfaktoren. Repressive Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren etablieren die spezifischen Vorläuferzellen Domänen (pD – p3). Aus diese Domänen gehen im weiteren Verlauf der Entwicklung Interneurone (V0 – V3) und Motoneurone (MN) hervor. pD, Vorläuferzellen Domäne dorsaler Neuronenpopulationen.

Während der weiteren Entwicklung des Neuralrohrs werden die ventralen Domänen durch repressive Interaktionen zwischen Klasse I und Klasse II Proteinen zusätzlich stabilisiert (Briscoe, 2000) (Abb1.2). Es bilden sich Grenzen, durch die sich die Ventrikularzone, mit ihren mitotisch aktiven Vorläuferzellen, in fünf verschiedene Domänen einteilen lässt. Von dorsal nach ventral sind dies die p0, p1, p2, pMN (Motoneuron) und die p3 Domäne (Abb.1.2). Aus der p0 – p3 Domäne entwickeln sich V0 –V3 Interneurone, während Motoneurone aus der pMN Domäne hervorgehen. Somit bestimmt der Shh Gradient letztendlich, durch die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren, in welchen

neuronalen Subtyp eine Vorläuferzelle differenziert (Lu, 2002; Novitch, 2001a; Zhou, 2002). Die pMN Domäne wird durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Pax6 (Ericson et al., 1997; Pierani et al., 2001), Nkx6.1 (Sander et al., 2000; Vallstedt, 2001) und Olig2 (Lu, 2002; Marquardt, 2001; Zhou, 2002) spezifiziert (Abb.1.2). Zusätzlich zur pMN Domäne wird Nkx6.1 auch in der p3 und p2 Domäne exprimiert. Die dorsale Expression von Nkx6.1 grenzt an die p1 Domäne, die durch die Expression des Transkriptionsfaktors Dbx2 charakterisiert ist. (Briscoe, 2000; Vallstedt, 2001). Experimente am Hühnerembryo, bei denen Nkx6.1 ektopisch im dorsalen Neuralrohr exprimiert wurde, zeigten, dass Nkx6.1 in der Lage ist, dorsalen Vorläuferzellen (pD) eine pMN Identität zu verleihen und die Bildung ektopischer Motoneurone zu induzieren, zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Irx3 induziert Nkx6.1 die Entstehung ektopischer V2 Interneurone (Briscoe, 2000). Diese Experimente zeigen, dass Nkx6.1 die Differenzierung von Motoneuronen und V2 Interneuronen abhängig von einer Koexpression mit Irx3 induziert. Diese Hypothese wird weiter durch die Analyse eines „loss-of-function“ Modells für Nkx6.1 unterstützt. Mausmutanten, bei denen durch homologe Rekombination das Nkx6.1 Gen gezielt ausgeschaltet wurde, zeigen eine starke Verringerung der Anzahl an Motoneuronen und V2 Interneuronen im Rückenmark (Briscoe, 2000; Sander, 2000). Bei Nkx6.1 mutanten Embryonen wird durch die fehlende repressive Wirkung von Nkx6.1 der normalerweise dorsal an die Nkx6.1 Domäne angrenzende Transkriptionsfaktor Dbx2 ektopisch in der p2 und pMN Domäne exprimiert. Diese Missspezifizierung der p2/pMN Vorläuferzellen durch Dbx2 führt zur ektopischen Differenzierung von V1 anstelle von V2 Interneuronen und Motoneuronen (Sander et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 für die korrekte Spezifizierung der Vorläuferzellen von Motoneuronen und V2 Interneuronen im Rückenmark verantwortlich ist.

Auch der zu Nkx6.1 homologe Transkriptionsfaktor Nkx6.2 hat die Fähigkeit, ektopisch die Differenzierung von Motoneuronen im dorsalen Rückenmark zu induzieren (Vallstedt, 2001). Dieses Ergebnis erschien zunächst unerwartet, da Nkx6.2 bei wildtyp Embryonen im Rückenmark nicht mit Nkx6.1 koexprimiert ist, sondern dorsal der pMN Domäne zusammen mit Dbx2 in der p1 Domäne exprimiert wird (Abb.1.2). Ähnlich wie bei Dbx2, wird auch die Expression von Nkx6.2 im Rückenmark durch Nkx6.1 reprimiert (Vallstedt, 2001). Die Analyse Nkx6.1 mutanter Mäuse zeigte, dass bei fehlender Repression durch Nkx6.1, sowohl Nkx6.2 als auch Dbx2 ektopisch in der p2 und pMN Domäne exprimiert werden. Diese ektopische Expression von Nkx6.2 in der Nkx6.1 Domäne führt zu einer partiellen funktionellen Kompensation von Nkx6.1 durch Nkx6.2. Wie bereits weiter oben erwähnt, werden bei Nkx6.1 mutanten Mäusen im Rückenmark trotz fehlender Nkx6.1 Funktion einige

wenige Motoneurone ausgebildet. Bei Nkx6.1/Nkx6.2 doppelt mutanten Mäusen entstehen im Rückenmark hingegen keine Motoneurone (Vallstedt, 2001). Nkx6.2 scheint jedoch nicht ausreichend für eine komplette Kompensation, da bei Nkx6.1 mutanten Mäusen trotz der Expression von Nkx6.2 Störungen bei der Entwicklung der Motoneurone und V2 Interneurone nachgewiesen werden können. Die Beobachtungen verdeutlichen, dass die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren in neuronalen Vorläuferzellen die Identität des aus diesen Vorläufern hervorgehenden Neurons bestimmt. Des Weiteren zeigen die hier am Beispiel spinaler Motoneurone beschriebenen Experimente, dass unterschiedliche Vorläuferzellen Domänen durch die gegenseitige Repression identitätsbestimmender Transkriptionsfaktoren aufrecht erhalten werden.

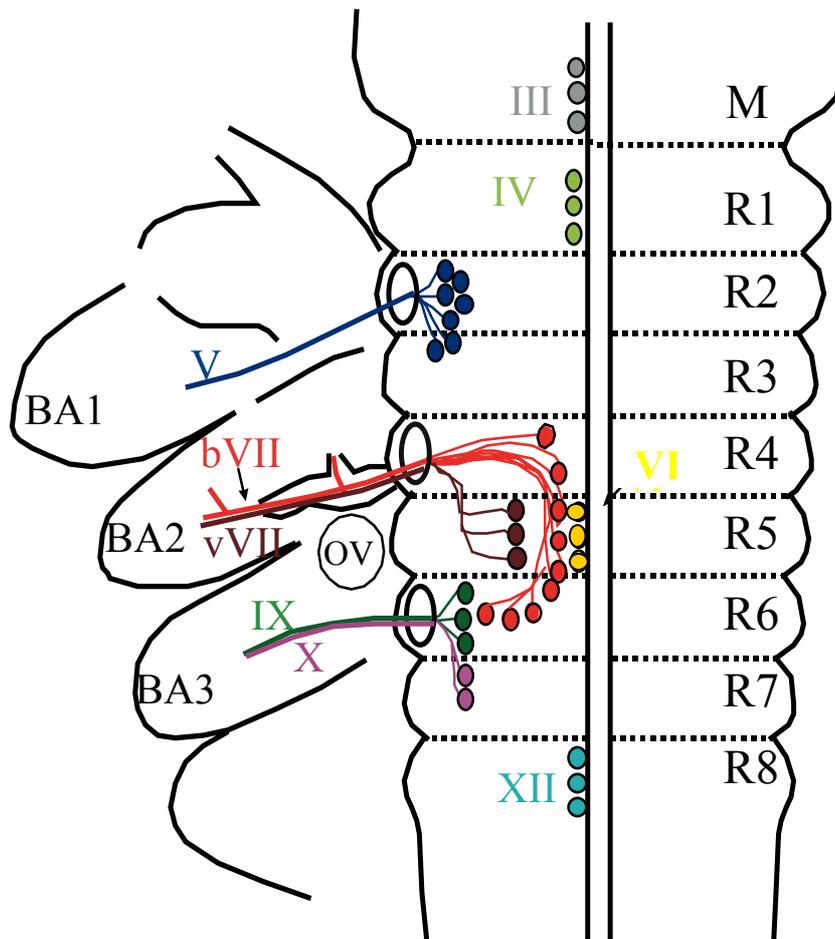
Nkx6.1 wird nicht nur im Rückenmark, sondern auch in den Vorläuferzellen der Motoneuronen im weiter rostral gelegenen Hirnstamm exprimiert (Qiu et al., 1998; Sander et al., 2000). Über die DV Musterbildung ist im Hirnstamm sehr viel weniger bekannt, als im Rückenmark. Einige Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass ähnliche Mechanismen und Moleküle wie im Rückenmark für die Spezifizierung der verschiedenen Neuronenklassen im Hirnstamm verantwortlich sind (Briscoe et al., 1999; Ericson et al., 1997). Auch im Hirnstamm wird die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in den Domänen der Vorläuferzellen durch Shh reguliert, wodurch die Zellen eine spezifische Identität annehmen (Osumi, 1997). Ähnlich wie im Rückenmark, spielen verschiedene Mitglieder der Nkx Gen Familie bei dieser Spezifizierung eine entscheidende Rolle (Briscoe, 1999; Sander, 2000). Während Motoneurone im Rückenmark hauptsächlich somatomotorischen (sm) Ursprungs sind, entwickeln sich aus den Vorläuferzellen im Hirnstamm, abhängig von ihrer dorsoventralen Position, drei verschiedene Klassen von Motoneuronen: somatomotorische, viszeromotorische und branchiomotorische Neurone.

Anders als im Rückenmark, wo aus der ventralen Nkx2.2 exprimierenden p3 Domäne V3 Interneurone entstehen (Abb.1.2), gehen im Hirnstamm aus dieser Domäne viszero- und branchiomotorische (vm/bm) Neurone hervor. Durch repressive Interaktion zwischen Nkx2.2 und Pax6 (Abb. 1.2) wird im Rückenmark die p3/pMN Grenze (Briscoe et al., 2000) und im Hirnstamm die (vm/bm)/sm Grenze etabliert (Osumi, 1997). In Abwesenheit von Pax6 kommt es im Hirnstamm zu einer dorsalen Expansion von Nkx2.2 in die pMN Domäne, wodurch vm/bm Neurone anstatt sm Neurone gebildet werden (Ericson, 1997; Takahashi, 2002). Obwohl bei Nkx2.2 mutanten Mäusen an Stelle der V3 Interneurone im Rückenmark sm Neurone gebildet werden (Briscoe, 1999; Briscoe, 2000), ist die Differenzierung der vm/bm Neurone im Hirnstamm erstaunlicher Weise nicht gestört (Briscoe, 1999). Es wird

angenommen, dass ähnlich wie bei Nkx6.1 und Nkx6.2 eine Redundanz zwischen Nkx2.2 und Nkx2.9, die in vm/bm Vorläuferzellen des Hirnstamms koexprimiert werden, eine Rolle spielen könnte (Briscoe et al., 2000; Briscoe et al., 1999; Pabst et al., 2000). Neuere Untersuchungen legen jedoch die Vermutung nahe, dass im Hirnstamm auch der Homeodomänen Transkriptionsfaktor Phox2b für die Etablierung der vm/bm Domäne verantwortlich ist. Phox2b hat die Fähigkeit, im dorsalen Neuralrohr ektopisch eine vm/bm Zellidentität zu induzieren (Dubreuil, 2002) und bei Phox2b mutanten Mäusen werden keine vm/bm Neurone gebildet (Pattyn, 2000). Weiterhin zeigten „gain-of-function“ Experimente, dass Phox2b die Expression von Pax6 reprimiert (Dubreuil, 2002). Diese Versuche lassen den Schluss zu, dass zur Aufrechterhaltung der vm/bm Domäne im Hirnstamm repressive Interaktionen zwischen Phox2b und Pax6 eine Rolle spielen, während im Rückenmark repressive Interaktionen zwischen Nkx2.2 und Pax6 die p3/pMN Grenze etablieren. Für die Induktion der sm Identität ist dagegen im Hirnstamm, wie auch im Rückenmark, Nkx6.1 verantwortlich (Briscoe et al., 2000; Qiu et al., 1998; Sander et al., 2000). Im Gegensatz zu seiner Rolle bei der Spezifizierung neuronaler Vorläuferzellen ist über die Funktion von Nkx6.1 bei der weiteren Entwicklung postmitotischer Motoneurone nur wenig bekannt. In dieser Arbeit habe ich diese Frage am Beispiel kranialer Motoneurone im Hirnstamm untersucht.

#### **1.1.4 Architektur und Entwicklung des Hirnstamms**

Im Gegensatz zum Rückenmark entwickeln sich im Hirnstamm die kranialen Motoneurone in morphologisch und molekular unterschiedlichen Untereinheiten entlang der AP-Achse. Der Hirnstamm der Vertebraten gliedert sich in drei Abschnitte: Das Mittelhirn (*Mesencephalon*), die Brücke (*Pons*) und das verlängerte Mark (*Medulla oblongata*). Während der frühen Embryonalentwicklung, zwischen Embryonaltag 8.5 (E8.5) und E12.5, lassen sich acht morphologische Untereinheiten, die sogenannten Rhombomere (R), erkennen (Abb.1.3). Daher wird dieser Bereich des sich entwickelnden Hirnstammes auch als *Rhombencephalon* bezeichnet. In jedem Rhombomer entwickeln sich verschiedene Motoneuronenklassen (Abb.1.3). Die Position, die ein Neuron entlang der AP-Achse im Hirnstamm einnimmt, bestimmt, in welchen Hirnnerv es projiziert. Im Hirnstamm lassen sich acht motorische Hirnnerven unterscheiden.



**Abbildung 1-3: Architektur des embryonalen Hirnstamms.** Motoneurone des *Nervus oculomotorius* und des *Nervus trochlearis* werden im Mittelhirn (M) bzw. in R1 gebildet. Die somatomotorischen Neurone des *Nervus abducens* (VI) und des *Nervus hypoglossus* (XII) entstehen in Rhombomer (R) 5 bzw. R8. Ihre Axone verlassen den Hirnstamm ventral. Motoneurone des *Nervus trigeminus* (V) haben ihren Ursprung in R2/R3 und projizieren zur dorsalen Austrittsstelle in R2. Die branchiomotorischen Neurone des *Nervus facialis* (bVII) entstehen in R4 während die viszerale Komponente des *Nervus facialis* (vVII) R5 entspringt. Die Fazialis Neurone projizieren zur dorsalen Austrittsstelle in R4. Motoneurone des *Nervus glossopharyngeus* (IX) und *Nervus vagus* (X) entstehen in R6 und R7 und projizieren dorsal in R6. BA (branchial arch), Kiemenbogen; OV, otic vesicle.

Der am weitesten rostral gelegene Hirnnerv ist der *Nervus oculomotorius* (III), der im *Mesencephalon* gebildet wird. Der III Hirnnerv enthält sowohl sm als auch vm Fasern, die vom multipolaren Kern des *Nervus oculomotorius* bzw. vom kleinzelligen Edinger-Westphal-Kern, *Nucleus oculomotorius accessorius*, stammen. Die restlichen sieben Hirnnerven entwickeln sich alle im ventralen *Rhombencephalon*. Hierzu zählen die drei rein sm Nerven,

der *Nervus trochlearis* (IV), der *Nervus abducens* (VI) und der *Nervus hypoglossus* (XII). Ihre Motoneurone bilden sich während der Embryonalentwicklung in R1, R5 bzw. R8 (Abb.1.3) und die Axone verlassen den Hirnstamm an ventralen Austrittsstellen, um die Skelettmuskulatur zu innervieren. Anders verhalten sich die vm/bm Neurone, die zu dorsalen Austrittsstellen projizieren. Die bm Neurone versorgen die Kiemenbogenmuskulatur, während die vm Neurone sympathische und parasympathische Ganglien innervieren. Nur der *Nervus trigeminus*, dessen Neurone in R2/R3 entstehen und den Hirnstamm an der Nervaustrittsstelle in R2 verlassen, ist ein rein bm Nerv. *Nervus facialis* (VII), *Nervus glossopharyngeus* (IX) und *Nervus vagus* (X) hingegen bestehen aus einer vm und einer bm Komponente. Die bm Neurone des *Nervus facialis* haben ihren Ursprung in R4 und bilden den *Nucleus facialis*. Die Axone treten dorsolateral in R4 aus. Die vm Neurone des *Nervus facialis* stammen hingegen aus R5 und bilden den *Nucleus salivatorius superior*. Seine Fasern schließen sich der Nervaustrittsstelle des *Nervus facialis* in R4 an, verlassen den Hirnstamm aber in einem separat austretenden Nervenbündel, dem *Nervus intermedius*. Die Motoneurone des *Nervus glossopharyngeus* bilden sich in R6, wo die Axone auch den Hirnstamm verlassen. Seine bm Neurone vereinigen sich im kranialen Abschnitt des *Nucleus ambiguus*, während die vm Komponente aus dem *Nucleus salivatorius inferior* stammt. Auch die bm Neurone des *Nervus vagus* (X), die in R7 angesiedelt sind, gehen aus den multipolaren Nervenzellen des *Nucleus ambiguus* hervor, während die vm Komponente dem *Nucleus dorsalis* entspringt. Ihre Axone treten mit dem *Nervus glossopharyngeus* in R6 aus.

### **1.1.5 Bestimmung der Identität kranialer Motoneurone durch anteroposteriore Musterbildung**

Wie bereits erwähnt entscheidet die Position einer Vorläuferzelle im Neuralrohr über die spezifische Identität des Neurons. Anders als im Rückenmark, bestimmt die Position eines Neurons entlang der AP-Achse des Hirnstamms entscheidend die Entwicklung der Motoneurone, beispielsweise in welchen kranialen Nerv das Neuron projiziert. Im Folgenden soll erläutert werden, durch welche Faktoren Neurone Informationen bezüglich ihrer Position entlang der AP-Achse des Hirnstamms erhalten.

Mehrere Untersuchungen sprechen dafür, dass die Musterbildung entlang der AP-Achse durch das Vitamin A Derivat, die Retinsäure, kontrolliert wird. Retinsäure übt im Zellkern Einfluss auf Wachstum und Zelldifferenzierung aus und gilt daher als potentes Morphogen

während der Embryonalentwicklung. Während der Gastrulation wird in der Region des Hensenschen Knotens Retinsäure produziert (Chen, 1992; Hogan, 1992). Man vermutet, dass durch Diffusion der Retinsäure ein Konzentrationsgradient im Mesoderm entsteht, der für die Ausbildung der AP-Körperachse im frühen Embryo von Bedeutung ist (Lumsden, 1996; Shawlot, 1995). So haben Untersuchungen am Hühnerembryo gezeigt, dass die Applikation von exogener Retinsäure zur Ausbildung einer zusätzlichen Körperachse führt (Chen, 1992). Die lokale Musterbildung im Hirnstamm wird durch Retinsäure über direkte Bindung an spezifische Enhancer Elemente (RAREs = retinoic acid response elements) beeinflusst, wodurch die Expression von Homeodomänen Transkriptionsfaktoren der Hox Genfamilie im Neuralrohr kontrolliert wird (Frasch, 1995; Marshall, 1994). Die Hox Transkriptionsfaktoren bestimmen im Hirnstamm die positionsabhängige Identität neuronaler Vorläuferzellen entlang der AP-Achse. Unterschiedliche Hox Gene werden durch unterschiedliche Retinsäure Konzentrationen induziert (Papalopulu, 1991), was zu einem strikt begrenzten Expressionsmuster der Hox Gene im Hirnstamm der Vertebraten führt (Carpenter, 1993; Davenne, 1999; Goddard, 1996; Gavalas, 1997; Rijli, 1998; Studer, 1996; Studer, 1998; Krumlauf, 1994). Gemäß der Hox-Kode-Hypothese ist die Identität eines Rhombomers durch die Kombination der in ihm exprimierten Hox Gene definiert (Guthrie and Lumsden, 1991; Lumsden and Krumlauf, 1996). Mutationen bestimmter Hox Gene führen zum Verlust der korrekten Zellidentität entlang der AP-Achse (Carpenter et al., 1993; Gavalas et al., 1997). So zeigt sich eine gestörte Zellidentität bei *Hoxa2* mutanten Mäusen dadurch, dass die Axone der Motoneurone des *Nervus trigeminus* zu falschen Austrittstellen projizieren (Gavalas, 1997), während bei *Hoxb1* und *Hoxb2* mutanten Mäusen die kaudale Migration der *bm* Neurone des *Nervus facialis* gestört ist (Studer, 1996; Davenne, 1999; Gaufo, 2000; Barrow, 1996; Goddard, 1996; Gavala1999; Jungbluth, 1999).

Untersuchungen verschiedener Hox mutanter Mäuse (Devanne, 1999; Gaufo, 2000) haben zudem gezeigt, dass DV und AP Signale in neuronalen Vorläuferzellen des Hirnstamms integriert werden. So ist z.B. bei *Hoxb1* mutanten Mäusen auch die Expression DV Identitätsmarker, wie *Nkx2.2*, *Pax6* und *Phox2b*, in R4 gestört (Gaufo, 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Determinanten der AP Musterbildung die Expression der an der DV Musterbildung beteiligten Faktoren beeinflusst (Gaufo, 2000). Es ist zur Zeit jedoch noch unklar, wie neuronale Vorläuferzellen die positionelle Information entlang der AP- und DV-Achse integrieren. Auf Grund seiner AP Segmentierung ist der Hirnstamm ein geeignetes Modell, um diese Fragen zu untersuchen.

## 1.2 Neuronale Migration

Die Kombination von positionsbestimmenden Determinanten legt die Identität eines Neurons fest und bestimmt dessen weiteren Entwicklungsweg. Dazu zählen unter anderem die Ausbildung von Projektionen, sowie die Wanderungen postmitotischer im Neurone im Hirnstamm. Nach ihrer Differenzierung verlassen die Neurone die Ventrikularzone und migrieren zu den Positionen, die sie im reifen Gehirn einnehmen. Ist die Zellidentität eines Neurons gestört, kann das dazu führen, dass es eine falsche Position im Gehirn einnimmt. Solche Entwicklungsfehler sind häufig die Ursache für neuronale Defekte (Pearlman, 1998). So resultieren einige beim Menschen beobachtete Defekte, wie die Lissencephalie, unmittelbar aus Migrationsdefekten (Morris, 2000; Norman, 1995). Während der Entwicklung des ZNS unterscheidet man zwischen zwei Migrationsformen: der radialen und der tangentialen Migration (Hatten, 1999).

### 1.2.1 Radiale und tangential Migration von Neuronen

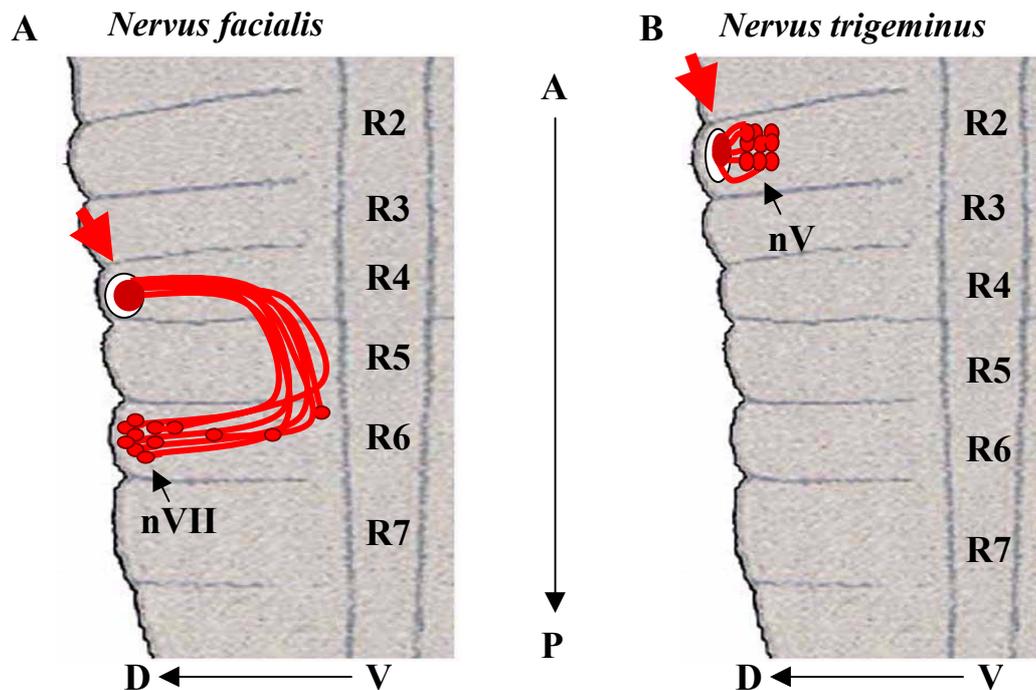
Nicht nur im Hirnstamm, sondern auch in anderen Bereichen des ZNS sind neuronale Migrationsprozesse beobachtet und analysiert worden (Hatten, 1998; Hatten, 1990). Die Mechanismen der radialen Migration sind intensiv während der Entwicklung des *Telencephalons* und des *Cerebellums* untersucht worden (Hatten, 1990; Parnavelas, 2000) und sollen im Folgenden an Hand dieser Beispiele erläutert werden. Grundsätzlich bedeutet radiale Migration, dass Neurone orthogonal zur Oberfläche des Gehirns, entlang radialer Gliazellen, aus der inneren Ventrikularzone in die äußeren Hirnschichten wandern (Misson, 1991). Der radiale Wanderungsprozess ist z.B. für die Ausbildung der Großhirnrinde des *Telencephalons* bzw. der Kleinhirnrinde des *Cerebellums* verantwortlich (Casanova, 2002; Mountcastle, 1997; Nadarajah, 2002). Neuste Studien deuten darauf hin, dass man zwei Formen der radialen Migration unterscheiden kann: Translokation und Lokomotion (Nadarajah, 2002). Bei der Lokomotion handelt es sich um die klassische gliaabhängige Migration, wobei die gesamte Zelle, d.h. Soma, Kern und Fortsätze, entlang radialer Gliafasern wandern (Rakic, 1972). Bei der Translokation sendet das Neuron hingegen erst einen gliaunabhängigen, radialen Fortsatz aus und gibt die Richtung an, in die dann Soma samt Kern im Fortsatz selbst wandern.

Im Gegensatz zur radialen Migration ist die tangential Migration nicht abhängig von radialen Gliafasern. Bei der tangentialen Migration wandern die Neurone parallel zur Oberfläche des Gehirns entlang von Axonen, Neuronen oder Astrozyten (Alvarez-Buylla, 2002; Rakic, 1990). Beispiele tangential migrierender Neurone finden sich in den meisten Regionen des ZNS, so z.B. im Rückenmark (Leber, 1990; Phelps 1996), im *Rhombencephalon* (Marin, 1995; Phelps, 1996), im *Cerebellum* (Ryder, 1994), im *Mesencephalon* (Matinez, 1992) und im *Diencephalon* (Golden, 1997). Auch bei der Wanderung kortikaler Interneurone vom ventralen *Telencephalon* zur Hirnrinde (Anderson, 1997; Marin, 1995; Parnavelas, 2000; Tan, 1998) handelt es sich um tangential migrierende Zellen.

### 1.2.2 Migration kranialer, branchiomotorischer Neurone

Zur Entwicklung der bm Neurone des Hirnstamms gehören ausgiebige Wanderungsprozesse. Die Neurone werden in spezifischen Rhombomeren gebildet und wandern von ihrem Ursprungsort, entweder im selben Rhombomer oder, wie im Falle der Motoneuronen des *Nervus facialis* im murinen Hirnstamm, sogar über mehrere Rhombomere entlang der rostro-kaudalen Achse. Die Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* findet im Mausembryo zwischen E10.75 und E14 statt (Abb.1.4 A). Die Neurone senden nach ihrer Differenzierung zuerst Axone zu der dorsalen Nervaustrittsstelle in R4. Dieser Prozess ereignet sich noch bevor die Somata zu wandern beginnen. Anschließend überqueren die ersten Neurone die R4/R5 Grenze und migrieren kaudal entlang der Bodenplatte durch R5 in R6 hinein. In R6 wandern die Neurone dorsolateral und führen letztendlich noch eine radiale Bewegung aus, um den *Nucleus facialis* nahe der Pia zu bilden. Während die ersten Neurone ihren endgültigen Bestimmungsort in R6 am E12.5 erreichen, kreuzen später differenzierte Neurone zu diesem Zeitpunkt immer noch die R4/R5 Grenze (Abb.1.4 A). Somit entsteht ein Strom von migrierenden Neuronen von R4 in R6. Die Neurone ziehen zu diesem Zeitpunkt einen Bogen um den *Nucleus abducens* in R5 und bilden das sogenannte innere Fazialisknie (*Genu internum Nucleus facialis*). Am E14 haben alle bm Neurone des *Nervus facialis* ihren Bestimmungsort nahe der Pia erreicht (Altman, 19982; Ashwell, 1983; Auclair, 1996; Fritsch, 1993). An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der kaudalen Wanderung von R4 in R6 um einen tangentialen Migrationsprozess handelt. Die bm Neurone des *Nervus trigeminus* haben ihren Ursprung ventral in R2. Ihre Axone projizieren zuerst zum dorsalen Austrittspunkt in R2/R3. Die Neurone des *Nervus trigeminus* wandern

dorsolateral entlang ihres Axons, welches sich dementsprechend immer weiter von ventral nach dorsal verkürzt. Am E12.5 haben die Neurone ihren Bestimmungsort nahe der dorsalen Austrittsstelle in R2/R3 erreicht und bilden dort den *Nucleus trigeminus* (abb.1.4 B). Auf Grund dieser intensiven Wanderungsprozesse eignen sich kraniale, branchiomotorische Neurone hervorragend, um die Mechanismen der neuronale Migration zu untersuchen und Faktoren zu identifizieren, die an ihrer Regulation beteiligt sind.



**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Migration branchiomotorischer (bm) Neurone des *Nervus facialis* und des *Nervus trigeminus*.** (A) Bm Neurone des *Nervus facialis* entstehen ventral (V) in Rhombomer (R) 4. Sie wandern kaudal entlang der Bodenplatte in R6, wo sie dorsolateral migrieren. Nach einer letzten radialen Bewegung bilden sie den dorsal gelegenen *Nucleus facialis* (nVII). (B) Bm Neurone des *Nervus trigeminus* haben ihren Ursprung ventral in R2. Die Kerne wandern dorsolateral, entlang ihrer Axone in Richtung ihrer dorsal gelegenen Nervaustrittsstelle (roter Pfeil) und bilden hier den *Nucleus trigeminus* (nV). Die Axone beider Nerven verlassen den Hirnstamm dorsal (D) in R2 bzw. R4 (roter Pfeil). A, anterior; P, posterior.

### 1.2.3 Mechanismen der neuronalen Migration

Trotz großer Fortschritte, die zur Aufklärung der Mechanismen der neuronalen Migration geführt haben, bleiben doch viele fundamentale Fragen offen. Woher "weiß" beispielsweise ein Neuron, in welche Richtung es migrieren soll und wie "erkennt" es das Ende des Weges? Ein möglicher Mechanismus wäre, dass die Migration einem zellintrinsicem Programm unterliegt, das nach seinem Start automatisch abläuft und die Zelle so zum Zielort leitet. Andererseits könnte das Neuron durch äußere Signale entlang seines Weges geleitet werden und wäre somit abhängig von Informationen aus der Umgebung (Mason, 2001; Yee, 1999). Verschiedene Studien unterstützen die zweite Hypothese und die experimentiellen Hinweise, sollen hier am Beispiel der bm Neurone des *Nervus facialis* dargestellt werden. So haben beispielsweise von M. Studer durchgeführte Transplantationsexperimente am Huhn gezeigt, dass spezifische Signale aus R5 und R6 die tangentielle Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* aus R4 in R5 induziert (Studer, 2001). Anders als bei der Maus, wandern die bm Neurone des *Nervus facialis* beim Huhn nicht kaudal in R5, sondern bleiben in R4. Nach Austausch der R5/R6 Region des Huhns mit der R5/R6 Region der Maus konnte eine ektopische Wanderung der bm Neurone des Huhns aus R4 in R5 induziert werden. Auch die Untersuchung Krox20 (Swiatek, 1993; Schneider-Maunoury, 1993; Jacquin, 1996) bzw. Kreisler (Cordes, 1994; Manzanare, 1999; McKay, 1994) mutanter Mäuse sprechen gegen ein intrinsisches Programm und weisen darauf hin, dass ein spezifisches Signal aus R6 die dorsolaterale Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* induziert. Diesen Mausmutanten fehlt R5, so dass R6 direkt an R4 anschließt. Die bm Neurone des *Nervus facialis* scheinen das Fehlen von R5 jedoch registrieren zu können und wandern korrekter Weise im anterior positionierten R6 dorsolateral, anstatt ein weiteres Rhombomer zu durchqueren.

Die das Neuron umgebenden Signale werden von ihm im Allgemeinen durch spezifische Zelloberflächenmoleküle erkannt und über Signaltransduktion in den Zellkern weitergeleitet. Um also die Signale korrekt interpretieren zu können, muss das Neuron eine entsprechende Kombination an Zelloberflächenmolekülen exprimieren. Der bHLH Transkriptionsfaktor *Ebfl*, der in den bm Neuronen des *Nervus facialis* während ihrer gesamten Migration exprimiert ist, beeinflusst etwa die transiente, rhombomerspezifische Expression verschiedener Zelloberflächenmoleküle (Garel, 2000). Bei *Ebfl* mutanten Mäusen ist ein Migrationsdefekt der bm Neurone des *Nervus facialis* mit der aberranten Expression einer Kombination von Zelloberflächenmolekülen in R5 assoziiert.

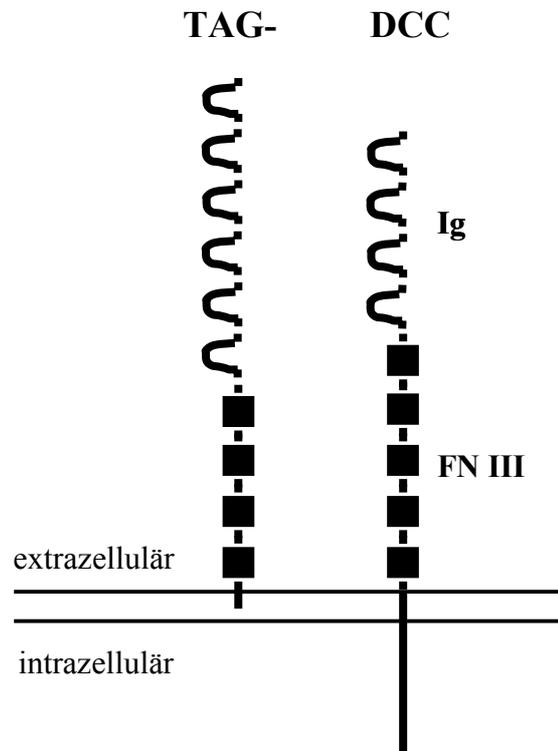
### 1.2.4 Molekulare Grundlagen der neuronalen Migration

Bei der Vielzahl und Komplexität der neuronalen Wanderungen, die im ZNS stattfinden, ist es nicht erstaunlich, dass eine Großzahl von Molekülen an diesen Prozessen beteiligt sind, die entweder als Signalmolekül oder als Rezeptor die Migration der Neurone beeinflussen. Moleküle, die für die Wegfindung des Neurons verantwortlich sind, können entweder membrangebunden oder löslich vorliegen. Obwohl sie alle unterschiedliche Strukturen aufweisen, unterliegt die Wirkung dieser Moleküle doch einem grundsätzlichen Prinzip. Membrangebundene Moleküle, die die Funktion eines Rezeptors haben, verarbeiten Signale, die entweder durch Chemorepulsion bzw. -attraktion über weite Distanzen hinweg („long-range cues“) oder durch Kontaktrepulsion bzw. -attraktion vor Ort („short-range cues“) wirken. Zu den löslichen Molekülen gehören die Laminine, die zu den extrazellulären Matrix Proteinen gehören, die Semaphorine, die löslich aber auch membrangebunden vorkommen und die Netrine. Zu den membrangebundenen Molekülen zählen die Integrine, die mit den Lamininen interagieren und die Zelladhäsionsmoleküle Neuropilin und Plexin, welche an Semaphorine binden. Die löslichen Netrine binden membrangebundene Rezeptoren, die zur Superfamilie der Immunoglobuline gehören. Weiterhin sind auch die Zelladhäsionsmoleküle der Cadherin Superfamilie sowie Eph Kinasen und ihre Liganden, die Ephrine, am Wegfindungsprozess beteiligt. Im Folgenden werde ich auf drei Molekülklassen eingehen, deren Regulation in den Neuronen des Hirnstamms ich während meiner Doktorarbeit genauer untersucht habe.

#### 1.2.4.1 TAG-1

Das Zelladhäsionsmolekül TAG-1 gehört zur Klasse der Immunoglobulin Superfamilie (Dodd, 1988), von der bereits mehr als hundert Moleküle im ZNS identifiziert worden sind (Abb.1.5). Diese Molekülklasse ist durch extrazelluläre, sich wiederholende Proteindomänen gekennzeichnet, wodurch die Moleküle homophile oder heterophile Bindungen mit anderen Proteinen eingehen können. Diese Struktureinheiten sind denen der Immunoglobuline ähnlich, wodurch der Name Immunoglobulin Superfamilie zustande kommt. Für TAG-1 konnte bisher sowohl eine Funktion bei der Axonwegfindung (Buttiglione, 1998; Wolfer, 1998) als auch bei der neuronalen Migration nachgewiesen werden (Garel, 2000).

## Immunoglobulin Superfamilie

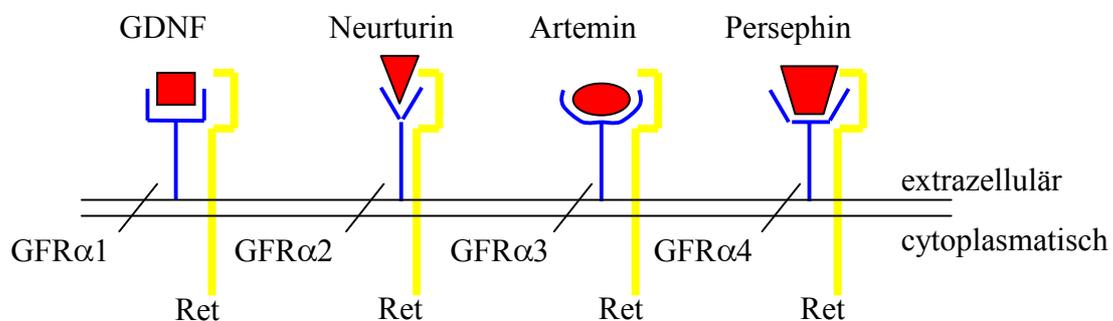


**Abbildung 1-5: Struktur der Adhäsionsmoleküle TAG-1 und DCC.** Die Mitglieder der Immunoglobulin Superfamilie haben Immunoglobulin-ähnliche Segmente (Ig) und eine Fibronectin Typ III Domäne (FN III) in der extrazellulären Domäne, deren Anzahl jedoch variiert. Die Rezeptoren haben, wie im Falle von DCC, auch intrazelluläre Domänen.

### 1.2.4.2 Ret

Neurotrophe Faktoren sind essentiell für die normale Entwicklung verschiedener Neuronenklassen und können die Wegfindung von Neuronen während ihrer Migration steuern (Enomoto, 2001; Moore, 1998; Rosenthal, 1999). Sie lassen sich in sechs Klassen einteilen. Zur sogenannten TGF $\beta$  Familie (Transforming growth factor  $\beta$  class) zählt beispielsweise der Glia Derived Neurotrophic Factor (GDNF), Neurturin (NRTN), Artemin (ARTN) und Persephin (PSPN) (Baloh, 1998; Kotzbauer, 1996; Lin, 1993; Mildbrandt, 1998). Diese Faktoren übertragen Signale, indem sie an einen Rezeptorkomplex binden und ihn somit

aktivieren (Abb.1.5). Der Rezeptorkomplex besteht aus der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) Untereinheit Ret und einem Glycosylphosphatidylinositol gekoppelten Zelloberflächenmolekül, dem GDNF Family Receptor  $\alpha$  (GFR $\alpha$ ). Bindung eines Liganden an GFR $\alpha$  führt zur Interaktion zwischen GFR $\alpha$  und der Ret-RTK und vermittelt so ihre Aktivierung (Jing, 1996; Treanor, 1996). Es gibt vier GFR $\alpha$  Familienmitglieder, GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 3 und GFR $\alpha$ 4, die alle spezifisch einen der vier Liganden (GDNF, NRTN, ARTN, PSPN) binden (Abb.1.6). Daher führt die Inaktivierung von Ret in der Maus zu einem kompletten Signalübertragungsstopp, während die Abwesenheit einer spezifischen extrazellulären GFR $\alpha$  Untereinheit nur die Signalkaskade eines Liganden blockiert. Ret mutanten Mäusen fehlt z.B. das komplette superiore, zervikale, sympathische Ganglion (SCG) (Durbec, 1996), während das Fehlen der GFR $\alpha$ 3 Untereinheit nur zu einer 30%igen Minderung des SCG führt (Nishino, 1999). Ret Expression konnte in verschiedenen migrierenden Zellpopulationen nachgewiesen werden (Pachnis, 1993; Durbec, 1996; Enomoto, 2000) und wird auch in den branchiomotorischen Neuronen des *Nervus facialis* während ihrer Wanderung exprimiert (Garel, 2000).



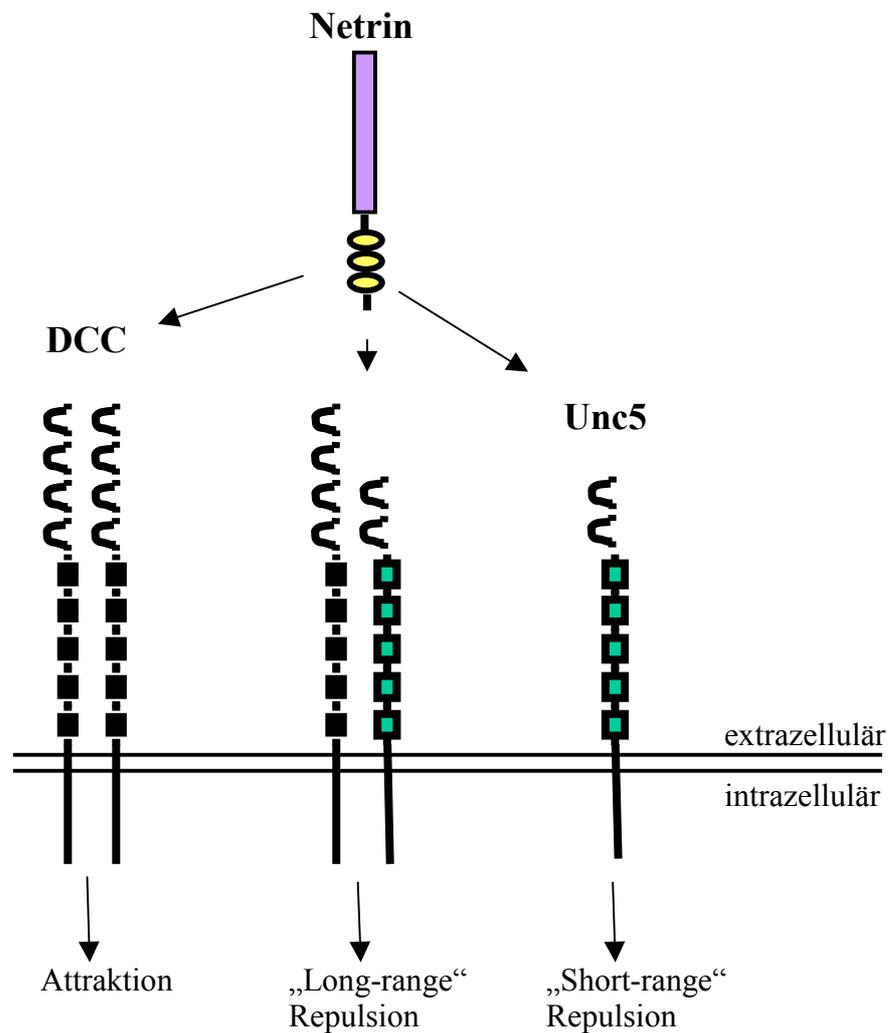
**Abbildung 1-6: Neurotrophe Faktoren.** GDNF (glia derived neurotrophic factor), Neurturin, Artemin und Persephin übertragen Signale über die gleiche intrazelluläre Rezeptor-Tyrosin-Kinase Untereinheit Ret. Jede extrazelluläre Domäne GFR $\alpha$  bindet einen bestimmten Liganden.

### 1.2.4.3 Netrin-1 und Netrin Rezeptoren

Abschließend sollen die Netrin Rezeptoren erwähnt werden, die ebenfalls zur Immunoglobulin Superfamilie gehören (Abb.1.6). Diese lassen sich in zwei Familien einteilen, die DCC (deleted in colateral cancer) (Keino-Masu, 1996) und die Unc5-Familie, die nach dem zuerst bei *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) untersuchten Rezeptorprotein Unc5 benannt wurde (Leung-Hagesteijn, 1992). Bei Vertebraten gibt es vier Netrin-bindende Unc5 Homologe, Unc5h1, Unc5h2, Unc5h3 und Unc5h4 (Engelkamp, 2002; Ackerman, 1997; Leonardo, 1997), wobei nur die ersten drei während der Entwicklung des ZNS exprimiert werden. Familienmitglieder der DCC-Familie sind DCC und Neogenin (Gad, 1997; Keeling, 1997). Die Netrine gehören zur Familie sezernierter Proteine, welche sowohl die Axonwegfindung als auch die neuronale Migration beeinflussen (Dickson, 2002b; Livesey, 1999).

Das erste Netrin, UNC-6, wurde bei *C. elegans* identifiziert, wo es für das Wachstum der Axone entlang der DV-Körperachse verantwortlich ist (Hedgecock, 1990; Ishii, 1992; Wadsworth, 1996). Bei Vertebraten sind drei Homologe bekannt, Netrin-1, Netrin-2 und Netrin-3 (Kennedy, 1994; Puschel, 1999; Seaman, 2001; Serafini, 1994). Während der Entwicklung des ZNS der Maus wird Netrin-1 von der Bodenplatte des Neuralrohrs sezerniert. Über die Rezeptoren der DCC-Familie wirkt Netrin-1 chemoattraktiv, so dass sich die Axone oder Neurone auf den Netrin-1 Gradienten zu bewegen (Kennedy, 1994). Weiterhin werden in der Maus über Netrin-1/DCC Interaktionen auch Neurone durch das Vorderhirn in den *Bulbus olfactorius* gelenkt (Astic, 2002; Murase, 2002). Die Interaktion zwischen Netrin-1 und einem Unc5h Rezeptor bewirkt im Gegensatz zu DCC eine repulsive Reaktion (Dickson, 2002). Das Fehlen von Unc5h3 in Mausmutanten führt dazu, dass Purkinje Vorläuferzellen auf Grund der fehlenden Interaktion zwischen Unc5h3 und Netrin-1 fälschlicherweise über die rostrale Grenze des *Cerebellums* ins Mittelhirn wandern (Ackerman, 1997; Przyborski, 1998).

Untersuchungen der Fruchtfliege haben gezeigt, dass DCC und Unc5 Rezeptoren interagieren können. Dadurch kann eine chemoattraktive Antwort über DCC, in eine chemorepulsive Antwort transformiert werden (Hong, 1999). Weitere Experimente weisen darauf hin, dass die Expression von Unc5 allein in einer „short range“ Repulsion resultiert, während die Koexpression von Unc5 und DCC eine „long-range“ Repulsion bewirkt (Keleman, 2001) (Abb.1.7).



**Abbildung 1-7: Netrin wirkt über die Rezeptormoleküle DCC und Unc5 chemoattraktiv bzw. chemorepulsiv.** Um eine Attraktion des Neurons zu gewährleisten, erfolgt eine Dimerisierung der DCC Moleküle. Interaktion eines DCC und Unc5 Rezeptors führt zu einer „long range“ Repulsion, während Unc5 allein zu einer „short range“ Repulsion führt.

### 1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Funktion des Homeodomänen Transkriptionsfaktors Nkx6.1 während der embryonalen Entwicklung des Hirnstamms untersucht werden. Wie in der Einleitung beschrieben, konnten Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Funktion als identitätsbestimmende, zellintrinsische Determinanten in neuronalen Vorläuferzellen zugeschrieben werden (Briscoe, 1999; Ericson, 1997). Im Gegensatz zu den Mechanismen der frühen Embryogenese, ist über die Mechanismen, welche die weitere Entwicklung postmitotischer Neurone steuern, wie z.B. das Auswachsen der Axone und die neuronale Migration, sehr wenig bekannt. So konnte Nkx6.1 als maßgeblicher Faktor für die Spezifizierung von somatomotorischen Vorläuferzellen während der Neurogenese im Rückenmark identifiziert werden (Briscoe, 2000; Qiu, 1998; Sander, 2000), jedoch ist über seine Funktion während der späten Entwicklung postmitotischer Motoneurone nichts bekannt. In meinen Untersuchungen habe ich diese Frage am Beispiel der kranialen Motoneurone, die Nkx6.1 auch während der späten Embryogenese exprimieren, untersucht. Als genetisches Modell standen mir dabei für meine Untersuchungen Nkx6.1 mutante Mäuse zur Verfügung. Zunächst untersuchte ich, ob die frühe Ausbildung der verschiedenen Klassen kranialer Motoneurone von Nkx6.1 abhängig ist. Da meine Analyse Nkx6.1 mutanter Embryonen zeigte, dass die Ausbildung der sm Neurone nicht jedoch der vm/bm Neurone im Hirnstamm durch Nkx6.1 kontrolliert wird, wurde im Folgenden die Rolle von Nkx6.1 bei der weiteren Entwicklung der bm Neurone untersucht. Durch retrograde Markierung der Hirnnerven, *in situ* Hybridisierung und immunohistochemischen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob Nkx6.1 die Projektion der Axone sowie das Migrationsmuster der bm Neurone kontrolliert. Die Untersuchungen sollten klären durch welchen Mechanismus Nkx6.1 diese Prozesse steuert.

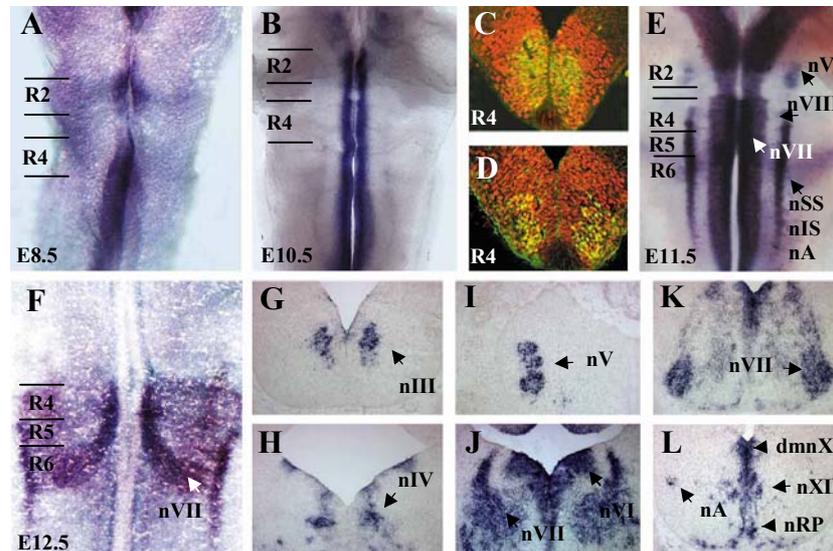
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Nkx6.1 Expression in kranialen Motoneuronen

Nkx6.1 während der Embryonalentwicklung neben dem Rückenmark auch im Hirnstamm exprimiert wird (Sander et al., 2000), daher wurden von mir zuerst die Nkx6.1 Expressionsdomänen im Hirnstamm genauer charakterisiert. Dies sollte einen Einblick geben, zu welchem Entwicklungszeitpunkt und in welcher Neuronenpopulation Nkx6.1 exprimiert wird, und welche Funktion es dort ausüben könnte. Die Nkx6.1 Expression wurde durch Hybridisierung mit einer RNS anti-sense Sonde auf ganzen Hirnstämmen der Maus, sogenannte „Flat-mounts“, und auf transversalen Schnitten durch den Hirnstamm nachgewiesen. Die Präparation der Hirnstämme ist in Kapitel 5.7.4 genau erläutert. Für die Betrachtung aller folgenden „Flat mount“ Abbildungen gilt, dass der obere Bereich der anterioren Position und der untere Bereich der posterioren Position des Hirnstamms entspricht. Der dorsale Bereich des embryonalen Hirnstamms ist auf Abbildungen jeweils links und rechts zu erkennen, während der am meisten ventrale Bereich in der Mitte vorzufinden ist.

Die *in situ* Hybridisierungen zeigten, dass Nkx6.1 zum ersten Mal am E8.5 bei Mausembryonen nachzuweisen war (Abb.2.1A). Nkx6.1 wurde zu diesem Zeitpunkt im ventralen Teil des Neuralrohrs entlang der gesamten AP-Achse, mit Ausnahme des Bereichs des späteren Vorderhirns (Qiu et al., 1998), exprimiert. Am E10.5 wurde Nkx6.1 in zwei ventralen Streifen entlang der Bodenplatte exprimiert (Abb.2.1B). Immunhistologische Untersuchungen auf transversalen Schnitten durch den Hirnstamm in Höhe von R4 zeigten, dass Nkx6.1 zu diesem Zeitpunkt sowohl mit dem Marker für vm/bm Vorläuferzellen, Nkx2.2 (Abb.2.1C), als auch mit Isl1 (Abb.2.1D), einem Marker für differenzierte Motoneurone, koexprimiert wird. Das verdeutlicht, dass Nkx6.1 sowohl in Vorläuferzellen, als auch in differenzierten Motoneuronen exprimiert wird. Während der weiteren Embryonalentwicklung zwischen E11.5 (Abb.2.1E) und E12.5 (Abb.2.1F) blieb Nkx6.1 in postmitotischen, kranialen Motoneuronen nachweisbar. Die ventrale Expression von Nkx6.1 entlang der Bodenplatte erschien am E11.5 (Abb.2.1E) breiter als noch am E10.5 (Abb.2.1B), da ein Großteil der

Neurone die innere Ventrikularzone bereits verlassen hatte. Zusätzlich zur ventralen Expressionsdomäne waren zwei laterale Streifen Nkx6.1-positiver Zellen zu beobachten.



**Abbildung 2-1: Nkx6.1 Expression im embryonalen Hirnstamm der Maus.** *In situ* Hybridisierung mit einer Nkx6.1 antisense RNS Sonde auf Hirnstämmen zu verschiedenen Entwicklungsstadien (A,B,E,F) auf transversalen Schnitten durch Rhombomer (R) 4 am Embryonaltag (E) 10.5 (C,D) und durch den Hirnstamm am E12.5 (G-L). Am E8.5 (A) ist Nkx6.1 in ventralen Vorläuferzellen exprimiert. Am E10.5 (B) ist Nkx6.1 in zwei Streifen entlang der ventralen Bodenplatte im Hirnstamm und in R4 mit Nkx2.2 (C) und Isl1(D) koexprimiert. Am E11.5 (E) bleibt die Nkx6.1 Expression in der ventralen Domäne erhalten. Zusätzlich findet man Nkx6.1 in den migrierenden bm (bm) Neuronen des *Nervus trigeminus* (nV) und des *Nervus facialis* (nVII) und eine laterale Population Nkx6.1-exprimierender Zellen, bei der es sich um Neurone des *Nucleus superior salivatorius* (nSS), *Nucleus inferior salivatorius* (nIS) und des *Nucleus ambiguus* (nA) handelt. Am E12.5 (F) markiert Nkx6.1 den migrierenden Strom bm Neurone des *Nervus facialis* von R4 bis R6. Gleichzeitig kann Nkx6.1 in allen acht kranialen Motoneuronen (G-L) und den serotonergen Raphekernen (nRP) nachgewiesen werden. nIII, *Nucleus oculomotorius* (E); nIV, *Nucleus trochlearis* (F); nV, *Nucleus trigeminus* (G); nVI, *Nucleus abducens* (H); nVII, *Nucleus facialis* (I); nA, *Nucleus ambiguus* (J); dmnX, *Nucleus dorsalis* des *Nervus vagus* (K); nXII *Nucleus hypoglossus* (K).

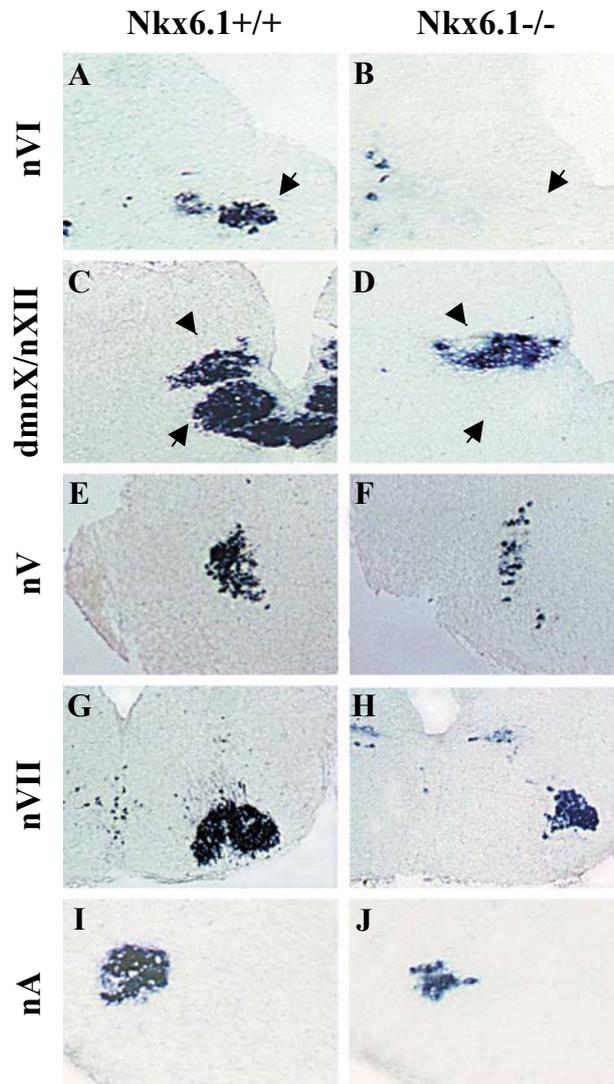
Hierbei handelte es sich in Höhe von R4 um efferente Neurone des *Nervus vestibulocochlearis*, in Höhe von R5 um den *Nucleus salivatorius superior*, in Höhe von R6 um den *Nucleus salivatorius inferior* und in Höhe von R7 um den *Nucleus ambiguus*. Auch die bm Neurone des *Nervus trigeminus* dorsolateral in R2 waren Nkx6.1-positiv (Abb.2.1E).

Am E12.5 wurde Nkx6.1 in den migrierenden bm Neuronen des *Nervus facialis* exprimiert (Abb.2.1F). Obwohl ein Großteil der Neurone des *Nervus facialis* zu diesem Zeitpunkt in R6 nachzuweisen war, konnten später differenzierte Neurone auch in R4 und R5 beobachtet werden. Weiterhin waren, wie am E11.5, die dorsal positionierten Neurone des *Nervus vestibulocochlearis*, des *Nucleus salivatorius superior*, des *Nucleus salivatorius inferior* und des *Nucleus ambiguus* durch die Nkx6.1 Sonde markiert. Um zu überprüfen, ob alle Motoneuronklassen Nkx6.1 exprimieren, wurden *in situ* Hybridisierungen auf transversalen Schnitten durch das 12.5 Tage alte embryonale Gehirn durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Nkx6.1 in allen acht Hirnnervenkernen exprimiert war. Dazu zählen die Kerne des *Nervus oculomotorius* (nIII; Abb.2.1 G), des *Nervus trochlearis* (nIV; Abb.2.1 H), des *Nervus trigeminus* (nV; Abb.2.1 I), des *Nervus abducens* (nVI; Abb.2.1 J), des *Nervus facialis* (nVII, Abb.2.1 K), des *Nervus glossopharyngeus* (nIX), dessen Kerne den multipolaren Nervenzellen des *Nervus ambiguus* entstammen (nA; Abb.2.1 L), des *Nervus vagus* (nX; Abb.2.1 L) und des *Nervus hypoglossus* (nXII, Abb.2.1 L). Zusätzlich konnte Nkx6.1 auch in den serotonergen Neuronen der Raphekerne nachgewiesen werden (nRP, Abb.2.1 L). Alle kranialen Motoneurone blieben während der gesamten Embryonalentwicklung bis in die erste postnatale Woche (Dissertation N. Jabs) Nkx6.1-positiv. Das Expressionsmuster in den differenzierten Hirnnervenkernen weist darauf hin, dass Nkx6.1 eine Rolle während der postmitotischen Entwicklung der kranialen Motoneurone spielen könnte.

## **2.2 Untersuchung der Entwicklung kranialer Motoneurone im späten Embryonalstadium Nkx6.1 mutanter Mäuse**

Um die Relevanz von Nkx6.1 für die Entwicklung der kranialen Motoneurone zu überprüfen, wurde der Hirnstamm von Nkx6.1 mutanten Mäusen während der späten Embryonalentwicklung untersucht. Zunächst erfolgten histologische Untersuchungen des Hirnstamms, die klären sollten, ob bei den Mausmutanten morphologische Veränderungen des Hirnstamms vorliegen. *In situ* Hybridisierungen mit einer Peripherin RNS antisense Sonde auf transversalen Schnitten durch den 18.5 Tage alten embryonalen Hirnstamm ergänzten die histologischen Untersuchungen. Peripherin ist ein intermediäres Filament Protein, das in allen Neuronen exprimiert wird, deren Axone zu in der Peripherie liegenden Muskeln projizieren. In diese Kategorie fallen auch Motoneurone, die deshalb durch die Peripherin Sonde markiert werden. Die direkte Markierung sollte zeigen ob bestimmte

Populationen von Motoneuronen in Abwesenheit von Nkx6.1 Defekte aufweisen und erleichterte den Vergleich zwischen wildtyp und mutanten Mäusen.



**Abbildung 2-2: Abwesenheit von somatomotorischen (sm) und reduzierte Anzahl von branchiomotorischen (bm) Neuronen im Hirnstamm 18.5 Tage alter Nkx6.1 mutanter Embryonen.** *In situ* Hybridisierung mit einer Peripherin RNS antisense Sonde auf transversalen Schnitten durch den Hirnstamm Embryonaltag (E) 18.5 alter Embryonen bei wildtyp (Nkx6.1+/+) und Nkx6.1 mutanten (Nkx6.1-/-) Mäuse. Bei Nkx6.1 mutanten Embryonen fehlen die sm Kerne des *Nervus abducens* (nVI) (A,B) und des *Nervus hypoglossus* (nXII) (Pfeil in C,D). Die bm Neurone des *Nervus trigeminus* (nV) (E,F), des *Nervus facialis* (nVII) (G,H) und des *Nucleus ambiguus* (nA) (I,J) sind anwesend, aber in der Anzahl reduziert. Der viszerale *Nucleus* des *Nervus vagus* (dmnX) (Pfeilspitze in C,D) ist normal ausgebildet.

Die Untersuchungen zeigten, dass die sm Kerne des *Nervus abducens* (VI; Abb.2.2 A,B) und des *Nervus hypoglossus* (XII; Abb.2.2 C,D) bei Nkx6.1 mutanten Embryonen (Abb.2.2 B,D) nicht vorhanden waren. Alle vm/bm Kerne waren dagegen auch bei mutanten Mäusen ausgebildet, wie für den *Nucleus trigeminus* (nV; Abb.2.2 E,F), *Nucleus facialis* (nVII; Abb.2.2 G,H), *Nucleus ambiguus* (nA; Abb.2.2 I,J) und *Nucleus vagus* (nX; Abb.2.2 C,D) dargestellt. Die rein vm Neurone des dorsalen Vaguskerne (nX; Abb.2.2 C,D) waren bei Nkx6.1 mutanten Mäusen normal in Anzahl und Gestalt, während die Anzahl der bm Neurone des *Nervus trigeminus* (Abb.2.2 E,F), des *Nervus facialis* (Abb.2.2 G,H) und des *Nucleus ambiguus* (Abb.2.2 I,J) um 50-70% reduziert war. Bm Neurone des *Nervus trigeminus* formten im wildtyp Embryo einen kompakten Kern (Abb.2.2 E). Bei Nkx6.1 mutanten Mäusen waren die Neurone jedoch sehr zerstreut angeordnet (Abb.2.2 F). Der *Nucleus facialis* war bei wildtyp Mäusen nahe der Pia vorzufinden (Abb.2.2 G), während er bei Nkx6.1 mutanten Mäusen viel weiter rostral und etwas mehr medial positioniert war (Abb.2.2 H).

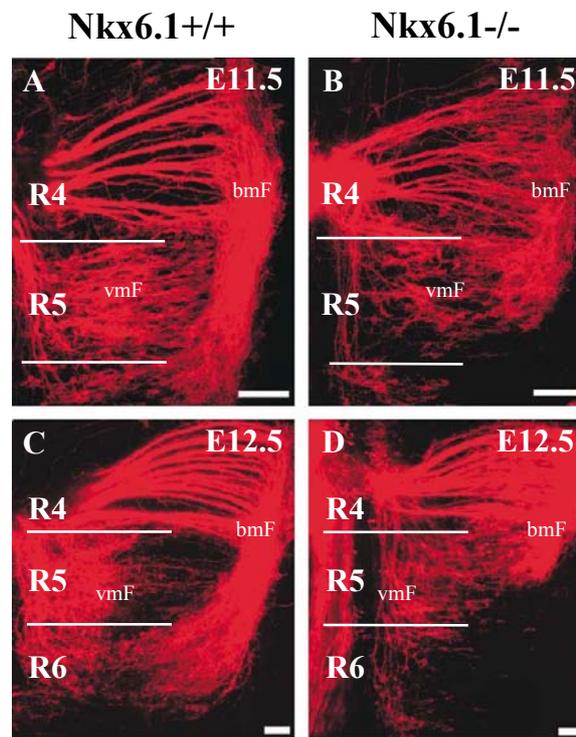
Die Ergebnisse zeigen, dass im Hirnstamm pränataler Nkx6.1 mutanter Mäuse die sm Neurone fehlen. Vm/bm Neurone werden hingegen gebildet, die Anzahl der bm Neurone und deren Position im Hirnstamm unterscheidet sich jedoch bei Nkx6.1 mutanten von wildtyp Mäusen.

### **2.3 Migration und Axonwegfindung kranialer, branchiomotorischer Neurone**

Da die Untersuchungen neonataler Gehirne Nkx6.1 mutanter Mäuse gezeigt haben, dass die bm Neurone des *Nervus trigeminus* und *Nervus facialis* an falschen Positionen im Hirnstamm vorzufinden waren, sollte mit den beiden folgenden Experimenten (1.3.1, 1.3.2) der Verlauf der Migration der Neurone in Nkx6.1 mutanten und wildtyp Hirnstämmen dargestellt und verglichen werden. Die Darstellung der wandernden Neurone erfolgte durch retrograde Markierung mit dem Fluoreszenz Farbstoff DiI. Der Fluoreszenz Farbstoff erlaubt eine detaillierte Darstellung der Axone, der Zellkörper und Dendriten und ermöglicht es, die gesamte Wanderung der Neurone sichtbar zu machen.

### 2.3.1 Migrationsdefekt der branchiomotorischen Neurone des *Nervus facialis*

Abbildung 2.3 zeigt die durch retrograde Markierung dargestellte Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* am E11.5 (Abb.2.3 A,B) und E12.5 (Abb.2.3 C,D) bei wildtyp (Abb.2.3 A,C) und *Nkx6.1* mutanten Mäusen (Abb.2.3 B,D).



**Abbildung 2-3: Migrationsdefekt der branchiomotorischen (bm) Neurone des *Nervus facialis*.** Dorsale Aufsicht auf die linke Hirnstammhälfte. Oben, anterior; unten, posterior; rechts, ventrale Bodenplatte; links, dorsaler Bereich des Hirnstamms. Durch Auftragen von DiI an die Nervaustrittsstelle in Rhombomer (R) 4 wurde der ganze Nerv retrograd markiert. Während bei wildtyp (*Nkx6.1+/+*) Embryonen (A,B) die transversale Wanderung der Neurone von R4 nach R6 am Embryonaltag (E) 11.5 (A), und am E12.5 zusätzlich die dorsolaterale Migration in R6 (C) zu beobachten ist, sammeln sich die meisten bm Neurone des *Nervus facialis* bei *Nkx6.1* mutanten Mäusen (*Nkx6.1-/-*) in R4 nahe der Bodenplatte (B,C). Nur einige wenige wandern in den rostralen Teil von R5. bmF, bm Neurone des *Nervus facialis*; vmF, viszeromotorische Neurone des *Nervus facialis*.

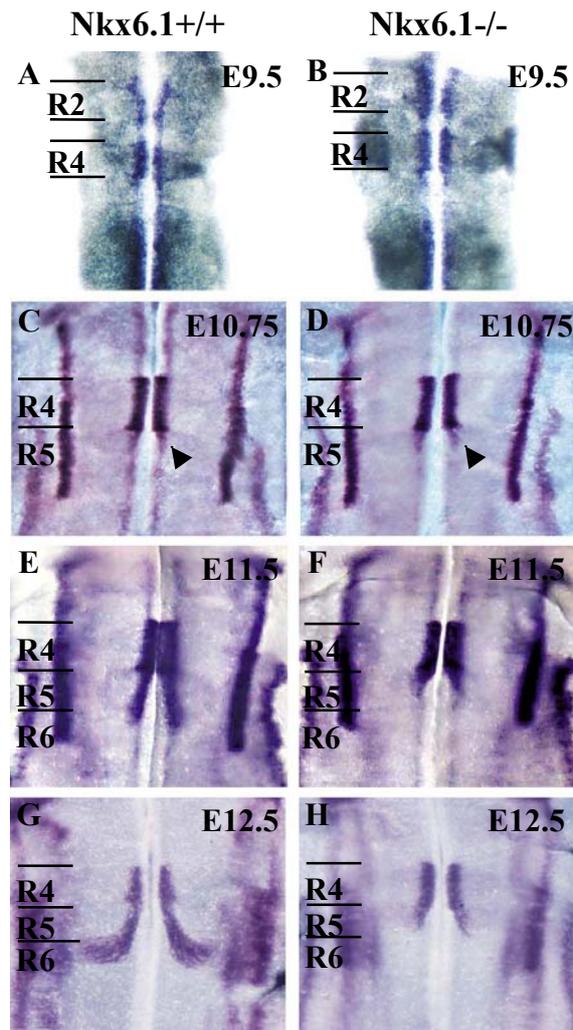
Durch die retrograde Markierung am E11.5 konnten Neurone des *Nervus facialis* bei wildtyp Embryonen von R4 bis ins rostrale Drittel von R6 entlang der Bodenplatte sichtbar gemacht werden (Abb.2.3 A). Die retrograde Diffusion von DiI entlang der Axone führte zur Darstellung der Axone von ihrer dorsalen Austrittsstelle in R4 entlang der ventralen

Bodenplatte bis zum migrierenden Neuron. Einige bm Neurone waren am E12.5 bereits dorsolateral der Bodenplatte in R6 positioniert, während auch weiterhin Neurone in R4 und R5 nachzuweisen waren (Abb.2.3 C). Samt ihrer Axone bildeten die bm Neurone des *Nervus facialis* einen Bogen um den *Nucleus abducens* in R5 (Abb.2.3 C). Diese Struktur ist als inneres Fazialisknie (*Genu internum Nucleus facialis*) bekannt. Auch die vm Neurone des *Nervus facialis* in R5, deren Axone den Hirnstamm ebenfalls an der Nervaustrittsstelle in R4 verlassen, wurden durch die retrograde Markierung sichtbar (Abb.2.3 A,C).

Bei *Nkx6.1* mutanten Mäusen wurden die meisten Neurone am Ort ihres Ursprungs ventral in R4 nachgewiesen. Nur eine kleine Population bm Neurone konnte am E11.5 (Abb.2.3 B) im rostralen R5 dokumentiert werden. Während die Anzahl dieser Neurone in R5 im Verlauf der weiteren Entwicklung konstant blieb, stieg die Neuronenzahl am E12.5 in R4 weiter an (Abb.2.3 D). Bei *Nkx6.1* mutanten Embryonen konnten weder Neurone des *Nervus facialis* in R6 noch dorsolateral wandernde Neurone nachgewiesen werden. Die Beobachtungen bei *Nkx6.1* mutanten Mäusen weisen darauf hin, dass möglicherweise eine frühe Population bm Neurone des *Nervus facialis* aus R4 in R5 wandert und somit die R4/R5 Grenze überschreitet, während die Neurone zu späteren Entwicklungszeitpunkten die R4/R5 Grenze nicht mehr kreuzen, sondern in R4 bleiben. Der vorzeitige Stopp der Migration im rostralen R5 und das Fehlen einer dorsolateralen Wanderung stimmen mit der beobachteten rostro-medialen Missposition bei pränatalen (E18.5) *Nkx6.1* mutanten Embryonen (siehe Kapitel 2.2) überein.

### **2.3.2 Darstellung der Migration branchiomotorischer Neurone des *Nervus facialis* an unterschiedlichen Entwicklungsstadien**

Als nächstes wurden *in situ* Hybridisierungen mit einer *Phox2b* RNS antisense Sonde auf embryonalem Hirnstamm durchgeführt. Der Homeodomänen Transkriptionsfaktor *Phox2b* wird in Vorläuferzellen und in differenzierten Kernen aller vm/bm Neurone der Maus exprimiert (Pattyn, 2000; Pattyn, 1997; Tiveron, 1996) und ist daher ein geeigneter Marker für Neurone des *Nervus facialis*. Im Gegensatz zur Markierung mit dem Fluoreszenz Farbstoff DiI, wodurch nur Zellen markiert werden, deren Axone zur Nervaustrittsstelle in R4 projizieren, markiert die Hybridisierung mit einer *Phox2b* Sonde alle Zellkörper. Somit werden auch die Neurone sichtbar, die zwar wandern, deren Axone aber möglicherweise den Hirnstamm nicht an der Nervaustrittsstelle in R4 verlassen. Dadurch kann definitiv ausgeschlossen werden, dass einige Neurone doch R6 erreichen.



**Abbildung 2-4: Migration der branchiomotorischen (bm) Neurone des *Nervus facialis* an unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten.** *In situ* Hybridisierung auf Hirnstämmen mit einer *Phox2b* RNS antisense Sonde. *Phox2b* wird in den bm Vorläuferzellen am Embryonaltag (E) 9.5 bei wildtyp und mutanten Mäusen entlang der Bodenplatte exprimiert (A,B). Eine frühe Population bm Neurone des *Nervus facialis* migriert am Embryonaltag 10.75 bei wildtyp ( $n^{+/+}$ ) und mutanten ( $Nkx6.1^{-/-}$ ) Mäusen von Rhombomer (R) 4 nach R5 (C,D). In wildtyp Hirnstämmen haben die Neurone an E11.5 bereits den rostralen Bereich von R6 erreicht (E), während die meisten Neurone bei *Nkx6.1* mutanten Mäusen in R4 verbleiben (F). Am E12.5 haben die ersten bm Neurone des *Nervus facialis* im wildtyp Hirnstamm bereits ihren dorsalen Bestimmungsort in R6 erreicht (G). In *Nkx6.1* mutanten Hirnstämmen haben auch zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Neurone die R4/R5 Grenze überschritten.

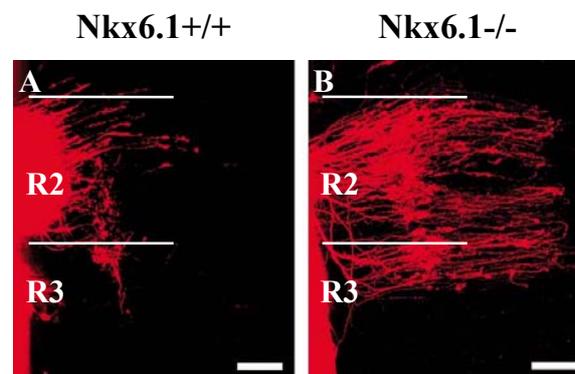
Am E9.5 wurden durch die Phox2b Sonde vm/bm Vorläuferzellen und erste differenzierte vm/bm Neurone entlang der ventralen Bodenplatte markiert (Abb.2.4 A). Das Phox2b Expressionsmuster war zu diesem Zeitpunkt bei wildtyp (Abb.2.4 A) und Nkx6.1 mutanten Mäusen (Abb.2.4 B) identisch. Das weist darauf hin, dass die Entwicklung der bm Vorläuferzellen nicht gestört ist. Am E10.75 ( $\approx$  36 Somiten) wurde Phox2b sowohl in wildtyp (Abb.2.4 C) als auch in mutanten (Abb.2.4 D) Hirnstämmen in den bm Neuronen des *Nervus facialis* in R4 exprimiert. Somit schien die frühe Entwicklung der Motoneurone in R4 bei Nkx6.1 mutanten Mäusen korrekt zu verlaufen. In diesem Entwicklungsstadium konnten sowohl bei wildtyp (Abb.2.4 C), wie auch bei mutanten (Abb.2.4 D) Mäusen erste bm Neurone im rostralen Drittel von R5 nachgewiesen werden. Bis zu diesem Zeitpunkt war das Migrationsverhalten der bm Neurone des *Nervus facialis* also bei wildtyp und Nkx6.1 mutanten Mäusen (Abb.2.4 F) völlig identisch. Am E11.5 konnten bei wildtyp Mäusen Neurone an der R5/R6 Grenze nachgewiesen werden (Abb.2.4 E), während die Motoneurone Nkx6.1 mutanter Mäuse nur im rostralen R5 zu beobachten waren (Abb.2.4 F). Dieses Bild änderte sich bei den Mausmutanten auch zu späteren Entwicklungszeitpunkten nicht. Während sich am E12.5 bei wildtyp Mäusen die dorsolaterale Migration der Neurone in R6 nachweisen ließ (Abb.2.4 G), konnten bei Nkx6.1 mutanten Mäusen keine zusätzlichen Neurone in weiter kaudal liegenden Bereichen des Hirnstamms beobachtet werden (Abb.2.4 H). Stattdessen verblieb der größte Teil der bm Neurone des *Nervus facialis* im Nkx6.1 mutanten Hirnstamm im ventralen R4. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* bei Nkx6.1 mutanten Mäusen nur in R4 bzw. im rostralen Bereich von R5, jedoch nicht in R6 nachweisbar sind.

### **2.3.3 Migrationsdefekt der branchiomotorischen Neurone des *Nervus trigeminus***

Die zerstreute Anordnung der Neurone im späten (E18.5) Nkx6.1 mutanten Embryo (siehe Kapitel 2.2) ließ vermuten, dass auch die Wanderung der bm Neurone des *Nervus trigeminus* gestört ist. Dies sollte, wie bereits für den *Nervus facialis* beschrieben, durch DiI Markierung überprüft werden.

Bei wildtyp Embryonen konnten die meisten bm Neurone am E12.5 nahe der dorsalen Nervaustrittsstelle in R2 nachgewiesen werden (Abb.2.5 A). Im Hirnstamm Nkx6.1 mutanter Mäuse (Abb.2.5 B) hatten die bm Neurone hingegen die Nervaustrittsstelle nicht erreicht, sondern wurden auf halbem Weg ihrer normalen Migrationsstrecke nachgewiesen. Im

Gegensatz zu den Neuronen im Hirnstamm von wildtyp Mäusen, waren die Neurone des *Nervus trigeminus* in Nkx6.1 mutanten Hirnstämmen sehr verstreut und nicht in einem kompakten Kern angeordnet. Des Weiteren konnte man zwischen Nervaustrittsstelle und Somata bei Nkx6.1 mutanten Mäusen schleifenförmige Fortsätze erkennen. Diese Strukturen bildeten sich, da die Neurone sich, nicht wie bei wildtyp Mäusen entlang der primären Axone, sondern entlang sekundär ausgebildeter Fortsätze bewegten. Die Ergebnisse aus 2.3.1, 1.3.2 und 2.3.3 zeigen, dass Nkx6.1 für eine normale Migration der bm Neurone des *Nervus trigeminus* und des *Nervus facialis* notwendig ist, da in Abwesenheit von Nkx6.1 Migrationsdefekte der Motoneurone beider Nerven beobachtet werden konnten.

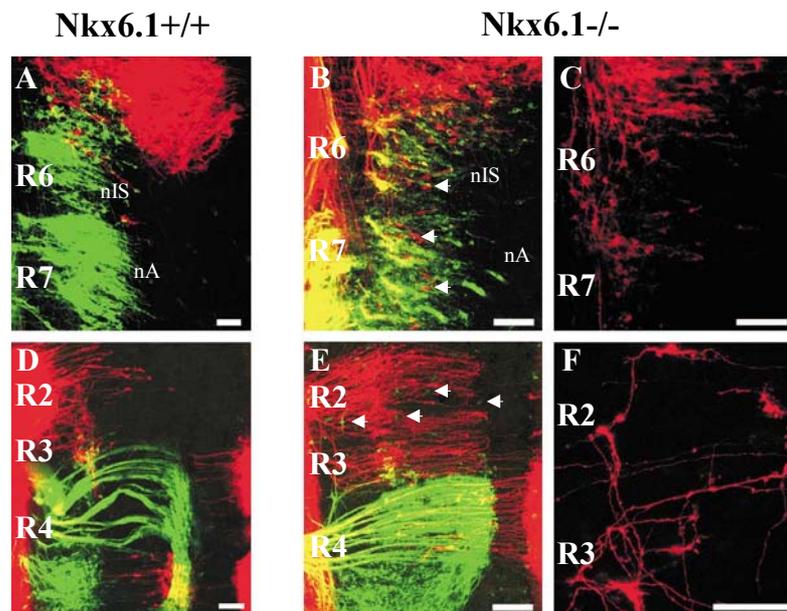


**Abbildung 2-5: Migrationsdefekt der branchiomotorischen (bm) Neurone des *Nervus trigeminus*.** Dorsale Aufsicht auf die linke Hirnstammhälfte. Oben, anterior; unten, posterior; rechts, ventrale Bodenplatte; links, dorsaler Bereich des Hirnstamms. Durch Auftragen von DiI an der Nervaustrittsstelle in Rhombomer (R) 2 wurde der ganze Nerv retrograd markiert. Im wildtyp Embryo (Nkx6.1+/+) haben die bm Neurone des *Nervus trigeminus* am Embryonaltag (E) 12.5 bereits die dorsale Nervaustrittsstelle in R2 erreicht (A). In Nkx6.1 mutanten Embryonen (Nkx6.1-/-) wandern die Neurone nicht entlang ihres primären Axons, sondern entlang sekundärer Fortsätze (B) und stoppen ihre Wanderung verstreut nach ca. 2/3 des Weges.

#### 2.3.4 Axonwegfindungsdefekte bei Nkx6.1 mutanten Mäusen

Die DiI Markierung der Hirnnerven enthüllte neben den Migrationsdefekten auch Defekte bei der Axonwegfindung, die im Folgenden beschrieben werden. Nach Auftragen des DiI Fluoreszenz Farbstoffs an die dorsale Austrittsstelle des *Nervus facialis* in R4 wurden bei Nkx6.1 mutanten Mäusen neben den Neuronen des *Nervus facialis* auch Zellen in R2 (Abb.2.6 F ) und R7 (Abb.2.6 C) retrograd markiert. Abbildung 2.6 B zeigt, dass nach

retrograder Markierung der Nervaustrittsstellen des *Nervus facialis* (rot) und des *Nucleus ambiguus* (grün) rot-markierte Zellen in R7, im Bereich des *Nucleus ambiguus*, nachzuweisen waren. Dies bedeutet, dass einige Neurone in R7 ihre Axone rostral zur Nervaustrittsstelle in R4 projizierten. Solche Projektionen von R7 nach R4 konnten bei wildtyp Embryonen nicht beobachtet werden (Abb.2.6 A).



**Abbildung 2-6: Axonwegfindungsdefekte bei *Nkx6.1* mutanten Mäusen (*Nkx6.1*<sup>-/-</sup>).**

Dorsale Aufsicht auf die linke Hirnstammhälfte. Oben, anterior; unten, posterior; rechts, ventrale Bodenplatte; links, dorsaler Bereich des Hirnstamms. Nach retrograder Markierung des *Nervus facialis* (rot in A,B) am Embryonaltag (E) 12.5 konnten in *Nkx6.1* mutanten Mäusen (B) auch retrograd markierte Neurone im Bereich des *Nucleus ambiguus* (grün in A,B) in Rhombomer (R) 6 und R7 beobachtet werden (B). (C) Retrograd markierte Zellen in R6/R7 nach Einzelmarkierung des *Nervus facialis* in *Nkx6.1* mutanten Embryonen. Nach retrograder Markierung des *Nervus facialis* (grün in D,E) von *Nkx6.1* mutanten Mäusen (E) wurden auch retrograd markierte Neurone im Bereich der Trigemini Neurone (rot in D, E) in R2/R3 beobachtet. (F) Retrograd markierte Zellen in R2/R3 nach Einzelmarkierung des *Nervus facialis* in *Nkx6.1* mutanten Embryonen. Bei wildtyp Embryonen (*Nkx6.1*<sup>+/+</sup>) konnten nach Markierung des *Nervus facialis* mit DiI weder retrograd markierte Neurone in R2 (A) noch in R7 (D) beobachtet werden.

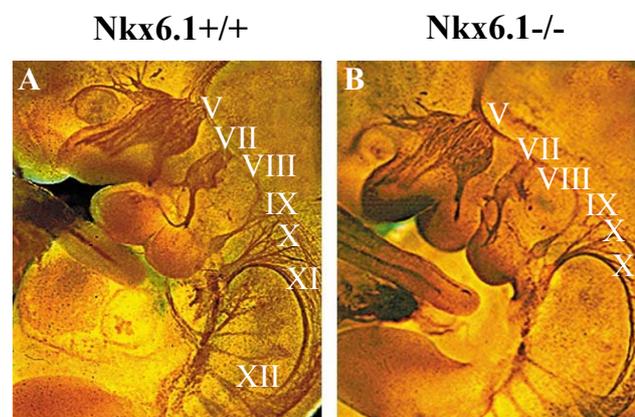
Nach Doppelmarkierung der Nervaustrittsstellen des *Nervus facialis* (grün) in R4 und des *Nervus trigeminus* (rot) in R2 konnten grün-markierte Zellen in R2 nachgewiesen werden (Abb.2.6 E). Dies bedeutet, dass auch Neurone des *Nervus trigeminus* in R2 Axone zur

Nerv Austrittsstelle in R4 projizieren. Wiederum wurden solche in R2 markierten Neurone, bei gleicher DiI Behandlung niemals bei wildtyp Mäusen beobachtet (Abb.2.6 D).

Bei den beobachteten roten Zellen in R4 (Abb.2.6 E) handelt es sich allerdings nicht um ektopisch nach R2 projizierende Neurone des *Nervus facialis*, sondern um Neurone des afferenten *Nervus vestibulocochlearis*, die in diesem Versuch separat retrograd markiert wurden. Die Neurone werden ebenfalls in R4 gebildet und kreuzen die Mittellinie.

Die Daten weisen darauf hin, dass ein Teil der Axone des *Nervus trigeminus* und der Neurone des *Nucleus ambiguus* zur falschen Austrittsstellen projizieren und den Hirnstamm fälschlicherweise mit dem *Nervus facialis* in R4 verlassen.

Ob die Axone nach Verlassen des Hirnstamms in den ersten, zweiten oder dritten Kiemenbogen projizieren, wurde auf immunohistochemischem Weg an 10.5 Tage alten Embryonen überprüft. Hierzu wurde ein Antikörper gegen das Neurofilament 2H3 zur Markierung sämtlicher Axone benutzt. Die Analyse des Verzweigungsmusters bei wildtyp (Abb.2.7 A) und mutanten (Abb.2.7 B) Embryonen zeigte, dass die Axone korrekt in den jeweils zugehörigen Kiemenbogen projizierten. Ob die Axone jedoch auch nach Verlassen der Kiemenbögen korrekt in die Peripherie projizieren und Verknüpfungen mit den richtigen Zielmuskeln herstellen, kann bei diesem Experiment nicht geklärt werden.



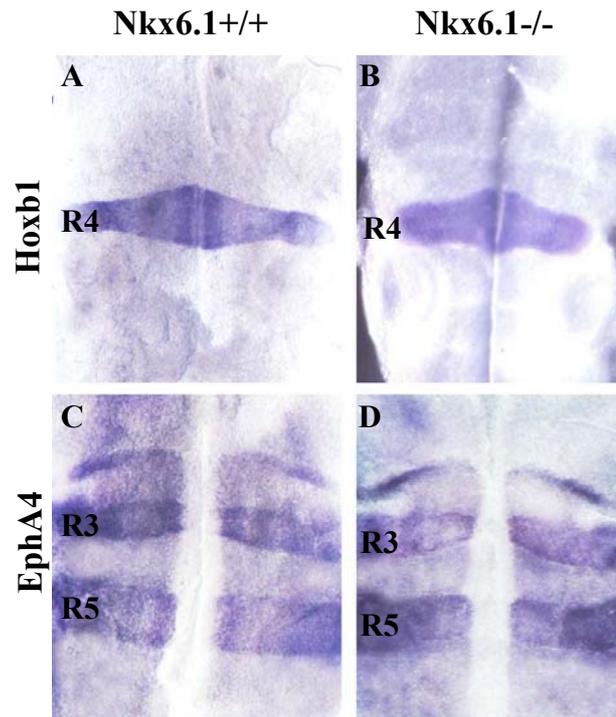
**Abbildung 2-7: Ungestörte Projektion der kranialen Nerven in den ersten, zweiten und dritten Kiemenbogen.** Seitenansicht 10.5 Tage alter Embryonen. Immunohistochemische Färbung mit dem Neurofilament Antikörper 2H3. Das Verzweigungsmuster der kranialen Nerven (V, VII, VIII, IX, X, XI) in alle drei Kiemenbögen ist identisch in wildtyp (Nkx6.1+/+) (A) und Nkx6.1 mutanten (Nkx6.1-/-) Embryonen (B) .

## **2.4 Funktion von Nkx6.1 bei der Kontrolle der Migration kranialer, branchiomotorischer Neurone des *Nervus facialis***

Die bei Nkx6.1 mutanten Mäusen beobachteten Migrations- und Axonwegfindungsdefekte können verschiedene Ursachen haben. Da Untersuchungen bereits gezeigt haben, dass die Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* durch Signale aus der Umgebung gesteuert wird (Studer, 2001), könnte der Migrationsdefekt durch Veränderungen in der Umgebung der Neurone hervorgerufen werden. Die Abwesenheit von Nkx6.1 könnte die Umgebung des Neurons so verändern, dass es falsche Informationen bezüglich seiner Position bekommt. Andererseits könnte die Funktion von Nkx6.1 in bm Neuronen aber auch zellintrinsisch sein. Demnach könnte durch das Fehlen von Nkx6.1 die Identität der Vorläuferzellen, deren Differenzierung oder die postmitotische Entwicklung des Neurons gestört sein. Mit den nachfolgenden Experimenten sollten diese Möglichkeiten überprüft werden. Da über die molekularen Grundlagen der Migration von bm Neuronen des *Nervus facialis* am meisten bekannt ist, konzentrierten sich meine weiteren Analysen zur Funktion von Nkx6.1 hauptsächlich auf diese Neuronenklasse.

### **2.4.1 Analyse der Rhombomeridentität**

Um zu klären, ob durch die Abwesenheit von Nkx6.1 die Umgebung der bm Neurone des *Nervus facialis* verändert ist, wurde zuerst die Morphologie des Hirnstamms untersucht. Die histologischen Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass morphologisch kein Unterschied zwischen Nkx6.1 mutanten Mäusen und wildtyp Mäusen zu sehen war. Auch die Anzahl der Rhombomere war normal bei Nkx6.1 mutanten Mäusen. Um die Rhombomeridentität zu überprüfen wurden *in situ* Hybridisierungen mit einer Hoxb1 (Abb.2.8 A,B) und EphA4 (Abb.2.8 C,D) RNS antisense Sonde auf Hirnstämmen 10.5 Tage alter Embryonen durchgeführt. EphA4 ist eine Rezeptorkinase, die bei wildtyp Mäusen zu diesem Zeitpunkt spezifisch in R3 und R5 exprimiert wird, und damit als Marker für diese Rhombomere dient (Abb.2.8 C). Hoxb1 ist der Rhombomeridentitätsmarker für R4 (Abb.2.8 A). Da beide Faktoren im Nkx6.1 mutanten Hirnstamm normal exprimiert waren (Abb.2.8 B,D), konnte keine Veränderungen der Segmentidentität in R3, R4 und R5 festgestellt werden.

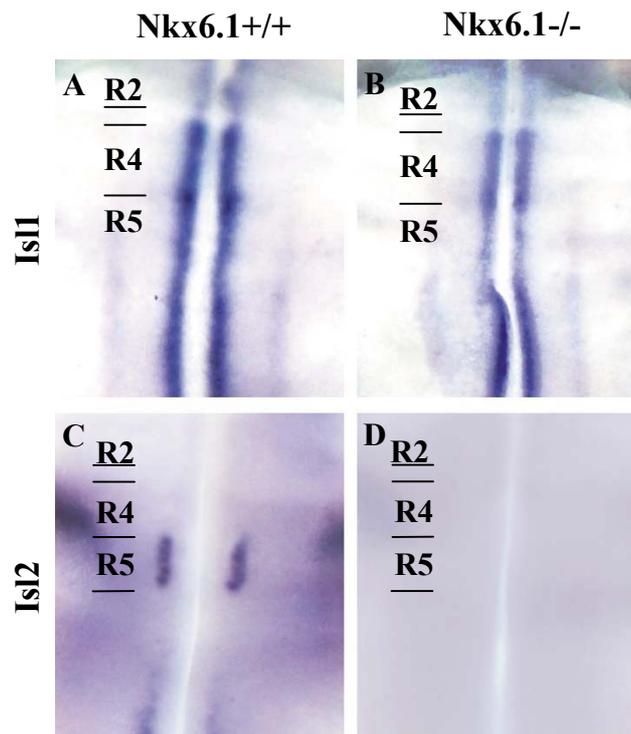


**Abbildung 2-8: Die Rhombomer (R) Identität ist nicht gestört bei Nkx6.1 mutanten Mäusen.** Die Expression der Identitätsmarker Hoxb1 in R4 (A,B) und EphA4 (C,D), in R3 und R5, ist identisch in wildtyp (Nkx6.1+/+) (A,C) und Nkx6.1 mutanten (Nkx6.1-/-) (B,D) Mäusen.

#### 2.4.2 Analyse der Spezifizierung branchiomotorischer Neurone des *Nervus facialis*

Als nächstes wurde untersucht, ob die Abwesenheit von Nkx6.1 Defekte im Neuron selbst hervorruft. Dies könnte zum Einen den Zeitpunkt betreffen, an dem die bm Vorläuferzellen den Zellzyklus verlassen. Weiterhin wurde überprüft, ob die Neurone des *Nervus facialis* in R4 korrekt als bm Neurone spezifiziert sind. Um diesen Fragen nachzugehen, wurde überprüft, ob zeitliche, quantitative oder qualitative Unterschiede während der frühen Entwicklung der Neurone des *Nervus facialis* zwischen wildtyp und Nkx6.1 mutanten Mäusen zu beobachten sind.

Zuerst wurde die Expression von Isl1 getestet, einem Marker für differenzierte sm, vm und bm Neurone. *In situ* Hybridisierungen auf Hirnstämmen 10.5 Tage alter Embryonen mit einer Isl1 antisense RNS Sonde zeigten bei wildtyp Embryonen Isl1-positive Neuronen in zwei ventralen Streifen entlang der Bodenplatte (Abb.2.9 A).



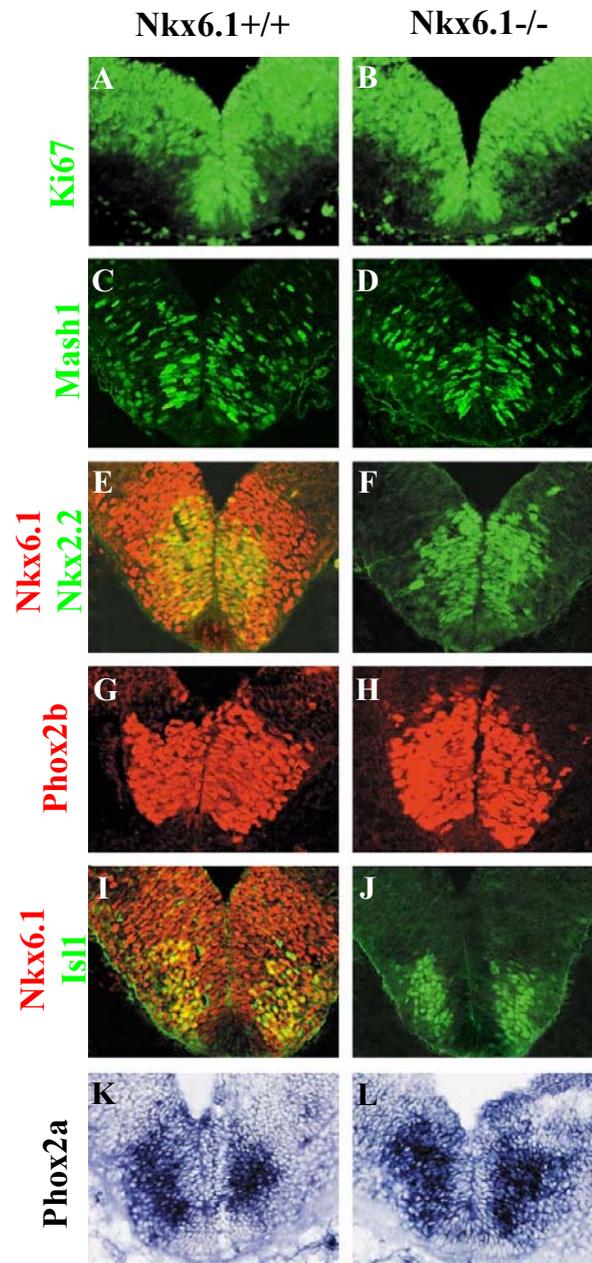
**Abbildung 2-9: Normale Isl1 und fehlende Isl2 Expression in Nkx6.1 mutanten Mäusen (Nkx6.1<sup>-/-</sup>).** *In situ* Hybridisierung auf Hirnstämmen am Embryonaltag 10.5 mit einer Isl1 (A,B) und Isl2 (C,D) RNS antisense Sonde. Die Differenzierung der vm und bm Neurone ist bei Nkx6.1 mutanten Mäusen normal (B). Somatomotorische Neurone in R5 und R8 werden bei Nkx6.1 mutanten Embryonen (D) nicht gebildet. (Nkx6.1<sup>+/+</sup>), wildtyp Hirnstamm.

Bei Nkx6.1 mutanten Mäusen konnte ein sehr ähnliches Expressionsmuster für Isl1 beobachtet werden (Abb.2.9 B). Allerdings fiel auf, dass die Isl1 Expression in R5 leicht reduziert war. Da in R5 neben den vm Neuronen des *Nervus facialis*, auch die sm Neurone des *Nervus abducens* gebildet werden, könnte das reduzierte Signal sowohl durch einen Differenzierungsdefekt der vm als auch der sm Neurone verursacht sein. Aus diesem Grund wurde eine zweite *in situ* Hybridisierung mit einer Isl2 RNS antisense Sonde durchgeführt. Isl2 (Varela-Echavarria, 1996) ist ein Marker, der ganz spezifisch nur in differenzierten sm Neuronen exprimiert wird und somit in R5 die Neurone des *Nervus abducens* markiert (Abb.2.9C). Im Hirnstamm Nkx6.1 mutanter Mäusen konnte im Gegensatz zu wildtyp Mäusen keine Isl2 Expression nachgewiesen werden (Abb.2.9 D) was bedeutet, dass keine sm Neurone gebildet wurden. Diese Beobachtung zeigt, dass Nkx6.1 die Spezifizierung sm Neurone kontrolliert und im Hirnstamm Nkx6.1 mutanter Mäuse keine sm Neurone differenzieren.

Das Fehlen der sm Neurone in R5 erklärt somit die reduzierte *Isl1* Expression in diesem Bereich (Abb.2.9 B). Da im restlichen Hirnstamm keine Reduktion der *Isl1* Expression zu beobachten war, scheint *Nkx6.1* nicht für die Differenzierung von vm/bm Neuronen notwendig zu sein.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Vorläuferzellen des *Nervus facialis* in R4 korrekt als bm Neurone spezifiziert sind, und ob diese den Zellzyklus bei *Nkx6.1* mutanten Embryonen zum richtigen Zeitpunkt verlassen. Dies wurde auf transversalen Schnitten durch R4 getestet. Im Gegensatz zu den Färbungen ganzer Hirnstämme läßt sich auf transversalen Schnitten die genaue DV und mediolaterale Expressionsdomäne bestimmter Faktoren erkennen. Mit dem Nachweis spezifischer Transkriptionsfaktoren kann daher gezeigt werden, ob die bm Neurone in normaler Anzahl und in der richtigen Position gebildet werden. Geeignete Marker wurden mittels *in situ* Hybridisierung oder immunohistochemischer Fluoreszenz Färbung am E10.5 auf ihre Expression überprüft.

Als Marker für mitotisch aktive Zellen wurde *Ki67* verwendet (Abb.2.10 A,B). Um die korrekte Spezifizierung der vm/bm Vorläuferzellen zu testen, wurden die Marker *Mash1* (Abb.2.10 C,D) und *Nkx2.2* (Abb.2.10 E,F) benutzt. *Mash1* ist ein proneurales Gen und induziert neuronale Identität (Bertrand, 2002), während der Transkriptionsfaktor *Nkx2.2* spezifisch in Vorläuferzellen der vm/bm Neuronen exprimiert wird (Briscoe, 1999; Dubreuil, 2002). Das Expressionsmuster aller drei Marker war bei *Nkx6.1* mutanten Mäusen (Abb.2.10 B,D,F) identisch mit dem bei wildtyp Mäusen (Abb.2.10 A,C,E). Im Weiteren wurde überprüft, ob die in R4 differenzierten Motoneurone die richtigen Marker für bm Neurone exprimieren. Wie schon die Hybridisierung ganzer Hirnstämme (Abb. 2.9 A,B) vermuten ließ, konnte auch auf Schnitten kein Unterschied der Expression der bm/vm Marker *Phox2b* (Abb.2.10 G,H), *Isl1* (Abb.2.10 I,J) sowie *Phox2a* (Abb.2.10 K,L) zwischen wildtyp (Abb.2.10 E,G,I,K) und *Nkx6.1* mutanten Mäusen (Abb.2.10 F,H,J,L) festgestellt werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Spezifizierung der bm Neurone unabhängig von *Nkx6.1* erfolgt.



**Abbildung 2-10: Spezifizierung der branchiomotorischen (bm) Neurone des *Nervus facialis* in Rhombomer (R) 4.** Immunofluoreszenz (A,J) und *in situ* Hybridisierung (K,L) auf transversalen Schnitten durch R4 am Embryonaltag (E) 10.5. Der mitotische Marker Ki67 (A,B), sowie die Marker für bm Vorläuferzellen, Mash1 (C,D), Nkx2.2 (grün in E,F; rot Nkx6.1) und Phox2b (G,H) sind normal exprimiert in Nkx6.1 mutanten Embryonen (Nkx6.1<sup>-/-</sup>). Die bm Neurone des *Nervus facialis* differenzieren korrekt in Nkx6.1 mutanten Mäusen, sichtbar an der normalen Expression der Marker Phox2b (G,H), Isl1 (I,J) und Phox2a (K,L). Nkx6.1<sup>+/+</sup>, wildtyp Embryonen

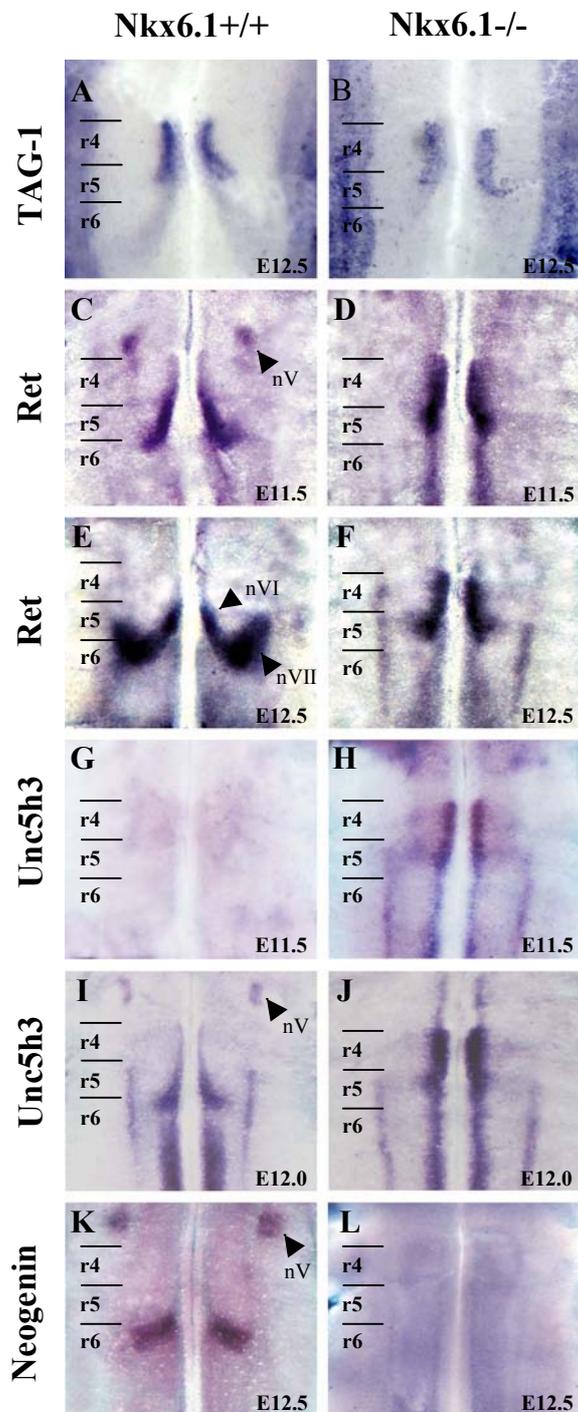
### **2.4.3 Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen während der Migration branchiomotorischer Neurone des *Nervus facialis***

Wie bereits oben erwähnt, werden Neurone durch Signale aus der Umgebung gesteuert. Solche Signale werden im Allgemeinen durch Zelloberflächenmoleküle auf dem Neuron erkannt. Da Untersuchungen bereits gezeigt haben, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* während ihrer Wanderung rhombomerspezifisch Zelloberflächenmoleküle exprimieren, durch die sie Signale aus der Umgebung interpretieren (Garel, 2000), könnte eine weitere mögliche Funktion von Nkx6.1 darin bestehen, dass es zellautonom die Expression von Zelloberflächenmolekülen auf den wandernden Neuronen kontrolliert. Daher wurde als nächstes die Expression des Zelloberflächenmoleküls TAG-1, der GDNF Rezeptor Untereinheit Ret und der Netrin-1 Rezeptoren DCC, Neogenin, Unc5h1, Unc5h2 und Unc5h3 während der Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* überprüft. Für TAG-1 und Ret konnte bereits gezeigt werden, dass sie in migrierenden Neuronen des *Nervus facialis* exprimiert werden (Garel, 2000). Untersuchungen Nkx6.1 mutanter Mäuse sollten prüfen, ob die Expression beider Gene durch Nkx6.1 kontrolliert wird. Netrin-1 Rezeptoren schienen geeignete Kandidaten für eine mögliche Beteiligung an der Kontrolle der neuronalen Migration, da bereits gezeigt werden konnte, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* in Zellkultur auf Netrin-1 reagieren (Varela-Echavarria, 1997). Die Expression der Zelloberflächenmoleküle wurde durch *in situ* Hybridisierung mit den entsprechenden antisense RNS Sonden auf embryonalen Hirnstämmen zwischen E10.5 und E12.5 analysiert.

#### **2.4.3.1 TAG-1 Expression**

Bei wildtyp Mäusen war TAG-1 in den bm Neuronen des *Nervus facialis* während ihrer tangentialen Wanderung in R4 und in R5 exprimiert (Abb.2.11 A). In R6 war nur noch eine schwache TAG-1 Expression zu beobachten. Auch bei Nkx6.1 mutanten Mäusen wurde TAG-1 von den bm Neuronen des *Nervus facialis* in R4 und R5 exprimiert (Abb.2.11 B). Auf Grund des Migrationsdefekts konnten bei Nkx6.1 mutanten Mäusen natürlich keine TAG-1 positiven Zellen im kaudalen Teil von R5 und in R6 nachgewiesen werden. Das ähnliche

Expressionsmuster von TAG-1 bei wildtyp und mutanten Mäusen weist darauf hin, dass TAG-1 nicht durch Nkx6.1 reguliert wird.



**Abbildung 2-11: Nkx6.1 reguliert die Expression von Zelloberflächenmolekülen während der Wanderung der branchiomotorischen (bm) Neurone des Nervus facialis.** *In situ* Hybridisierung auf wildtyp und Nkx6.1 mutanten Hirnstämmen zu den angegebenen Entwicklungsstadien. TAG-1 wird in Rhombomer (R) 4 und R5 exprimiert und in den dorsolateral wandernden Neuronen in R6 nur schwach (A). Die TAG-1 Expression ist identisch bei Nkx6.1 mutanten (Nkx6.1<sup>-/-</sup>)(B) und wildtyp (Nkx6.1<sup>+/+</sup>) (A) Mäusen. Bei wildtyp Mäusen ist Ret schwach in R4 und stark in R5 und R6 nachzuweisen (C,E). Bei Nkx6.1 mutanten Mäusen wird Ret stark in R4 exprimiert (D,F). Unc5h3 wird bei wildtyp Mäusen in den bm Neuronen des Nervus facialis in R5 und R6 am Embryonaltag (E) 12.5 exprimiert (G,I). In Hirnstämmen von Nkx6.1 mutanten Mäusen ist Unc5h3 ektopisch ab E11.5 in R4 exprimiert (H,J). Neogenin wird in den dorsolateral wandernden Neuronen in R6 exprimiert (K). Bei Nkx6.1 mutanten Mäusen wird Neogenin nicht exprimiert (L). Ret (C), Unc5h3 (I) und Neogenin (K) werden auch in den dorsolateral wandernden bm Neuronen des Nervus trigeminus (nV) exprimiert.

### 2.4.3.2 Ret Expression

Ret konnte in den bm Neuronen des *Nervus facialis* zum ersten Mal am E11.0 nachgewiesen werden. Am E11.5 hatte ein Teil der bm Neurone bereits den rostralen Bereich von R6 erreicht (Abb.2.11 C). Zu diesem Zeitpunkt konnte Ret schwach in R4 nachgewiesen werden, wurde jedoch sehr viel stärker in den bm Neuronen kaudal der R4/R5 Grenze exprimiert. Die Expression blieb auch in den dorsolateral wandernden Neuronen in R6 am E12.5 erhalten (Abb.2.11 E), wohingegen die Expression in R4 kaum noch nachzuweisen war. Im Hirnstamm Nkx6.1 mutanter Mäuse wurde am E11.5 (Abb.2.11 D) und E12.5 (Abb.2.11 F) eine verstärkte Expression von Ret in R4 und R5 in den bm Neuronen des *Nervus facialis* beobachtet, obwohl Ret in wildtyp Motoneuronen (Abb.2.11 C,E) nur sehr schwach in R4 nachzuweisen war. Auch die dorsolateral wandernden bm Neurone des *Nervus trigeminus* in R3 waren am E11.5 Ret-positiv.

### 2.4.3.3 Unc5h3

Unc5h3 konnte als einziges Unc5h Familienmitglied während der Embryonalentwicklung in den bm Neuronen des *Nervus facialis* nachgewiesen werden. Bei wildtyp Embryonen wurde die früheste Unc5h3 Expression am E12.0 beobachtet (Abb.2.11 I). Unc5h3 wurde zu diesem Zeitpunkt in den bm Neuronen des *Nervus facialis*, ähnlich wie Ret, schwach in R4 und sehr viel stärker in R5 und R6 exprimiert.

Die Neurone blieben auch während ihrer dorsolateralen Wanderung in R6 Unc5h3-positiv. Unc5h3 war am E12.0 auch in den bm Neuronen des *Nervus trigeminus* nachweisbar. Obwohl am E11.5 im wildtyp Hirnstamm kein Unc5h3 zu beobachten war (Abb.2.11 G), ließ sich zu diesem Zeitpunkt in Nkx6.1 mutanten Hirnstämmen bereits eine frühzeitige, ektopische Unc5h3 Expression in R4/R5 beobachten (Abb.2.11 H). Auch am E12.5 blieb diese starke Expression von Unc5h3 in R4/R5 erhalten (Abb.2.11 J).

Von den Mitgliedern der DCC Familie war nur Neogenin in den migrierenden bm Neuronen des *Nervus facialis* nachweisbar. Anders als Ret und Unc5h3 wurde Neogenin erst in den dorsolateral wandernden Neuronen in R6 am E12.5 exprimiert (Abb.2.11 K). Bei Nkx6.1 mutanten Mäusen ließ sich dagegen keine Neogenin Expression feststellen (Abb.2.11 L). Wie Ret und Unc5h3, konnte auch Neogenin in den bm Neuronen des *Nervus trigeminus* in R2 nachgewiesen werden (Abb. 2.11 K).

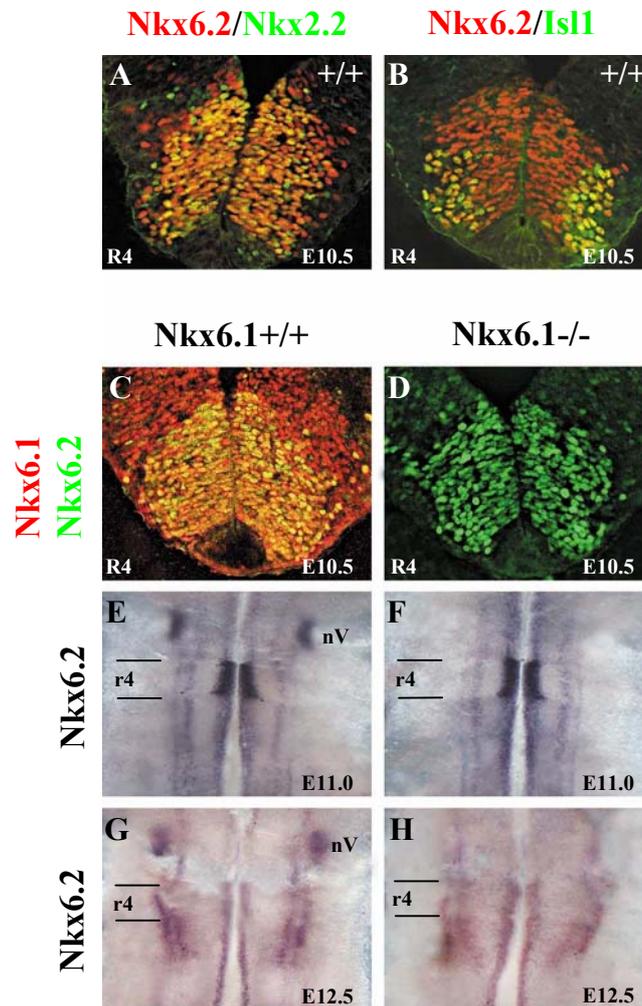
Die Untersuchungen in Kapitel 2.4.3.1, 2.4.3.2, 2.4.3.3 zeigen, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* in Abhängigkeit von ihrer Position im Hirnstamm rhombomerespezifische Kombinationen von Zelloberflächenmolekülen exprimieren. Des Weiteren weisen die Experimente darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 die Expression der Zelloberflächenmoleküle Ret, Unc5h3 und Neogenin reguliert. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, dass das Auftreten des Migrationsdefekts der bm Neurone in R4 am E11.0 zeitlich mit der ektopischen Expression von Ret und Unc5h3 in R4 korreliert.

## 2.5 Nkx6.1 und Nkx6.2 Koexpression in R4

Da früh migrierende Neurone des *Nervus facialis* auch in Abwesenheit von Nkx6.1 in R5 wandern, während später gebildete Neurone in R4 bleiben, liegt die Annahme nahe, dass zu diesem Entwicklungszeitpunkt andere Faktoren in R4 exprimiert werden, die ähnliche Funktionen wie Nkx6.1 haben. Als möglicher Kandidat wurde der Homeodomänen Transkriptionsfaktor Nkx6.2 untersucht, da Untersuchungen im Rückenmark gezeigt hatten, dass Nkx6.2 das Fehlen von Nkx6.1 kompensieren kann (Vallstedt, 2001). Daher wurde die Expression von Nkx6.2 mit immunohistochemischen Färbungen auf transversalen Schnitten durch den 10.5 Tage Embryo und mit *in situ* Hybridisierung ganzer Hirnstämme untersucht. Die Analyse zeigte, dass Nkx6.2 am E10.5 in R4 sowohl mit dem Marker für bm Vorläuferzellen, Nkx2.2 (Abb.2.12 A), als auch in den differenzierten bm Neuronen, mit Isl1 (Abb.2.12 B) koexprimiert war. Doppelfärbungen für Nkx6.1 und Nkx6.2 zeigten, dass alle Nkx6.2-positiven Zellen in R4 auch Nkx6.1 exprimierten (Abb.2.12 C). Die Nkx6.1 Expression setzte sich allerdings im Gegensatz zur Nkx6.2 Expression weiter dorsal fort. Auch am E11.0 und E12.5 konnte Nkx6.2 in den bm Neuronen des *Nervus facialis* in R4 nachgewiesen werden (Abb.2.12 E, G). Anders als Nkx6.1 wurde Nkx6.2 aber nicht in den migrierenden Neuronen des *Nervus facialis* in R5 bzw. R6 exprimiert (Abb.2.12 G). Bei den ventral beobachteten Nkx6.2-exprimierenden Zellen, kaudal von R4, handelte es sich nicht um bm Neurone des *Nervus facialis*. Des Weiteren fiel auf, dass die Nkx6.2 Expression bei Embryonen älter als E11.0 in R4 schwächer wurde (Abb.2.12 G). Nkx6.2 konnte bei wildtyp Mäusen auch in den dorsolateral wandernden bm Neuronen des *Nervus trigeminus* in R2 beobachtet werden (Abb.2.12 E,G).

Untersuchungen Nkx6.1 mutanter Mäuse zeigten, dass das Expressionsmuster von Nkx6.2 in den bm Neuronen des *Nervus facialis* in allen beobachteten Entwicklungsstadien mit dem

Expressionsmuster bei wildtyp Mäusen identisch und somit unabhängig von der Nkx6.1 Expression war (Abb.2.12 D,F,H).



**Abbildung 2-12: Die branchiomotorischen (bm) Neurone des *Nervus facialis* exprimieren Nkx6.1 und Nkx6.2 in Rhombomer (R) 4.** (A-D) Immunofluoreszenz Färbungen auf transversalen Schnitten durch R4 an Embryonaltag (E) 10.5 mit den Antikörpern Nkx6.2 (rot in A,B; grün in C,D), Nkx2.2 (grün in A), Isl1 (grün in B), und Nkx6.1 (rot in C). Nkx6.2 wird mit den Markern Nkx2.2 (gelbe Zellen in A), Isl1 (gelbe Zellen in B), und mit Nkx6.1 (gelbe Zellen in C) in R4 koexprimiert. Die Anzahl Nkx6.2-exprimierender Zellen und das Expressionslevel ist identisch bei wildtyp (Nkx6.1+/+) (C) und Nkx6.1 mutanten (Nkx6.1-/-) Mäusen (D). (E-H) *In situ* Hybridisierung mit einer Nkx6.2 RNS antisense Sonde auf wildtyp (E,G) und Nkx6.1 mutanten (F,H) Hirnstämmen. Am E11.0 (E,F) und E12.5 (G,H) ist Nkx6.2 in den bm Neuronen des *Nervus facialis* in R4 (E,F), aber nicht in den migrierenden Neuronen in R5 zu sehen (Bei den Nkx6.2-exprimierenden Zellen kaudal von R4 handelt es sich nicht um bm Neurone des *Nervus facialis*). Am E12.5 ist die Nkx6.2 Expression in R4 schwächer (G,H). Die Nkx6.2 Expression unterscheidet sich nicht zwischen wildtypen (E,G) und Nkx6.1 mutanten (F-H) Mäusen. Die bm Neurone des *Nervus trigeminus* (nV) exprimieren Nkx6.2 am E11.0 (E) und E12.5 (G) im wildtyp Hirnstamm.

Die Neurone des *Nervus trigeminus* waren bei Nkx6.1 mutanten Mäusen, auf Grund ihrer verstreuten Anordnung im Hirnstamm, mit dieser Methode offensichtlich nicht nachweisbar (Abb.2.12 H). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Nkx6.1 die Expression von Nkx6.2, im Gegensatz zum Rückenmark, im Hirnstamm nicht reprimiert.

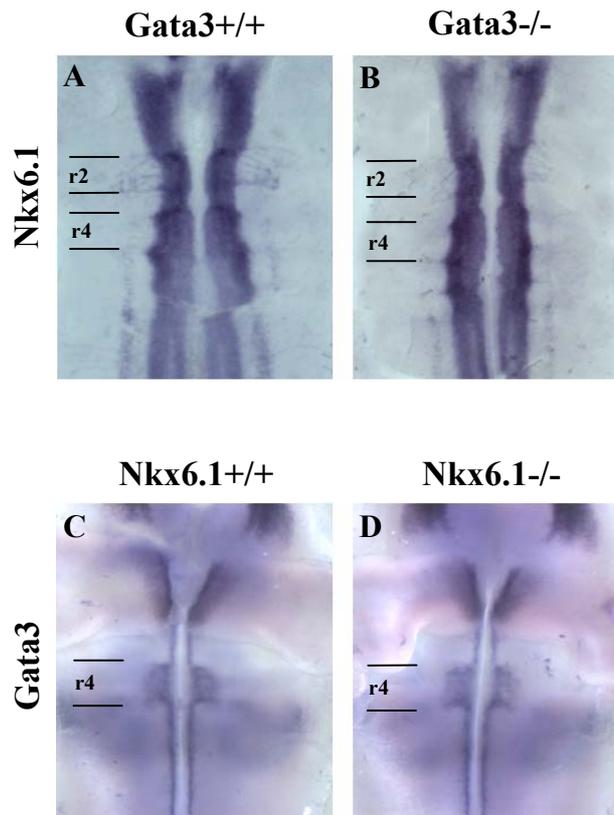
Wie auch der Beginn der ektopischen Expression von Ret und Unc5h3 in R4, korreliert der Rückgang der Nkx6.2 Expression in R4 an E11.0 zeitlich mit dem Auftreten des Migrationsdefekts bei Nkx6.1 mutanten Mäusen.

## **2.6 Expression von Hox, Gata und Ebf Transkriptionsfaktoren bei Nkx6.1 mutanten Mäusen**

Untersuchungen von Mausmutanten haben bereits zeigen können, dass auch andere Transkriptionsfaktoren das Migrationsverhalten der bm Neurone des *Nervus facialis* kontrollieren (Goddard, 1996; Studer, 1996). Eine solche Funktion wurde beispielsweise für die Transkriptionsfaktoren Hoxb1, Gata2, Gata3 und Ebf1 gezeigt (Garel, 2000; Nardelli, 1999; Pata, 1999). Im Folgenden wurde untersucht, ob Nkx6.1 in einer linearen genetischen Kaskade mit diesen Faktoren fungiert.

Um zu prüfen, ob Nkx6.1 durch Gata3 bzw. Ebf1 reguliert wird, wurde die Nkx6.1 Expression bei Gata3 bzw. Ebf1 mutanten Mäusen untersucht. Die Analyse der Gata3 bzw. Ebf1 Expression bei Nkx6.1 mutanten Mäusen sollte eine mögliche Regulation von Gata3 bzw. Ebf1 durch Nkx6.1 klären. Um diese Fragen zu beantworten, wurden *in situ* Hybridisierungen auf transversalen Schnitten durch R4 bzw. auf ganzen Hirnstämmen mit der jeweils entsprechenden antisense RNS Sonde von Nkx6.1, Gata3 und Ebf1 durchgeführt.

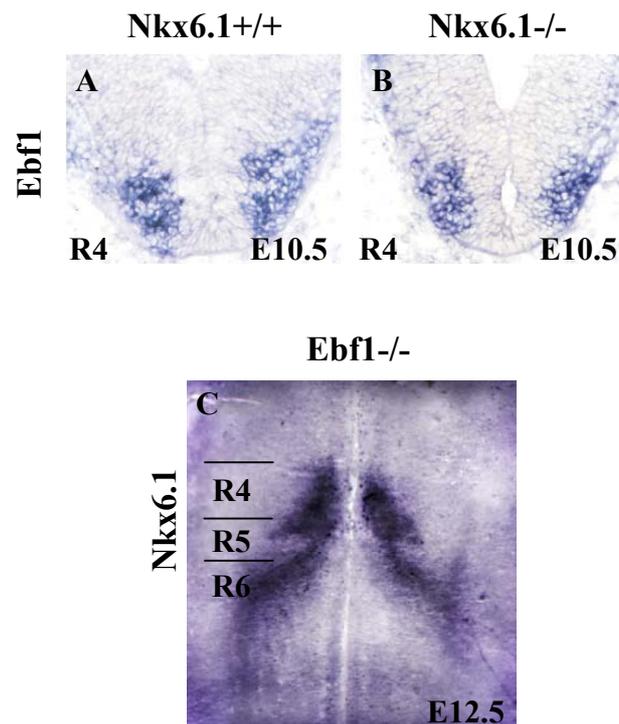
Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von Nkx6.1 am E10.5 auf Gata3 mutantem Hintergrund (Abb.2.13 B) identisch mit der Expression bei wildtyp Mäusen war (Abb.2.13 A). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei der Untersuchung der Gata3 Expression auf Nkx6.1 mutantem Hintergrund (Abb.12.13 C,D). Auch hier konnte kein Unterschied bei wildtyp und Nkx6.1 mutanten Mäusen festgestellt werden.



**Abbildung 2-13: Nkx6.1 wird nicht durch Gata3 reguliert und umgekehrt.** (A,B) *In situ* Hybridisierung mit einer Nkx6.1 RNS antisense Sonde auf wildtyp (Gata3+/+) (A) und Gata3 (B) mutantern (Gata3-/-) Hirnstamm am Embryonaltag (E) 10.5. Das Expressionsmuster ist identisch bei wildtyp und mutanten (C,D) Mäusen. *In situ* Hybridisierung mit einer Gata3 RNS antisense Sonde auf wildtyp (Nkx6.1+/+) (C) und Nkx6.1 mutanten (Nkx6.1-/-) (D) Hirnstämmen am E10.5. Auch hier ist kein Unterschied bei der Gata3 Expression zwischen wildtyp und mutanten Mäusen festzustellen.

Die Analyse der Ebf1 Expression zeigte, dass Ebf1 an E10.5 sowohl bei wildtyp (Abb.2.14 A) als auch bei Nkx6.1 mutanten Mäusen (Abb.2.14 B) in den bm Neuronen in R4 exprimiert wird. Die Expressionsanalyse von Nkx6.1 auf E12.5 alten Hirnstämmen Ebf1 mutanter Mäuse (Abb.2.14 C) ergab, dass Nkx6.1, wie bei wildtyp Mäusen (Abb.2.1 F), während der gesamten Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* von R4 bis R6 exprimiert war. Selbst in den bei der Ebf1 Mutante verfrüht in R5 dorsolateral wandernden Motoneuronen konnte Nkx6.1 nachgewiesen werden (Abb.2.14 C). Das zeigt, dass auch die Nkx6.1 Expression bei Ebf1 mutanten Mäusen nicht gestört war.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder Nkx6.1 die Expression der Transkriptionsfaktoren Gata3 und Ebf1 reguliert, noch wird die Expression von Nkx6.1 durch Gata3 und Ebf1 kontrolliert.



**Abbildung 2-14: Nkx6.1 wird nicht durch Ebf1 reguliert und umgekehrt.** (A,B) *In situ* Hybridisierung mit einer Ebf1 RNS antisense Sonde auf wildtyp (Nkx6.1+/+) (A) und Nkx6.1 mutantern (Nkx6.1-/-) (B) Hirnstamm am Embryonaltag (E) 10.5. Das Expressionsmuster ist identisch bei wildtyp und mutanten Mäusen. (C) *In situ* Hybridisierung mit einer Nkx6.1 RNS antisense Sonde auf Ebf1 mutantern (Ebf1-/-) Hirnstamm am E12.5. Nkx6.1 ist bei Ebf1 mutanten Mäusen während der Wanderung der branchiomotorischen Neurone des *Nervus facialis* exprimiert. In Abwesenheit von Ebf1 wandert ein Teil der Neurone bereits in R5 dorsolateral (C).

Obwohl also diese Mausmutanten ähnliche Migrationsdefekte aufweisen und im Falle von Ebf1 gleiche Zielgene regulieren, stehen Gata3 und Ebf1 nicht mit Nkx6.1 in einer direkten regulatorischen Kaskade.

### 3 Diskussion

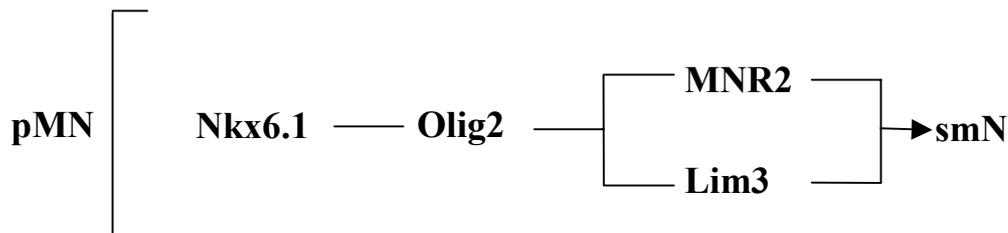
Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des Homeodomänen Transkriptionsfaktors Nkx6.1 bei der Entwicklung kranialer Motoneurone zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Nkx6.1 während der Embryonalentwicklung des Hirnstamms sowohl in Vorläuferzellen als auch in differenzierten kranialen Motoneuronen exprimiert wird. Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, welche Entwicklungsschritte durch das Fehlen von Nkx6.1 beeinträchtigt sind und mit welchen Faktoren Nkx6.1 möglicherweise zusammenwirkt. Kraniale Motoneurone wurden während der Embryonalentwicklung im Hinblick auf ihre Spezifizierung und Differenzierung, sowie deren Axonwegfindung und Migration bei wildtyp und Nkx6.1 mutanten Mäusen untersucht.

#### 3.1 Funktion von Nkx6.1 bei der Spezifizierung kranialer Motoneurone

Untersuchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass Nkx6.1 bei der frühen Spezifizierung neuronaler Vorläuferzellen eine entscheidende Rolle spielt. Aufgrund eines Spezifizierungsdefekts ist die Anzahl der sm Neurone bei Nkx6.1 mutanten Mäusen stark verringert (Briscoe, 2000; Sander, 2000; Vallstedt, 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass Nkx6.1 im Hirnstamm sowohl in den Vorläuferzellen als auch in den differenzierten Neuronen aller acht kranialer Hirnnerven exprimiert wird. Dabei ist Nkx6.1, ähnlich wie im Rückenmark, auch im Hirnstamm für die Spezifizierung der sm Vorläuferzellen verantwortlich. Ohne Nkx6.1 Aktivität werden weder die sm Neurone des *Nervus abducens* noch die des *Nervus hypoglossus* ausgebildet. Da auch im neonatalen Hirnstamm keine sm Neurone nachweisbar waren, kann man ausschließen, dass die Differenzierung der Neurone bei Nkx6.1 mutanten Embryonen lediglich verzögert ist. Nkx6.1 spielt demnach im Hirnstamm bei der Spezifizierung der sm Vorläuferzellen eine zum Rückenmark analoge Rolle.

Im Gegensatz zum Rückenmark werden sm Neurone im Hirnstamm jedoch nur in bestimmten Positionen entlang der AP-Achse, nämlich in R5 und R8, ausgebildet. Da Nkx6.1 jedoch entlang der gesamten AP-Achse in den ventralen Vorläuferzellen des Hirnstamms exprimiert wird, müssen andere Faktoren dafür verantwortlich sein, dass in R1–R4 und in R6–R7 keine sm Neurone gebildet werden. Untersuchungen im Rückenmark haben gezeigt, dass Nkx6.1 die Expression des bHLH Transkriptionsfaktors Olig2 induziert (Abb.3.1). Olig2 seinerseits

bewirkt durch Induktion der Transkriptionsfaktoren MNR2 und Lim3 die Differenzierung der sm Vorläuferzellen (Novitch, 2001b). Es wäre interessant zu untersuchen, ob diese durch Nkx6.1 induzierten Faktoren, wie Nkx6.1, einheitlich entlang der AP-Achse des Hirnstamms exprimiert werden, oder ob deren Expressionsmuster rhombomerspezifische Unterschiede aufweist. Diese Untersuchungen könnten möglicherweise klären, warum sm Neurone im Hirnstamm nur in bestimmten Rhombomeren gebildet werden.

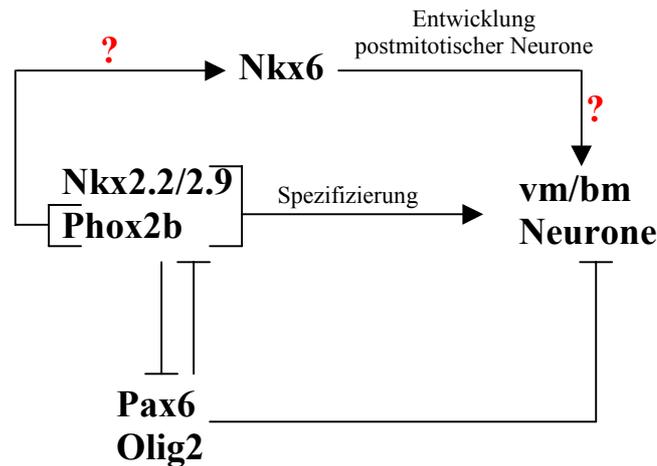


**Abbildung 3-1: Die Rolle von Nkx6.1 bei der Differenzierung somatomotorischer Neurone (smN) im Rückenmark.** In der Vorläuferzellen Domäne (pMN) initiiert Nkx6.1 die Bildung der sm Neurone indem es die Expression von Olig2 induziert. Die Induktion von MNR2 und Lim3 durch Olig2 bewirkt die Differenzierung der Vorläuferzellen zu sm Neuronen.

Weiterhin zeigen meine Untersuchungen, dass die Bildung der vm/bm Neurone, im Gegensatz zu den sm Neuronen, unabhängig von Nkx6.1 ist. Folgende Beobachtungen weisen darauf hin, dass diese Neurone tatsächlich korrekt als vm/bm Neurone spezifiziert sind. Zum Einen exprimierten die vm/bm Vorläuferzellen bei Nkx6.1 mutanten Embryonen die Transkriptionsfaktoren Nkx2.2 und Phox2b, die diese Domäne markieren. Des Weiteren wiesen auch neu differenzierte Neurone typische Charakteristika von vm/bm Neuronen auf, wie durch die korrekte Expression der Marker Phox2b, Phox2a, Hoxb1 und Ebf1 gezeigt werden konnte. Daher lassen die von mir durchgeführten Analysen vermuten, dass Nkx6.1 nicht für die frühe Entwicklung der vm/bm Neurone benötigt wird. Für diese Hypothese spricht auch die Beobachtung, dass die ektopische Expression von Nkx6.1 im dorsalen Rückenmark des Huhns nur sm, nicht aber vm/bm Neurone induziert (Briscoe, 2000; Vallstedt, 2001).

Demnach bleibt die Frage, welche Faktoren die Bildung von vm/bm Neuronen induzieren und welche Funktion Nkx6.1 bei der Entwicklung dieser Neuronenklassen hat. Die vm/bm Neurone im Hirnstamm werden aus der ventralen Nkx2.2-positiven Domäne gebildet, aus der im Rückenmark V3 Interneurone hervorgehen (Briscoe, 1999; Briscoe, 2000). Beide Neuronenklassen werden bei Nkx6.1 mutanten Mäusen normal ausgebildet. Eine Reihe von

Untersuchungen stützen die Hypothese, dass die Spezifizierung der V3 Interneurone im Rückenmark, sowie der vm/bm Neurone im Hirnstamm, durch den Transkriptionsfaktor Nkx2.2 kontrolliert wird (Abb.2.2). Zum Einen führt die bei Pax6 mutanten Mäusen beobachtete dorsale Expansion der Nkx2.2 Domäne im Hirnstamm zur ektopischen Bildung von vm/bm Neuronen an Stelle von sm Neuronen (Osumi, 1997; Ericson, 1997). Des Weiteren führt die ektopische Expression von Nkx2.2 im dorsalen Neuralrohr des Huhns zur Induktion von vm/bm Neuronen (Johan Ericson, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen schienen zunächst den Untersuchungen Nkx2.2 mutanter Mäuse zu widersprechen, da bei diesen Mäusen die vm/bm Neurone normal ausgebildet werden (Briscoe, 1999). Eine mögliche Erklärung für das Fehlen eines Phänotyps lieferte die Analyse der Expression des zu Nkx2.2 homologen Faktors Nkx2.9, der im Hirnstamm mit Nkx2.2 koexprimiert wird, (Briscoe et al., 2000; Briscoe et al., 1999; Pabst et al., 1998; Pabst et al., 2000). Bei der Entwicklung der kranialen vm/bm Neurone scheint aber auch der Transkriptionsfaktor Phox2b eine entscheidende Funktion auszuüben. Bei Phox2b mutanten Mäusen werden keine vm/bm Neurone im Hirnstamm gebildet (Pattyn, 1997), und die ektopische Expression von Phox2b im dorsalen Rückenmark induziert die Bildung von vm/bm Neuronen (Dubreuil, 2000). Interessanter Weise induziert die ektopische Expression von Phox2b im dorsalen Rückenmark die Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2, obwohl die Expression der Nkx6 Gene bei Phox2b mutanten Mäusen nicht gestört ist (Dubreuil, 2002). Das läßt vermuten, dass möglicherweise eine Kooperation zwischen den Nkx6 Faktoren und Phox2b die vm/bm Identität in postmitotischen Neuronen aufrechterhält, denn beide Transkriptionsfaktoren sind auch während der späten Entwicklung in postmitotischen vm/bm Neuronen exprimiert (Abb.2.2, Abb.2.4).

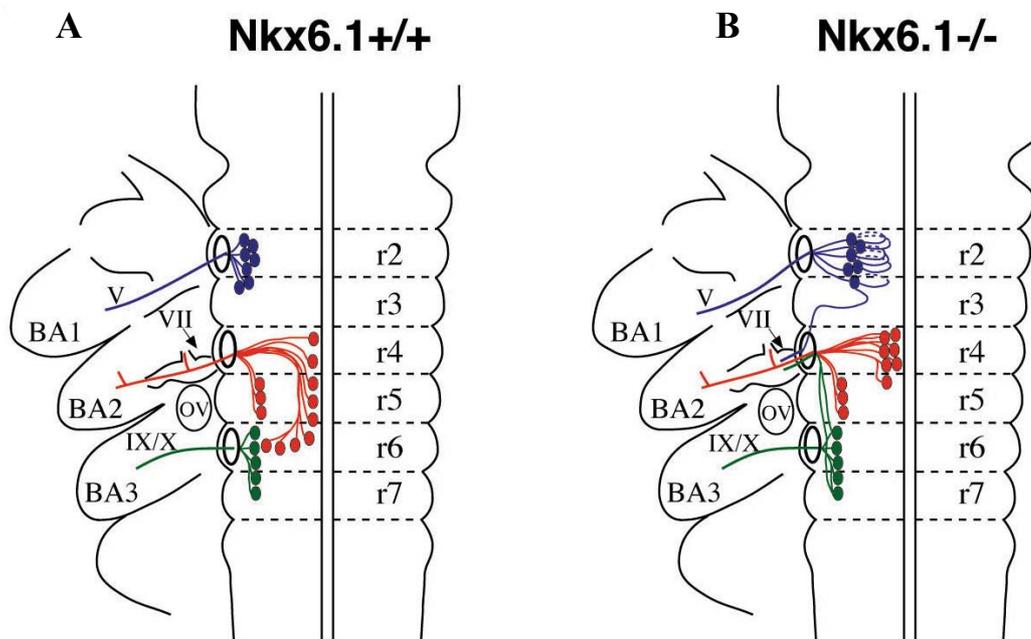


**Abbildung 3-2: Mögliche Interaktionen von Transkriptionsfaktoren bei der Spezifizierung und der Entwicklung postmitotischer viszero- und branchiomotorischer (vm/bm) Neurone.** Nkx2.2 und Phox2b, welche die vm/bm Identität induzieren, reprimieren die Expression von Pax6 und Olig2, welche ihrerseits die vm/bm Identität blockieren. Phox2b ist in der Lage, die Expression der Nkx6 Gene zu induzieren, die möglicherweise während der Entwicklung postmitotischer vm/bm Neurone eine Rolle spielen.

### 3.2 Funktion von Nkx6.1 bei der Migration branchiomotorischer Neurone

Meine Analysen haben gezeigt, dass Nkx6.1 in den bm Neuronen des *Nervus facialis* und des *Nervus trigeminus* während ihres gesamten Migrationsprozesses exprimiert wird und in diesen Kernen auch im neo- und postnatalen Hirnstamm nachgewiesen werden kann. Die Beobachtung bei Nkx6.1 mutanten Mäusen, dass die bm Neurone beider Nerven nicht richtig im Hirnstamm positioniert waren, ließ vermuten, dass möglicherweise die Migration der Neurone gestört war. Durch retrograde Markierung der Hirnnerven konnte diese Hypothese bestätigt werden indem gezeigt wurden, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* einen Defekt bei ihrer kaudalen Migration aufweisen. Der Großteil der bm Neurone des *Nervus facialis* war bei Nkx6.1 mutanten Embryonen in R4 vorzufinden. Nur wenige Neurone konnten in R5 nahe der Bodenplatte nachgewiesen werden (Abb.3.3). Im Gegensatz zu wildtyp Embryonen war bei Nkx6.1 mutanten Embryonen keine Migration in R6 zu beobachten. Zusätzlich konnte auch bei den bm Neuronen des *Nervus trigeminus* ein Migrationsdefekt nachgewiesen werden. Diese Neurone erreichten ihren dorsalen

Bestimmungsort in R2 nicht, sondern stoppten ihre Wanderung nach zwei Dritteln des Wegs (Abb.3.3).



**Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Migration und Axonwegfindung branchiomotorischer (bm) Neurone bei wildtyp (*Nkx6.1+/+*) und *Nkx6.1* mutanten (*Nkx6.1-/-*) Mäusen.** Nur eine frühe Population der bm Neurone des *Nervus facialis* (VII) wandert in die rostrale Hälfte von r5. Später differenzierte Neurone bleiben in r4. Neurone des *Nervus trigeminus* (V) wandern entlang sekundär ausgesandter Fortsätze nur 2/3 der üblichen Strecke. Einige Axone des *Nervus trigeminus* und des *Nucleus ambiguus* (IX/X) projizieren fälschlicherweise zur Austrittsstelle des *Nervus facialis* in r4, statt in r2 bzw. r6. OV, otic vesicle; BA1-3 (branchial arch), Kiemenbogen 1-3.

Im Folgenden werde ich den Zusammenhang zwischen dem beobachteten Migrationsdefekt und dem Fehlen von *Nkx6.1* diskutieren und mögliche Mechanismen besprechen, durch die die Migration der bm Neurone kontrolliert werden können. Die Diskussion beschränkt sich dabei hauptsächlich auf die bm Neurone des *Nervus facialis*, da über die Kontrolle der Migration dieser Neurone am meisten bekannt ist. Dies erleichtert es, die Funktion von *Nkx6.1* in den Kontext bereits diskutierter Modelle zu setzen.

Damit ein Neuron zum richtigen Zeitpunkt in die korrekte Richtung wandert und an der gewünschten Position die Migration stoppt, benötigt es einen ständigen Austausch mit der Umgebung, durch die es wandert (Hatten, 2002; Nadarajah, 2002; Parnavelas, 2000).

Untersuchungen der letzten zehn Jahre haben gezeigt, dass Neurone von äußeren Signalen entlang ihres Wegs geleitet werden und nicht allein einem zellintrinsischen Programm unterliegen. Die in der Einleitung näher beschriebenen Untersuchungen von M. Studer weisen darauf hin, dass auch die Initiation der Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* von der Umgebung bestimmt wird. In der genannten Untersuchung konnte mit Hilfe von Transplantationsexperimenten gezeigt werden, dass Signale aus R5 und R6 die tangentielle Wanderung dieser Neurone aus R4 in R5 induzieren (Studer, 2001). Daraus ergeben sich zwei verschiedene Modelle, die den durch Mutation von Nkx6.1 hervorgerufenen Migrationsdefekt klären könnten. Zum Einen könnten Veränderungen der Umgebung, durch die das Neuron wandert, dazu führen, dass das Neuron falsche Informationen bezüglich seiner Position erhält. Der Wanderungsdefekt des Neurons würde dann durch nicht-zellautonome bzw. extrinsische Veränderungen verursacht sein. Andererseits könnten durch die Abwesenheit von Nkx6.1 aber auch Entwicklungsprozesse im Neuron selbst betroffen sein. Solche zellautonomen bzw. zellintrinsischen Veränderungen könnten dazu führen, dass das Neuron nicht adäquat auf die Signale aus der Umgebung reagieren kann. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen sprechen aus folgenden Gründen als Ursache des Migrationsdefektes bei Nkx6.1 mutanten Mäusen gegen einen extrinsischen Defekt. Der direkteste Hinweis ist, dass Nkx6.1 spezifisch in den kranialen Motoneuronen, nicht aber in den umgebenden Zellen exprimiert ist. Weiterhin konnten auch keine direkten Veränderungen in der Umgebung des Neurons beobachtet werden. So erschien die makroskopische Morphologie der Rhombomere normal, weshalb das Fehlen eines gesamten Rhombomeresegments, wie es bei Krox20 und Kreisler mutanten Mäusen der Fall ist (Garel, 2000; Manzanares, 1999; McKay, 1994; Schneider-Maunoury, 1993; Seitanidou, 1997; Swiatek, 1993), ausgeschlossen werden kann. Zum Andern zeigte die Analyse der Marker Hoxb1 und EphA4, dass die Rhombomere R3, R4 und R5 bei Nkx6.1 mutanten Mäusen eine normale Identität aufweisen. Denkbar wäre auch, dass durch die Abwesenheit der sm Neurone des *Nervus abducens* in R5 bei Nkx6.1 mutanten Mäusen Signale fehlen, die von diesen Neuronen ausgehen und die für die Initiation der kaudalen Migration von R4 in R5 notwendig ist. Diese Möglichkeit scheint aber ebenfalls unwahrscheinlich, da die bm Neurone des *Nervus facialis* in Kreisler und Krox20 mutanten Mäusen sehr wohl kaudal wandern, obwohl bei diesen Mäusen R5 und somit der sm Kern des *Nervus abducens* fehlt (Garel, 2000; Manzanares, 1999; McKay, 1994; Schneider-Maunoury, 1993; Seitanidou, 1997; Swiatek, 1993). Die Ergebnisse sprechen demnach gegen die Möglichkeit, dass der Migrationsdefekt der bm Neurone des *Nervus facialis* dadurch bedingt ist, dass das Fehlen von Nkx6.1 die Umgebung der kranialen Motoneurone beeinflusst.

Daher soll nun eine mögliche zellautonome Funktion von Nkx6.1 diskutiert werden. Eine Möglichkeit, wie der Migrationsdefekt der bm Neurone ausgelöst werden könnte, wäre, dass die Bildung der Neurone zeitlich verzögert ist. So behindern z.B. Störungen bei der Zellteilung neuronaler Vorläuferzellen deren Migration von der Ventrikularzone zur Hirnrinde. Daraus entsteht die sogenannte Lissencephalie, eine Krankheit, bei der es zur Mißbildung der Hirnrinde kommt (Morris, 2000). Die Analyse des Markers für mitotische Zellen Ki67, sowie von Isl1, Phox2a und Phox2b, als Marker für neu gebildete bm Neurone zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen wildtyp und Nkx6.1 mutanten Embryonen. Diese Ergebnisse sprechen somit dagegen, dass der Migrationsdefekt durch Störungen im Zellzyklus ausgelöst wird. Wie bereits in Kapitel 3.1 diskutiert, waren charakteristische Marker für bm Neurone, wie Nkx2.2, Phox2b, Hoxb1 und Ebf1 bei Nkx6.1 mutanten Embryonen normal nachweisbar. Aus den genannten Gründen scheint ein früher Entwicklungs- oder Spezifizierungsfehler nicht für den Migrationsdefekt der bm Neurone verantwortlich zu sein.

Da Nkx6.1 jedoch bis zum Ende der Embryonalentwicklung in den postmitotischen bm Neuronen des *Nervus facialis* nachweisbar war, könnte Nkx6.1 auch die späte Entwicklung dieser Neurone beeinflussen. Daher wurden im Folgenden postmitotische Motoneuronen auf Veränderungen untersucht.

Arbeiten von S. Garel (Garel, 2000) hatten gezeigt, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* während ihrer Wanderung vom ventralen R4 ins dorsale R6 rhombomerspezifisch die Zelloberflächenmoleküle TAG-1, Ret und cad-8 exprimieren (Garel, 2000). Diese Zelloberflächenmoleküle spielen sowohl bei der tangentialen als auch bei der radialen Migration verschiedener Neuronenpopulationen im ZNS eine wichtige Rolle (Alcantara, 2000; Yee, 1999). Beispielsweise dienen TAG-1-exprimierende Kortifugal Fasern im *Telencephalon* als adhäsives Substrat, über das GABAerge Interneurone vom ventralen *Telencephalon* tangential ins dorsale *Telencephalon* wandern (Denaxa, 2001; Kyriakopoulou, 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ret die Migration kranialer parasymphatischer Neurone steuert (Enomoto, 2000). Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Zelloberflächenmoleküle auch bei der Wanderung der Neurone des *Nervus facialis* eine Rolle spielen könnten. Meine Untersuchungen haben gezeigt, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* neben TAG-1 und Ret (Garel, 2000) auch die Netrin-1 Rezeptoren Unc5h3 und Neogenin rhombomerspezifisch während ihrer Wanderung exprimieren, und dass Ret und Unc5h3 bei Nkx6.1 mutanten Mäusen ektopisch in R4 exprimiert werden (Abb.3.4). Dies zeigt, dass Nkx6.1 einer der Faktoren ist, der die Expression von Zelloberflächenmolekülen in

postmitotischen bm Neuronen reguliert. Einschränkend muß gesagt werden, dass sich eine solche regulatorische Funktion von Nkx6.1 definitiv nur für den Netrin-Rezeptor Unc5h3, nicht jedoch für Ret, nachweisen läßt. Unc5h3 konnte bei Nkx6.1 mutanten Mäusen bereits zu einem Zeitpunkt in den bm Neuronen des *Nervus facialis* nachgewiesen werden, zu dem bei wildtyp Mäusen noch kein Unc5h3 im Hirnstamm exprimiert wurde. Da Ret zum Zeitpunkt des Auftretens seiner verstärkten Expression in R4/R5 bei Nkx6.1 mutanten Mäusen aber auch schon bei wildtyp Embryonen schwach nachgewiesen werden konnte, könnte die beobachtete Expression in R4 auch eine Folge des Migrationsdefekts sein. Die ektopische Aktivierung von Unc5h3 unterstützt jedoch die Hypothese, dass Nkx6.1 eine zellautonome Funktion bei der Regulation der Expression von Zelloberflächenmolekülen in postmitotischen bm Neuronen hat.

Es ist jedoch unklar, ob es sich hierbei um eine direkte Repression der Expression von Unc5h3 durch Nkx6.1 oder ob es sich um indirekte über andere Faktoren vermittelte Effekte handelt. Da Unc5h3 in der späten Entwicklung mit Nkx6.1 in dorsolateral migrierenden bm Neuronen des *Nervus facialis* koexprimiert wird, erscheint eine direkte repressive Wirkung eher unwahrscheinlich. Des Weiteren klären die hier vorgestellten Ergebnisse nicht, welche Funktion die Zelloberflächenmoleküle bei der Migration haben und ob die molekularen Veränderungen im Nkx6.1 mutanten Hirnstamm Ursache des Migrationsdefekts sind. Mögliche Modelle für die Wirkung von Unc5h3 und Ret sollen im nächsten Kapitel besprochen werden.

### **3.3 Mögliche Funktion von Ret und Netrin-1 Rezeptoren bei der Migration branchiomotorischer Neurone des *Nervus facialis***

Die Expressionsdaten von Ret, Unc5h3 und Neogenin bei Nkx6.1 mutanten Mäusen haben gezeigt, dass deren Expression in Abwesenheit von Nkx6.1 verändert ist. Wie aber kann die veränderte Expression von Zelloberflächenmolekülen zu dem beobachteten Migrationsdefekt führen? Im Folgenden werde ich mögliche Modelle für die Kontrolle der Migration durch diese Zelloberflächenmolekülen an Hand des Beispiels der bm Neurone des *Nervus facialis* diskutieren. Da bisher keine molekularen Daten über direkte Interaktionen vorliegen muss vorangestellt werden, dass die folgenden Hypothesen rein spekulativ sind. Die Expressionsdaten werden im Kontext bereits veröffentlichter Literatur besprochen.

In der Einleitung sind bereits mehrere Beispiele von Untersuchungen genannt, in denen gezeigt wurde, dass Netrin-1 Rezeptoren eine entscheidende Funktion bei der Migration von

Neuronen zukommt (Ackerman, 1997; Astic, 2002; Przyborski, 1998). Netrin-1 hat dabei, in Abhängigkeit des Rezeptortyps, an den es bindet, sowohl attraktive als auch repulsive Eigenschaften. So bewirkt die Interaktion zwischen Netrin-1 und Unc5h3 eine repulsive Reaktion im Bezug zur Netrin-1 Quelle, während die Interaktion von Netrin-1 und DCC/Neogenin eine attraktive Antwort zur Folge hat (Ackerman, 1997; Przyborski, 1998). Weitere Studien haben gezeigt, dass Mitglieder der DCC Familie und der Unc5 Familie interagieren können und so eine chemoattraktive Antwort auf DCC in eine chemorepulsive Antwort transformieren (Hong, 1999). Untersuchungen bei der Fruchtfliege haben zu einem Modell geführt, nachdem die Koexpression von Unc5- und DCC-Familienmitgliedern eine „long range“ Repulsion bewirkt, während die Expression von Unc5 alleine eine „short range“ Repulsion zur Folge hat (Keleman, 2001). Dies bedeutet, dass sich Unc5/DCC koexprimierende Neurone über relativ weite Strecken von der Netrin-1 Quelle weg bewegen können, Neurone, die Unc5 allein exprimieren jedoch nur an der Kreuzung der Netrin-1-produzierenden Bodenplatte gehindert werden. Da Netrin-1 auch im murinen Hirnstamm von der Bodenplatte des Neuralrohrs sezerniert wird, könnte die von mir beobachtete Expression von Unc5h3 in den kaudal wandernden Neuronen des *Nervus facialis* analog zum Modell der Fruchtfliege ein Überqueren der Bodenplatte verhindern. In R6 exprimieren diese Neurone jedoch zusätzlich zu Unc5h3 das DCC-Homolog Neogenin. Möglicherweise erfordert, wieder analog zum Modell bei der Fruchtfliege, die dorsolaterale Wanderung weg von der Netrin-1 Quelle in R6 die Koexpression beider Rezeptoren. Mit dieser Vermutung stimmt überein, dass bei Nkx6.1 mutanten Mäusen, bei denen kein Neogenin nachgewiesen werden konnte, eine deutliche dorsolaterale Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis* am E12.5 ausbleibt. Zusätzlich wird die Hypothese auch dadurch unterstützt, dass die Neurone des *Nervus trigeminus* ebenfalls Neogenin und Unc5h3 während ihrer dorsolateralen Wanderung in R2 koexprimieren.

Zuletzt soll hier auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der ektopischen Expression von Unc5h3 und Ret in R4 und der Tatsache, dass die bm Neurone des *Nervus facialis* in Nkx6.1 mutantern Hirnstamm die R4/R5 Grenze nicht mehr kreuzen eingegangen werden. Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, wandern zwischen E10.5 und E10.75 bei Nkx6.1 mutanten Mäusen die bm Neurone des *Nervus facialis* von R4 in R5, während später keine weitere Migration von R4 in R5 beobachtet wurde. Interessanter Weise korreliert der Beginn der ersten ektopischen Expression von Unc5h3 und der verstärkten Expression von Ret in R4 mit dem Zeitpunkt, an dem bei Nkx6.1 mutanten Mäusen keine weiteren bm Neurone von R4 in R5 wandern (Abb.4.4). In weiteren Versuchen wäre es daher interessant zu testen, ob

Unc5h3 und Ret tatsächlich direkt an der Initiation der kaudalen Migration der bm Neurone des *Nervus facialis* beteiligt sind.

### 3.4 Axonwegfindungsdefekte bei Nkx6.1 mutanten Mäusen

Zusätzlich zu den beobachteten Migrationsdefekten wurden auch Axonwegfindungsdefekte bei Nkx6.1 mutanten Mäusen nachgewiesen. Einige der Motoneurone des *Nervus trigeminus* und des *Nucleus ambiguus* projizierten Axone fälschlicherweise zur Nervaustrittsstelle des *Nervus facialis* in R4 anstatt zur Nervaustrittsstelle in R2 bzw. R6 (Abb.4.3). Das zeigt, dass Nkx6.1 auch Aspekte der Axonwegfindung kontrolliert. Ähnlich wie die neuronale Migration, ist auch die Axonwegfindung abhängig von Signalen aus der Umgebung (Dickson, 2002a). Des Weiteren ist bekannt, dass die Axonwegfindung durch ähnliche Moleküle kontrolliert wird, wie die neuronale Migration (Stewart, 2002). Dennoch sind Axonwegfindung und neuronale Migration nicht zwingend gekoppelt. So weisen die bm Neurone des *Nervus facialis* zwar einen Migrationsdefekt auf, die Axone dieser Neurone verlassen den Hirnstamm aber korrekt in R4. Und obwohl meine Untersuchungen keine Defekte bei der Migration der bm Neurone des *Nucleus ambiguus* zeigen konnten, projizierten einige von ihnen fälschlicherweise rostral nach R4. Untersuchungen an Zebrafischen im Hinblick auf Migration und Axonwegfindung der bm Neurone haben gezeigt, dass die Wanderung der Neurone des *Nervus facialis* zellautonom durch den Hox-Kofaktor *lazarus/pbx4* gesteuert wird, während die Axonwegfindung der Neurone des *Nervus trigeminus* durch diesen Faktor nicht zellautonom kontrolliert wird (Cooper, 2002). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Migration und Axonwegfindung der bm Neurone durch verschiedene Mechanismen kontrolliert werden können.

Die von mir beobachteten Axonwegfindungsdefekte der Neurone des *Nervus trigeminus* sowie der Neurone des *Nucleus ambiguus* sind nicht komplett, d.h. nur einige der Neurone projizieren falsch, während der Großteil der Axone das ZNS an der richtigen Stelle verläßt. Das läßt vermuten, dass bei der Axonwegfindung möglicherweise andere Faktoren das Fehlen von Nkx6.1 kompensieren können. Ein potentieller Faktor, der diese Funktion ausüben könnte, ist das Nkx6.1 Homolog Nkx6.2. Beide Transkriptionsfaktoren sind beispielsweise in den bm Neuronen des *Nervus trigeminus* koexprimiert. Ein direkter genetischer Hinweis auf redundante Funktionen von Nkx6.1 und Nkx6.2 bei der Axonwegfindung lieferte die Analyse

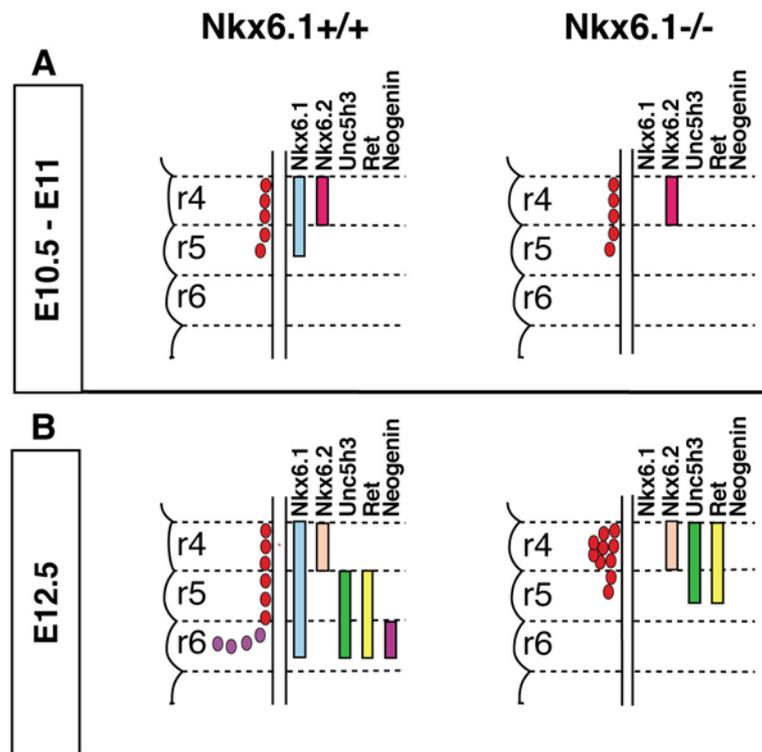
von Nkx6.1/Nkx6.2 Doppelmutanten, bei denen der beobachtete Axonwegfindungsdefekt gegenüber der Nkx6.1 Einzelmutante verstärkt ist (mündliche Mitteilungen J. Ericson).

Die Axone der kranialen Motoneurone projizieren nach Verlassen des Hirnstamms in den ersten, zweiten und dritten Kiemenbogen. Bei der Analyse Nkx6.1 mutanter Embryonen konnte ich keine Neurone detektieren, die nach Verlassen des Hirnstammes in einen falschen Kiemenbogen projizierten. Ob die Axone letztendlich den richtigen Zielmuskel innervieren, bleibt jedoch offen. Die Innervation des richtigen Zielmuskels entscheidet jedoch in vielen Fällen darüber, ob ein Neuron abstirbt oder weiterhin existiert. Transplantationsexperimente bei Hühnerembryonen haben gezeigt, dass die Anzahl der überlebenden Motoneurone linear mit der Anzahl der Axone korreliert, die den Zielmuskel innervieren (Hamburger, 1943; Hollyday, 1976). Da ich bei meiner Analyse eine Reduktion in der Anzahl der bm Neurone bei der späten Embryogenese feststellen konnte, wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Reduktion eine Folge dessen ist, dass einige Neurone ihren Zielmuskel nicht erreichen. Dies könnte mit Hilfe von anterograder Markierung der Hirnnerven überprüft werden.

### **3.5 Kontrolle der Migration branchiomotorischer Neurone des *Nervus facialis* durch weitere Transkriptionsfaktoren**

Meine Untersuchungen haben gezeigt, dass eine frühe Population (E10.5 - E11.0) der bm Neurone des *Nervus facialis* auch in Abwesenheit von Nkx6.1 die R4/R5 Grenze passiert, während später differenzierte Neurone (E11.0 – E12.5) in R4 bleiben. Die Vermutung liegt daher nahe, dass während der frühen Phase der Migration andere Faktoren das Fehlen von Nkx6.1 kompensieren können. Ich konnte nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor Nkx6.2 zwischen E10.5 und E12.5 in Vorläuferzellen und differenzierten bm Neuronen des *Nervus facialis* in R4 mit Nkx6.1 koexprimiert wird. Untersuchungen zur Entwicklung von Rückenmarksneuronen haben bereits zeigen können, dass Nkx6.2 die Abwesenheit von Nkx6.1 partiell kompensieren kann (Vallstedt, 2001). Deshalb könnte diese Redundanz auch bei der Entwicklung der bm Neurone des *Nervus facialis* im Hirnstamm funktionell von Bedeutung sein. Die Redundanzhypothese wird insofern durch meine Daten gestützt, da sie eine Korrelation zwischen dem Migrationsdefekt der bm Neurone des *Nervus facialis* und dem Expressionsmuster von Nkx6.2 zeigen. Nkx6.2 war, anders als Nkx6.1, nur in den Fazialis Neuronen in R4, jedoch nicht in den migrierenden Neuronen in R5 und R6 nachzuweisen (Abb. 4.4). Weiterhin ließ sich beobachten, dass die Stärke der Nkx6.2 Expression nach E11.0 abnahm. Dies ist genau der Zeitpunkt, an dem die bm Neurone des

*Nervus facialis* nicht mehr die R4/R5 Grenze überqueren. Diese Daten lassen folgende Hypothese zu: Es wäre möglich, dass die Konzentration von Nkx6.2 in R4 bei Nkx6.1 mutanten Embryonen bis zum E11.0 ausreicht, um die fehlende Expression von Nkx6.1 in R4 zu kompensieren, und um den bm Neuronen des *Nervus facialis* somit das Überqueren der R4/R5 Grenze zu ermöglichen. Mit abnehmender Nkx6.2 Konzentration ab E11.0 ist eine Kompensation von Nkx6.1 durch Nkx6.2 nicht mehr möglich, weshalb später differenzierte Neurone R4 nicht mehr verlassen.



**Abbildung 3-4: Unterschiede in der Molekülausstattung der branchiomotorischen (bm) Neurone des *Nervus facialis* während der kaudalen Migration bei wildtyp (Nkx6.1+/+) und Nkx6.1 mutanten (Nkx6.1-/-) Mäusen. (A) Zwischen Embryonaltag (E) 10.5 und E11.0 exprimieren die bm Neurone des *Nervus facialis* Nkx6.1 und Nkx6.2 in R4. Eine frühe Population der bm Neurone überquert die R4/R5 Grenze bei wildtyp sowie bei Nkx6.1 mutanten Embryonen. Weder Unc5h3 noch Ret werden zu diesem Entwicklungszeitpunkt exprimiert. (B) Zu späteren Entwicklungszeitpunkten wird Nkx6.2 nur noch schwach in den bm Neuronen in R4 exprimiert. Bei Nkx6.1 mutanten Mäusen wird Unc5h3 und Ret ektopisch in R4 exprimiert und die bm Neurone stagnieren in R4. Neogenin wird nur in den in R6 dorsolateral wandernden bm Neuronen bei wildtyp Embryonen exprimiert und fehlt bei Nkx6.1 mutanten Mäusen.**

Diese Hypothese wird durch die Analyse von Nkx6.1/Nkx6.2 Doppelmutanten unterstützt. Bei diesen Mausmutanten, bei denen die fehlende Funktion von Nkx6.1 nicht durch Nkx6.2

kompensiert werden kann, sind die bm Neurone des *Nervus facialis* ausschließlich in R4 nachweisbar (mündliche Mitteilungen J. Ericson). Allgemein ist die Redundanz zwischen zwei Faktoren ein häufig auftretendes Prinzip bei Eukaryonten. Es wird angenommen, dass redundante Funktionen zwischen Transkriptionsfaktoren, im Verlauf der Evolution zum Schutz vor Entwicklungsfehler für den Fall aufrecht erhalten wurden, dass einer der Faktoren nicht adäquat exprimiert wird. Abbildung 3.4 beschreibt zusammenfassend den Zusammenhang zwischen der Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2, der rhombomerespezifischen Expression der Zelloberflächenmoleküle Ret, Unc5h3 und Neogenin und der Migration der bm Neurone des *Nervus facialis* bei wildtyp und Nkx6.1 mutanten Mäusen.

Die Koexpression von Nkx6.1 und Nkx6.2 in R4 ist in sofern erstaunlich, da im Rückenmark die Expressionsdomäne von Nkx6.2 dorsal an die Expressionsdomäne von Nkx6.1 grenzt und Nkx6.1 die ventrale Expression von Nkx6.2 reprimiert. Meine Beobachtungen im Hirnstamm deutet darauf hin, dass die im Rückenmark beobachtete Repression keine direkte Repression auf Promotorebene darstellt. Möglicherweise wird die Repression von Nkx6.2 im Rückenmark durch andere Faktoren vermittelt, die in den kranialen Motoneuronen nicht vorhanden sind.

„Loss-of-function“ Experimente bei Mäusen haben gezeigt, dass außer Nkx6.1 auch andere Transkriptionsfaktoren, wie z.B Mitglieder der Hox-, Gata- und Ebf-Genfamilie, das Migrationsverhalten der bm Neurone des *Nervus facialis* kontrollieren. Daher stellt sich die Frage, ob Interaktionen zwischen Nkx6.1 und diesen Faktoren bestehen. Die Abwesenheit des Transkriptionsfaktors Hoxb1, der normalerweise spezifisch in R4 exprimiert wird, führt beispielsweise zu einer abnormalen Wanderung der bm Neurone des *Nervus facialis*. Die Neurone wandern nicht kaudal in R5 ein, sondern bleiben in R4, wo sie dorsolateral migrieren (Barrow, 1996; Gaufo, 2000; Gavalas, 1999; Goddard, 1996; Guthrie and Lumsden, 1991; Lumsden and Krumlauf, 1996; Studer, 1996). Hoxb1 reguliert die Expression von Gata2, und Gata2 wiederum die Expression von Gata3 (Nardelli, 1999). Auch bei Gata2 und Gata3 mutanten Mäusen wurden Migrationsdefekte der bm Neurone des *Nervus facialis* beschrieben (Pata, 1999). Meine Daten zeigen jedoch, dass Hoxb1 und Gata3 nicht in einer regulatorischen Kaskade mit Nkx6.1 wirken. Weder ist die Expression von Nkx6.1 auf Hoxb1 oder Gata3 mutantern Hintergrund gestört, noch beeinflusst die Nkx6.1 Mutation die Expression von Hoxb1 und Gata3. Interessant ist allerdings die Beobachtung, dass bei Nkx6.1/Nkx6.2 Doppelmutanten bis zum E10.5, wie in der Nkx6.1 Einzelmutante, die Expression von Hoxb1 normal ist, ab E11.0 aber weniger Hoxb1-positive Zellen in R4 zu

beobachten waren als bei wildtyp Mäusen (mündliche Mitteilung J. Ericson). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Nkx6 Faktoren zu späteren Entwicklungszeitpunkten für die Aufrechterhaltung der Hoxb1 Expression in R4 und damit auch für die Erhaltung der vm/bm Zellidentität verantwortlich sind. Dass weder bei Nkx6.1 noch bei Nkx6.2 Einzelmutanten dieser Defekt nachzuweisen war, bestätigt zusätzlich die Vermutung, dass die Faktoren teilweise redundante Funktionen haben.

Auch bei Mäusen, denen das Gen für den Transkriptionsfaktor Ebf1 fehlt, lassen sich Migrationsdefekte der bm Neurone des *Nervus facialis* beobachten (Garel, 2000). Ein Teil dieser Neurone wandert nicht in R6 sondern beginnt bereits in R5 eine dorsolaterale Wanderung, die normalerweise in R6 vollzogen wird. Wie bei Nkx6.1 mutanten Mäusen, wurde auch bei Ebf1 Mausmutanten eine ektopische Expression von Ret in R4 nachgewiesen. Das läßt vermuten, dass durch Nkx6.1 und Ebf1 möglicherweise gleiche Zielgene reguliert werden. Meine Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass weder die Expression von Ebf1 auf Nkx6.1 mutantern Hintergrund, noch die Expression von Nkx6.1 bei Ebf1 mutanten Mäusen verändert war. Daher kann man davon ausgehen, dass diese Transkriptionsfaktoren nicht in einer linearen regulatorischen Kaskade stehen. Es ist jedoch möglich, dass sie bei der Regulation bestimmter an der Migration beteiligter Prozesse innerhalb der Zelle zusammenwirken. Diese Hypothese ließe sich durch die Untersuchung des Migrationsverhaltens der bm Neurone des *Nervus facialis* in Nkx6.1/Ebf1 doppelt heterozygoter Mäuse überprüfen.

### 3.6 Ausblick

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- Nkx6.1 kontrolliert die Spezifizierung der sm Vorläuferzellen und die Differenzierung der sm Neurone im Hirnstamm.
- Nkx6.1 ist nicht für die Spezifizierung vm/bm Vorläuferzellen und für die Bildung dieser Neurone verantwortlich.
- Nkx6.1 kontrolliert die weitere Entwicklung postmitotischer bm Neurone, wie deren Migration und Wegfindung der Axone.
- Die Kontrolle der Migration erfolgt wahrscheinlich zellautonom über die Regulation der Expression von Zelloberflächenrezeptoren.

Durch die von mir durchgeführten Analysen entstanden aber auch neue Fragen, die an dieser Stelle offen bleiben und denen in Zukunft mit weiteren Untersuchungen nachgegangen werden soll. So ist beispielsweise nicht klar, ob der Migrationsdefekt tatsächlich eine direkte Folge der gestörten Expression der Zelloberflächenmoleküle Ret, Unc5h3 und Neogenin ist. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu untersuchen, in welchen Mustern diese Rezeptoren bei anderen Mausmutanten exprimiert sind, bei denen die Migration der bm Neurone gestört ist. Diese Untersuchungen könnten eine weitere Korrelation zwischen Migrationsverhalten und Misexpression der Rezeptoren aufzeigen, würden jedoch noch nicht eine direkte Kausalität beweisen. Dieser Frage könnte langfristig durch die Entwicklung eines Gewebekultursystems in vitro nachgegangen werden. Mit Hilfe eines solchen Systems ließe sich beispielsweise die Migration der bm Neurone in Hirnstammexplantaten unter dem Einfluß verschiedener Faktoren testen.

Eine weitere offene Frage ist, ob Nkx6.2 tatsächlich vollständig für die Funktion von Nkx6.1 kompensieren kann, oder ob diese Faktoren unterschiedliche Aktivität in vivo besitzen. Um dies zu untersuchen, wurden in unserem Labor mit Hilfe einer „knockin“ Strategie Mäuse hergestellt, bei denen Nkx6.2 an Stelle von Nkx6.1 im Nkx6.1 Locus exprimiert wird. Sollte Nkx6.2 in der Tat die selbe biologische Funktion wie Nkx6.1 haben, ist zu erwarten, dass bei homozygoten Nkx6.2 „knock in“ Mäusen die Migration der bm Neurone normal verläuft. Da die Herstellung dieser Mäuse bis dato jedoch noch nicht abgeschlossen ist, konnte ich diese Untersuchungen nicht in diese Arbeit integrieren.

## 4 Material

### 4.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen

Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
$\alpha$ <sup>32</sup> P-dCTP	Amersham-Pharmacia, UK
BSA	Sigma, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxy- und Ribonukleotide	Boehringer, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
DNSseI aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
DTT	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma, München
Glycerin	Carl Roth KG, Karlsruhe
Heringsspermien-DNS	Sigma, München
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Lachsspermien-DNS	Sigma, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
3MM-Papier	Whatman, Maidstone (USA)
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
PFA	Carl Roth KG, Karlsruhe
Phenol	Riedel-deHaen, Seelze
Paraformaldehyd	Carl Roth KG, Karlsruhe
Random Primers Labeling Kit	Gibco/BRL, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen	Gibco/BRL, Eggenstein
RNase aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim

Röntgenfilme (Biomax oder x-Omat Blue)	Kodak, Amersham-Pharmacia, UK
SDS	Serva, Heidelberg
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
T4-DNS-Ligase	Boehringer, Mannheim
Tris	Carl Roth KG, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
Salze und sonstige Chemikalien	Merck, Darmstadt,
MediumVectashield Fluoreszens Mounting	Vector, Alexis, Grünberg Deutschland

## 4.2 Zusammensetzung gebräuchlicher Medien und Lösungen

Denhardt's	1g Ficoll 400; 1g Polyvenylpyrrolidine; 1g BSA; auf 100ml ddH <sub>2</sub> O
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat: ddH <sub>2</sub> O 1:1000 Verdünnen. Vor dem autoklavieren ÜBER NACHT rühren.
LB-Medium	1 % Casein-Hydrolysat, 0,5 % Hefe Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glukose, pH7,0
PBS-Puffer	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub> 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
PCI	Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)
PFA Fixativ	4% Paraformaldehyde in PBS
SDS-Probenpuffer (2x)	50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 84 mM β-Mercaptoethanol
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumzitat pH7.0

TAE-Puffer (1X)

0,2 M Tris-Acetat, 10 mM EDTA pH8

1M Tris Puffer

121g Tris auf 800ml ddH<sub>2</sub>O. PH Wert  
einstellen. Auf 1L mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen.

### 4.3 Verwendete Sonden für *in situ* Hybridisierung

Gen	Ausgangsplasmid	Sondenherstellung (antisense)	Referenz
Ebfl	pBKS	Plasmidlinearisierung durch EcoRI-Verdau in vitro Transkription: T3-Polymerase	Garel et al. 1997
EphA4	pBKS	Plasmidlinearisierung durch XbaI-Verdau in vitro Transkription: T3-Polymerase	Gilardi- Hebenstreit et al., 1992
Gata3	pBSK	Plasmidlinearisierung durch EcoRI-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Pata et al.; 1999
Hoxb1	pBKS	Plasmidlinearisierung durch Cla-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Murphy et al.; 1989
Isl1	pBKS	Plasmidlinearisierung durch HindIII-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Osumi et al.; 1997
Isl2	pBKS	Plasmidlinearisierung durch HindIII-Verdau, in vitro Transkription: T3-Polymerase	Osumi et al.; 1997
Neogenin		PCR Fragment von bp 3369-4538 T7-Polymerase	Schenkung von Dieter Engelkamp
Nkx6.1	pBKS	Plasmidlinearisierung durch EcoRI-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Sander et al.; 2000

Gen	Ausgangsplasmid	Sondenherstellung (antisense)	Referenz
Nkx6.2	pBSK	Plasmidlinearisierung durch BamHI-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Genbank Accession Y09535
Peripherin	pBKS	Plasmidlinearisierung durch EcoRI-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Escurat et al.; 1999
Phox2a	pBKS	Plasmidlinearisierung durch SstII-Verdau in vitro Transkription: T3-Polymerase	Pattyn et al.; 1997
Phox2b	pBKS	Plasmidlinearisierung durch EcoRI-Verdau in vitro Transkription: T3-Polymerase	Pattyn et al.; 1997
Ret	pBKS	Plasmidlinearisierung durch NotI-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Pachnis et al.; 1993
TAG-1	pBKS	Plasmidlinearisierung durch XbaI-Verdau in vitro Transkription: T3-Polymerase	Wolfer et al.; 1998
Unc5h3		Plasmidlinearisierung durch NotI-Verdau in vitro Transkription: T7-Polymerase	Ackerman et al.; 1997

#### 4.4 Verwendete Mäusestämme

Die Nkx6.1 Null mutanten Mäuse wurden hergestellt wie beschrieben unter Sander et al., 2000b.

Nkx6.1 heterozygote C57Bl6/J Mäuse wurden zurückgekreuzt auf die Linie NMRI.

## 4.5 Verwendete Bakterienstämme

DH5 $\alpha$	New England Biolabs
XL1-Blue	New England Biolabs

## 4.6 Für Klonierungen verwendete Vektoren

pBluescript KS <sup>+</sup> /SK <sup>-</sup>	Klonierungsvektor der Firma Stratagen
PGEM-5Zf(+)	Klonierungsvektor der Firma Promega

## 4.7 Verwendete Antikörper

### 4.7.1 Primäre Antikörper

Anti-Neurofilament 160 2H3	Maus monoclonal unpurified supernatant; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB); Verdünnung 1:100
anti-Is11	Maus monoclonal purified protein (40.2D6); Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB); Verdünnung 1:100
anti-Ki67	Maus; Pharmingen; Verdünnung 1:100
anti-Mash1	Maus; Pharmingen; Verdünnung 1:100
anti- Nkx2.2	Maus monoclonal purified protein ; Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB); Verdünnung 1:100

---

anti-Nkx6.1	Kaninchen; Schenkung von Michael German; Verdünnung 1:10000
anti-Nkx6.2	Meerschweinchen; Schenkung von Johann Ericson Verdünnung 1:6000
anti-Phox2b	Kaninchen; Schenkung von Christo Goridis; Verdünnung 1:200

#### 4.7.2 Sekundäre Antikörper

Cy3-anti-Kaninchen	Ziege IgG(H+L); Jackson (11-165-144); Verdünnung 1:2000
Alexa 488-anti-Maus	Ziege IgG(H+L)F(ab') <sub>2</sub> Fragment; MoBiTec; Verdünnung 1:2000
Alexa488-anti-Meerschweinchen	Ziege IgG(H+L)F(ab') <sub>2</sub> Fragment; MoBiTec; Verdünnung 1:2000
Biotinlierter-anti-Maus	Ziege IgG(H+L); Vector; Verdünnung 1:200

# 5 Methoden

## 5.1 Herstellung und Aufbereitung von DNS-Fragmenten

### 5.1.1 Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden DNS-Moleküle durch Hydrolyse interner Phosphodiesterbindungen. Die Restriktion von DNS wurde in den vom Hersteller jeweils angegebenen Pufferlösungen durchgeführt. Die verwendeten Restriktionsendonucleasen schneiden innerhalb einer punktsymmetrischen Erkennungssequenz (Palindrom). Die Reaktionen inkubierten 1,5-2 h bei 37°C, es wurden in der Regel 1-2 U des Enzyms pro µg DNS eingesetzt. Durch Zugabe von Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) oder durch Erhitzen (im Falle nachfolgender Manipulation der DNS mit weiteren Enzymen) wurden die Reaktionen gestoppt.

### 5.1.2 Auftrennung von DNS-Molekülen im Agarosegel

DNS Moleküle werden in Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1xTAE gelöst (aufkochen) und Ethidiumbromid hinzugefügt (0,05µl/ml). Die Konzentration der Agarose war von der Größe der DNS-Moleküle Abhängig (0,8-2%). Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1xTAE benutzt. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und bei 80-100 mA elektrophoretisch aufgetrennt.

### 5.1.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennen der DNS wurde die DNS enthaltenen Agarosestücke unter UV-Licht bei 360 nm ausgeschnitten und die DNS unter Verwendung des NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel) nach Angabe des Herstellers aus der Agarose isoliert.

### 5.1.4 Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen

Die Konzentration wäßriger DNS-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Ultrospec 3000, Pharmacia). Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNS das Absorptionsmaximum. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNS sowie 20 µg/ml für einzelsträngige DNS und 40 µg/ml für RNS.

Zur Überprüfung der photometrisch ermittelten Meßergebnisse und zum exakten Abgleich kleinster DNS-Mengen wurden Aliquots der entsprechenden DNS-Lösungen zusammen mit Referenzproben bekannter Konzentration auf Ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen koelektrophoretisiert. Die Konzentrationen der einzelnen DNS-Lösungen konnten anhand der Fluoreszenz-Intensitäten miteinander verglichen werden.

### 5.1.5 Modifikation von DNS-Enden

#### 5.1.5.1 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Zur Entfernung von Phosphatgruppen am 5'-Ende von doppelsträngigen DNS-Molekülen wurden 1-5 pmol DNS in 44 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl 10x CIP-Puffer und 1 U alkalischer Phosphatase wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase wurde weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt. Die dephosphorylierte DNS wurde durch zweimalige Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt.

#### 5.1.5.2 Auffüllen überhängender 5'-Enden

Überhängende 5'-Enden wurden durch das Klenow-Fragment der *E. coli* DNS-Polymerase oder durch T4-Polymerase aufgefüllt. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,5-5 µg DNS-Fragment, 5 µl 10xNT-Puffer, 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 1 U T4 DNS-Polymerase sowie ddH<sub>2</sub>O ad 50 µl. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Erhitzen beendet und das DNS-Fragment unter Verwendung des NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel) isoliert.

#### 5.1.6 Herstellung von DNS-Fragmenten mittels "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNS-Sequenzen. Hierzu wird eine doppelsträngige DNS (Template-DNS) denaturiert und an den entstehenden komplementären DNS-Einzelsträngen zwei Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNS) flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNS-Polymerase werden, ausgehend von den entsprechenden Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNS-Stränge synthetisiert. Eine repetitive Folge von Template-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Verlängerung der Primer durch die thermostabile DNS-Polymerase führt zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNS, deren Enden durch die Primer festgelegt sind.

Zur Herstellung von DNS-Fragmenten wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 ng Template-DNS, 2,5 µl 20xPCR-Reaktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 8,3; 1 M KCl), 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 pMol von jedem Primer, 4 µl 2,5 mM dNTP-Mix, 1 U Taq-Polymerase mit ddH<sub>2</sub>O zu einem Reaktionsvolumen von 50 µl kombiniert. Der Ansatz wurde für 1 min bei 94°C inkubiert und durchlief dann 25-40 mal im PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) einen Zyklus aus Denaturierung (94°C, 1 min), Hybridisierung (bei geeigneter Temperatur und Dauer) und Polymerasereaktion (72°C und geeignete Dauer).

Die Hybridisierungstemperatur der Primer ist abhängig vom GC Gehalt der Oligonucleotide. Die Dauer der Polymerasereaktion richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Als Abschluß der PCR wurde der Ansatz für 5 min bei 72°C inkubiert und auf RT gekühlt.

## 5.2 Klonierung von DNS-Fragmenten

### 5.2.1 Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearer Vektor-DNS wurde die Plasmid-DNS mit einem Restriktionsenzym oder einer Kombination zweier Restriktionsenzyme gespalten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert. Anschließend wurde die DNS über einer Säule des NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel) aufgereinigt. Zur Verhinderung einer Religation von Vektor-DNS, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert worden war, wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

### 5.2.2 Ligation von DNS-Fragmenten mit Vektoren

Die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNS-Fragment wurde durch die T4-DNS-Ligase katalysiert. Dazu wurden 40 ng Vektor-DNS mit einem drei- bis fünffachen molaren Überschuß des zu ligierenden Fragmentes in 10 µl Ligase-Puffer mit 1 U der T4-DNS-Ligase über Nacht bei 14°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen des *E. coli*-Stammes DH5α eingesetzt.

### 5.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Amplifizierung und Isolierung von DNS-Fragmenten erfolgte wie unter 5.1.6 und 5.1.3 beschrieben. Überhängende 5'-Enden der synthetisierten DNS-Fragmente wurden mit T4 DNS-Polymerase aufgefüllt. Enthielten die zur PCR eingesetzten Primer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, so wurden die Fragmente anschließend mit den betreffenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und konnten dann in Plasmide kloniert werden. PCR-Fragmente, die mit Primern hergestellt wurden, die keine Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthielten, wurden über glatte Enden in Plasmide kloniert.

#### 5.2.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Gegenstände und Lösungen verwendet.

Von einer Glycerinkultur des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurden circa 10  $\mu$ l auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurde eine einzelne Kolonie zum Animpfen einer 5 ml Vorkultur benutzt, die wiederum über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 150 ml LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine OD<sub>600</sub> von 0,45-0,5 erreicht hat. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 2.000 Upm 5 min abzentrifugiert (Zentrifuge J2-21 M/E Rotor JA14, Beckman) und der Überstand vorsichtig abgeschüttelt. Die Zellen wurden in 45 ml kaltem TFB 1-Puffer (100 mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM KOAc; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % Glycerin, pH 5,8; sterilfiltriert) resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde bei 2.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 6 ml kaltem TFB 2-Puffer (10 mM MOPS pH 8,0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin; autoklaviert) aufgenommen und in Aliquots bei -70°C eingefroren.

#### 5.2.5 Transformation von Bakterienzellen

Die bei -80°C aufbewahrten kompetenten Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend zu den jeweiligen Ligationsansätzen gegeben. Diese Zellsuspension wurde 15 min bei 0°C inkubiert, anschließend einer Hitzebehandlung von 60 sec bei 42°C unterzogen und sofort wieder im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l LB-Medium wurden die Bakterien 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Kolonien wurde als Flüssigkultur in analytischem Maßstab angezüchtet und die isolierte Plasmid-DNS durch Restriktionsverdau und anschließende Gelelektrophorese analysiert.

### 5.2.6 Sequenzierung von DNS

DNS-Sequenzierung wurde mit einem ABI Prism 377 DNS-Sequencer (Perkin Elmer) unter Verwendung des ABI-Prism-Dye-Cycle-Sequenzierung-Ready-Reaction-Dit (Perkin Elmer) und Standard-Primern nach Angaben des Herstellers freundlicherweise von der Sequenz Service Station im ZMNH durchgeführt. Die Auswertung wurde mit dem Computerprogramm SeqManII (DNS-Star) vorgenommen.

## 5.3 Isolierung und Reinigung von DNS

### 5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNS Maxipräparation (LifeTechnologies Plasmid Maxiprep System)

Zur Herstellung einer Bakterien-Vorkultur wurden 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 8-12 h bei 37°C mit 200 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 150 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit der Vorkultur versetzt und 16 h bei 37°C mit 200 Upm geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde in Zentrifugenbecher (Beckman) überführt und 15 min bei 6.000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, Rotor JA14, Beckman), 4°C. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Zellsuspensionspuffer E1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNase A, pH 8) resuspendiert und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Anschließend wurden 10 ml Zellysepuffer E2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugegeben, die beiden Lösungen gut gemischt und das Bakterienlysat 5 min bei RT inkubiert. Nach Mischen mit 10 ml Neutralisierungspuffer E3 (2,8 M KOAc pH 5,2), wurde die Suspension 10 min bei 13,500 Upm, RT, zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, Rotor JA 20, Beckman) und in der Zwischenzeit die Säule mit 30 ml Äquilibrierungspuffer<sup>4</sup> E4 (100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 15 % Ethanol; 900 mM KCl, pH 6,3) äquilibriert. Der Überstand wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben, und nach dem Durchlauf wurde die Säule mit 60 ml Waschpuffer E5 (100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 15 % Ethanol; 1150 mM KCl, pH 6,3) gewaschen. Die Plasmid-DNS konnte nun mit 15 ml Elutionspuffer E6 (100 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 15 % Ethanol; 1 M KCl, pH 8,5) eluiert

werden. Durch Zugabe von 0,8 Vol Isopropanol wurde die Plasmid-DNS 10 min bei RT gefällt und 30 min bei 13,500 Upm (Zentrifuge J2-21M/E, Rotor JA20, Beckman) abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und bei 4°C 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde abpipettiert, das Pellet 10 min getrocknet und in 200-500µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Danach kann die Konzentration wie unter 5.1.4 beschrieben bestimmt werden.

### **5.3.2 Isolierung von Plasmid-DNS in analytischem Maßstab (Minipräparation)**

2 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterien-Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 12 h bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde abzentrifugiert(14000 Upm) und das Pellet in ca. 0,1 ml Restlösung resuspendiert. Die Suspension wurde mit 0,35 ml STET (1 mM Tris; 0,1 mM EDTA; 0,1 N NaOH; 0,5 % SDS) versetzt und gevortext. Nach Zugabe von 20µl Lysozym (20mg/ml) und kurzem Mischen (nicht vortexen) wurde die Suspension 2 min bei 95° inkubiert und dann 10 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl Phenol und 400µl Isopropanol versetzt. Nach 10 minütiger Zentrifugation, anschließendem Waschen des Niederschlages mit 70 % Ethanol und 5 minütiger Trocknung wurde das Pellet in 100µl ddH<sub>2</sub>O mit RNase (20 µg/ml) gelöst. Von diesem Ansatz wurden 5 µl für Restriktionsanalysen und 2,5 µl für Sequenzanalysen eingesetzt.

### **5.3.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion und Ethanolfällung**

Zur Entfernung von Proteinen aus wäßrigen DNS-Lösungen wurden diese mit 1 Vol einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung wurde durch eine kurze Zentrifugation beschleunigt (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417). Aus der oberen wäßrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je 1 Vol Chloroform die restliche Phenollösung entfernt. Durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaOAc, pH 4,8 und 2,5 Vol Ethanol wurde die DNS 30 min bei -70°C gefällt. Zur Präzipitation kleiner DNS-Fragmente wurde zusätzlich 0,01 Vol einer 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Die Fällung erfolgte hier über Nacht bei -20°C. Das durch Zentrifugation erhaltene DNS-

Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **5.3.4 Isolierung von genomischer DNS aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung mittels PCR**

Die Schwanzspitzen (ca. 0,5 cm) wurden jeweils mit 18 µl Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 20 mM NaCl; 1% SDS) und 2µl Proteinase K (20mg/ml) in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße (mit Schnappverschluss) überführt und die Ansätze über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 10 µl RNase A (10 mg/ml) zugefügt und die Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch 5 minütige Inkubation bei 95°C gestoppt und zur weiteren Verwendung ca. 500 µl H<sub>2</sub>O zugefügt. Die Proben wurden bis zur Genotypisierung bei 4°C aufbewahrt. Sollten die Proben besonders rein vorliegen, wurden die Ansätze mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und für 30-60 min kopfüber rotiert. Anschließend erfolgte Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 15,000 Upm zur Phasentrennung. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert. Um die DNS zu fällen, wurden zum Überstand 50 µl 3 M Na-Acetat, pH 7,0 zugefügt, gemischt und die Mischungen für 15 min bei 4°C mit 15,000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Danach erfolgte Waschen der DNS-Pellets mit 500 µl 70% Ethanol. Die DNS-Pellets wurden kurz getrocknet (5 min mit offenem Deckel bei 50°C) und jeweils in 200-400 µl TE resuspendiert.

#### **5.3.5 Isolierung von genomischer DNS aus Embryonalem Gewebe zur Genotypisierung mittels „Southern blot“.**

Das Gewebe wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 650 µl Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% SDS) überführt, 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt und bei 55°C unter Schütteln ÜBER NACHT resuspendiert. War nur wenig DNS zu erwarten (bei Verdau der Amnionhülle) wurde 1Vol Isopropanol zugefügt und die genomische DNS durch 10 maliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gefällt. Beim Verdau großer Gewebestücke sollten die Proteine durch

Phenol-Chloroform Fällung entfernt werden. Zur Entfernung der Proteine wurde die DNS mit 1 Vol einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Lösung (25:24:1) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung wurde durch eine kurze Zentrifugation beschleunigt (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417). Aus der oberen wäßrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je 1 Vol CI die restliche Phenollösung entfernt. Die DNS wurde dann mit 1 Vol Isopropanol gefällt. Das DNS Pellet erhält man entweder durch Zentrifugation (Geringe DNS Mengen) oder indem man die DNS mit einer Pipettenspitze herausfischt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde dann mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen TE aufgenommen. Damit sich die genomische DNS besser löst, wurde sie ca. 2h bei 55°C geschüttelt und vor der Weiterverarbeitung mindestens ÜBER NACHT bei 4°C inkubiert.

## **5.4 Identifizierung von DNS-Fragmenten durch Hybridisierung**

### **5.4.1 DNS-Transfer von Agarose-Gelen auf Membranen (Southern-Blot)**

Nachdem die genomische DNS mit einem spezifischen Restriktionsenzym zerlegt worden war, wurden die Proben auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und ca. 16h (ÜBER NACHT) bei 40 V durch Gelelektrophorese, wie unter 5.1.3 beschrieben, aufgetrennt.

Das Gel wurde bis zur Gelb- bzw. Grünfärbung der Bromphenolblau- bzw. Xylenxylanolbande, jedoch mindestens 30 min im vierfachen Volumen 0,2 N HCl inkubiert. Dieser Schritt führt zur Depurinierung und anschließender Spaltung der DNS-Fragmente. Dadurch verbessert sich der Transfer langer (> 5 kbp) DNS-Fragmente. Danach wurde das Gel kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für 30 min im zehnfachen Volumen Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) inkubiert. Hierdurch wird die DNS in hybridisierbare Einzelstränge denaturiert. Dann folgten 30 min und nach Pufferwechsel weitere 15 min Inkubation im zehnfachen Volumen Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl, pH 7; 1,5 M NaCl). Anschließend wurde das Gel 30 min im zehnfachen Volumen 10x SSC äquilibriert. Währenddessen ist eine Nylon-Membran (Schleicher & Schuell) 5 min unter ddH<sub>2</sub>O befeuchtet und dann 10 min in 10x SSC äquilibriert worden. Die Membran wurde in der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Der Transfer der DNS auf die Membran erfolgte für mindestens 36h durch Kapillarkraft. Das Gel wurde hierfür auf einen Whatman 3MM

Papierstreifen gelegt, der mit den Enden in 10 x SSC Lösung ragt. Auf das Gel wurde eine Nitrozellulose-Membran gelegt. Darüber folgten 3 Whatman 3MM Papiere und ein Stapel Haushaltspapier. Der Stapel wurde mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Als Transferpuffer ist 10 x SSC verwendet worden. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran 30 min in 2 x SSC geschwenkt und 10 min getrocknet. Die Fixierung der transferierten DNS an die Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung der Membran im UV-Crosslinker (Stratagene).

#### **5.4.2 Hybridisierung von DNS nach Transfer auf Membranen**

Die Southern-geblottete Nylon-Membran wurde in eine 100 ml Glasröhre (Schott) transferiert und in 5-10 ml Express-Hyb Lösung 30 min bei 63°C prähybridisiert. Danach erfolgte Zugabe von  $\approx 1 \times 10^6$  cpm [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP markierter DNS-Sonde (s. 5.4.3) pro ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierung lief für 2 h bei 63°C. Danach wurde die unspezifisch gebundene Sonde durch 2 kurze Waschschrte durch schütteln in Lösung 1 (2x SSC/0,5 % SDS), dann für 2-5 x 30 min bei 63°C in Lösung 2 (0.2%SSC, 0.1%SDS) abgewaschen. Die Membran wurde im feuchten Zustand in Saran-Folie eingeschlagen und bei -70 °C unter Verwendung eines Röntgenfilms (NEN) und einer signalverstärkenden Folie 1 bis 5 d exponiert.

#### **5.4.3 Herstellung der radioaktiv markierter DNS Proben**

Diese Methode erzeugt markierte DNS mit besonders hoher spezifischer Aktivität (bis  $10^9$  cpm/ $\mu$ g). 5-25 ng DNS wurden in 40  $\mu$ l TE aufgenommen und durch 5 minütiges Kochen denaturiert. Durch schnelles Abkühlen auf 0°C wurde das Rehybridisieren der Einzelstränge verhindert. Der Ansatz wurde dann zusammen mit 5  $\mu$ l  $\alpha$ - $^{32}$ P in ein Reaktionsgefäß des Rediprime II kit von Amersham pepitiert. Dieses Kit enthält sowohl dNTP's, Klenow-Enzym als auch „Random-Primer“ zur Synthese der radioaktiv markierten DNS. Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert, danach mit 5 $\mu$ l 0,2 M EDTA abgestoppt und 5 min zur Denaturierung bei 100°C erhitzt. Zur Verhinderung der Renaturierung wurde die Probe bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

## **5.5 *In situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen und Gewebeschnitten**

Für alle Versuche wurde der Mausstamm der Linie Nkx6.1 x NMRI verwendet. Für Embryonen wurde der Tag nach dem Auftreten des Vaginalverschlusses als Tag 0.5 postcoitum (E0.5) festgelegt.

### **5.5.1 Herstellung von Embryopuder**

Einige E10.5-14.5 Embryonen wurden in PBS bei 4°C homogenisiert. Dann erfolgte die Zugabe von 3 vol 100% Ethanol und Zentrifugation bei 10,000 Upm (Eppendorf Zentrifuge, 5415C). Das Pellet wurde auf Parafilm getrocknet und dann zu Puder zermörsert. Die Lagerung des Puders erfolgte bei -20°C.

### **5.5.2 Synthese von DIG markierten RNS Sonden durch *in vitro* Transkription**

Zur Detektion von mRNA durch *in situ* Hybridisierung wird die komplementäre RNS als Sonde eingesetzt. Als Matrize für die Transkription dieser RNS-Sonde verwendet man die cDNS der zu detektierenden mRNA. Die cDNS-Sequenz liegt in der von RNS-Polymerase Promotoren (T3, T7 oder SP6) flankierten multiplen Klonierungstelle eines Plasmids.

Für die Transkription einer komplementären RNS-Sonde wurde das Plasmid stromaufwärts der cDNS-Sequenz mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Das Enzym sollte glatte oder 5'-Überhang Schnittenden hinterlassen. Dadurch wird die Transkription von Plasmid-DNS unterbunden. Die linearisierte DNS wurde mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel) nach Angabe des Herstellers aus der Agarose isoliert und auf 1 µg/µl DNS-Konzentration eingestellt. Die Polymerase-Reaktion erfolgte mit dem „DIG RNS Labeling Kit“ (Roche, Mannheim) an 1 µg DNS. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers und mit der geeigneten RNS-Polymerase angesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Zum Abbau der DNS-Matrize folgte ein DNase-Verdau für 15 min bei 37°C mit DNaseI (Roche, Mannheim). Zur Fällung der DIG-markierten RNS wurde zur Probe 2,5 µl LiCl (4 M) und 75 µl vorgekühltes 100% Ethanol gemischt und für 30 min bei -80°C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (4°C, 20 min, 15,000 Upm, Eppendorf

Tischzentrifuge, 5415C) und das RNS-Pellet nach Waschen unter 70% Ethanol in 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O Depc aufgenommen. Der Probe wurde zusätzlich noch 1  $\mu$ l RNase Inhibitor zugefügt.

### 5.5.3 Prähybridisierung von Gesamtembryonen

Die Embryonen wurden nach der Präparation über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und danach 2 x 15 min mit PBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation in einer aufsteigenden Methanolreihe (25 % Methanol, 50 % Methanol, 75 % Methanol in PBST; 100 % Methanol) bei RT für jeweils 5 min. Die Lagerung der Embryonen erfolgte bei -20°C in 100 % Methanol. Die folgenden Schritte fanden in 4 ml Zellkulturfläschchen (Wheaton) statt. Zur weiteren Verwendung der Embryonen erfolgte zunächst die Rehydrierung der Embryonen durch eine Methanolreihe (75 % Methanol, 50 % Methanol, 25 % Methanol in PBST) bei RT für jeweils 5 min. Das Auswaschen des Methanols erfolgte für 2 mal 5 min in PBST bei RT. Die Körperhöhlen der Embryonen wurden mit einer dünnen Pinzette aufgestochen. Anschließend erfolgte eine Bleichung in 2 % Wasserstoffperoxid in PBST für 60 min bei RT, im Dunkeln. Danach wurden die Embryonen 3 mal 5 min in PBST gewaschen und anschließend mit Proteinase K (Roche, 20  $\mu$ g/ml in PBST) bei RT für 10 - 20 min (je nach Alter des Embryos) inkubiert. Der Verdau wurde durch 2 maliges Waschen der Embryonen in 2 mg/ml Glycin in PBST für je 5 min gestoppt. Es folgte eine Refixierung (0,25 % Glutaraldehyd; 4 % Paraformaldehyd, PBS) der Embryonen für 30 min bei RT und dann 2 maliges Waschen für 5 min in PBST. Prähybridisiert wurde für mindestens 1h bei ca. 70°C (abhängig von der zu verwendenden RNS-Sonde) in Hybridisierungslösung (50 % Formamid; 5x SSC; 50  $\mu$ g/ml Heparin; 50  $\mu$ g/ml denaturierte Hefe t-RNS; 1% SDS).

### 5.5.4 Hybridisierung an Gesamtembryonen und Signaldetektion

Von der DIG-markierten RNS-Sonde wurden 3  $\mu$ l/ml Hybridisierungslösung gegeben. Die Embryonen hybridisierten bei 60-70°C (abhängig von der verwendeten Sonde) für ca. 18 h. Danach wurde 2 mal für 30 min in vorgewärmter Lösung I (50 % Formamid; 5x SSC; 1% SDS) bei 70°C inkubiert und anschließend für 10 min in einer vorgewärmten 1:1 Mischung aus Lösung I und II (0,5 M NaCl; 10 mM Tris, pH 7,5; 0,1 % Tween-20) bei 70°C

äquiliibriert. Die Embryonen wurden dann 3 x 5 min bei RT in Lösung II inkubiert. Der RNase-Verdau fand 2 mal für 30 min in RNase-Lösung (100µg/ml) bei 37 °C statt. Dann wurden die Embryonen ein mal 5 min in Lösung II und 5 min in Lösung III (50 % Formamid; 2x SSC; 0,5%SDS) bei RT inkubiert. Anschließend 2x bei 65°C in Lösung III und 3 x 5 min bei RT in TBST (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 25 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 % Tween-20).

(In der Zwischenzeit wurde zur Inaktivierung von Proteinasen eine Spatelspitze Embryopuder in 2 ml TBST für 30 min auf 70°C erhitzt. Danach erfolgte Pelletierung des Puders durch Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes. Das Pellet wurde dann auf 4°C gekühlt und in 500 µl 1 % FCS (hitzeinaktiviert)/TBST resuspendiert.) Der Embryo wurde in 10% Normal Goat Serum (NGS) in TBST für 1h 30min bei RT geblockt. Nach Zugabe des AP-gekoppelten anti DIG-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 in 1% NGS in TBST erfolgte eine Inkubation der Embryonen über Nacht bei 4°C in der Antikörperlösung unter Bewegung. Die Embryonen wurden danach bei RT in TBST 3 mal für 5 min und dann 8 mal für 20 min gewaschen. Die Embryonen verblieben über Nacht in TBST. Am nächsten Tag erfolgte die Färbung der Embryonen. Zunächst wurden die Embryonen 2 mal für 10 min in frisch angesetztem NTMT Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Tween, 100 mM Tris, pH 9,5) bei RT äquiliibriert.

Die Signaldetektion erfolgte durch enzymatische Färbung. Hierzu wurden die Embryonen in einer Färbelösung (90 mM NBT; 110 mM X-Phosphat, AP-Puffer) bis zum gewünschten Färbegrad bei RT und Lichtausschluß inkubiert. Die Färbereaktion ist durch mehrmaliges Waschen in TBST gestoppt worden. Danach erfolgte ein Waschschrift in TBST über Nacht. Zur Dokumentation des Signals wurden die Embryonen durch Inkubationen bei 4°C in 50 % Glycerol/PBS für 1 h und anschließend über Nacht in 80% Glycerol/PBS geklärt.

### 5.5.5 Hybridisierung auf Gewebeschnitten und Signaldetektion

Zur Herstellung einer *in situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten, wurde die DIG markierte DNS Probe 1:200 mit dem Hybridisierungspuffer verdünnt und dann 5-10 min bei 70°C denaturiert. In der Zwischenzeit wurden die Gefrierschnitte aufgetaut. Auf jeden Objektträger wurde 100 µl Probenmix pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Die Gefrierschnitte wurden ÜBER NACHT bei ca. 65°C (abhängig von der Probe) in einer geschlossenen, mit 5 x SSC und 50% Formamid getränkten Kassette, hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in einer Waschlösung (1 x SSC, 50% Formamid, 0,1% Tween20) 3 x 30 min bei

65°C und anschließend 2X 30 min bei RT in MABT (100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH7,5, 0,1 Tween20) gewaschen. Um die Gefrierschnitte zu blocken wurde auf jeden Objektträger 600µl Blocklösung (MABT, 2% Boehringer Blocking Reagent, 20%iges hitzeinaktiviertes NGS (20 min bei 56°C)) pipettiert und 1h inkubiert. Der anti-DIG Antikörper wurde 1:2500 in der Blocklösung verdünnt, auf die Objektträger pipettiert und ÜBER NACHT in einer geschlossenen, feuchten Kammer bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 5 x 20 min bei RT in MABT und anschließend 2 x 10 min bei RT im Alkaline-Phosphatase (AP) -Puffer (100mM NaCl, 50mM MgCl, 100mM Tris pH 7.9, 0,1% Tween20, 0,5 mg/ml Levamisol) gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte durch enzymatische Färbung. Hierzu wurden die Objektträger mit einer Färbelösung (3,5µl NBT/ml AP-Puffer; 3,5µl X-Phosphat/ml AP-Puffer ) bis zum gewünschten Färbegrad (1-3 d) bei RT und Lichtausschluß inkubiert. Die Färbereaktion ist durch mehrmaliges Waschen in H<sub>2</sub>O gestoppt worden. Nach der Färbung wurden die Gefrierschnitte getrocknet und mit Entellan gedeckelt.

## 5.6 Immunohistochemie

### 5.6.1 Immunofluoreszenz Färbungen

Zur Detektion eines Proteins über einen spezifischen Antikörper wurden Gefrierschnitte oder dehydrierte Paraffinschnitte verwendet. Zur Permeabilisierung der Zellkernmembran können in Paraffin fixierte Gewebeschnitte 2 x 5 min in einer Citratlösung (Na-Citrat, 10mM) in der Mikrowelle gekocht werden, während Gefrierschnitte, um den selben Effekt zu erlangen, 2-12h bei 70°C in PBS inkubiert wurden. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden daraufhin bis zur weiteren Behandlung in PBS bei RT gelagert. Das Gewebe wurde 30 min in 1-5%igem NGS in PBST bei RT geblockt und dann ÜBER NACHT bei 4°C mit dem primären Antikörper (verdünnt in 1-5%igem NGS) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte 1h bei RT mit dem sekundären, fluoreszierenden Antikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, mußte die Kammer abgedunkelt werden. Abschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min in PBS gewaschen und mit einem Mounting Medium

(Vectashield) gedeckelt. Dann erfolgte die Detektion der Fluoreszenz unter dem Mikroskop (Zeiss Axiophot mit Fluoreszenzeinrichtung bzw. Konfokales Lasermikroskop).

(Spezielle Behandlung des Phox2b Antikörpers: Blockierungsschritt und Verdünnung der Antikörper nicht in NGS sonder in Fetal Calf Serum (FCS)).

### **5.6.2 Peroxidase Färbung**

Die Antikörperreaktion erfolgt wie unter 5.6.1 beschrieben mit dem Unterschied, dass die Schnitte vor dem Blockierungsschritt 15 min bei RT in einer Wasserstoffperoxid Lösung (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 250ml Methanol) inkubiert wurden, um endogene Peroxidasen zu zerstören. Die Detektion durch den sekundären Antikörper erfolgte in diesem Fall durch einen biotinierten Antikörper. Während der Inkubation des sekundären Antikörpers wurde der Peroxidase Vectastain ABC Kit von Alexis vorbereitet. Dazu wurde 1 Tropfen der Lösung A und 1 Tropfen der Lösung B in 5ml PBS gefügt, gemischt und für mindestens 30 min bei RT geschüttelt. Nachdem die Gewebeschnitte 2 x 5 min in PBS gewaschen worden waren, wurden sie 90 min in der ABC Lösung inkubiert. Zur Vorbereitung der Färbelösung wurde eine DAB (3,3'-Diaminobenzidine) Tablette und ein Ure Hydrogen Peroxid Tablette (bei Sigma Fast DAB Tablet Set) in 5ml H<sub>2</sub>O gelöst und die Lösung dann filtriert. Die ABC Lösung wurde durch zweimaliges Waschen in PBS entfernt und die Objektträger danach in eine 0,1M Tris Lösung (pH7,4) überführt. Für die Färbereaktion wurde die DAB Lösung auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die Färbung trat nach 1-10 min ein und durch mehrmaliges Waschen in H<sub>2</sub>O abgebrochen. Die Schnitte wurden dann in einer Alkoholreihe für jeweils 1 min pro Schritt entwässert (70% Ethanol, 2 x 95% Ethanol, 2 x 100% Ethanol, 2 x Xylol). Nach dem letzten Xylol Schritt wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) beträufelt und blasenfrei gedeckelt.

### **5.6.3 Immunohistochemie auf ganzen Embryonen und Signaldetektion**

Die Embryonen werden wie unter 5.5.3 beschrieben fixiert und können in 100% Methanol gelagert werden.

Zur Bleichung des Embryos und Zerstörung von endogenen Peroxidasen wurde die Embryonen 3-5h in einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Methanol 1: 5) inkubiert. Danach erfolgte eine Rehydrierung des Gewebes in einer Methanol/PBS Reihe, jeweils 2 x 25 min pro Schritt

(Methanol:PBS, 3:2, 2:1, 1:1 1:2, 1:3, 100% PBS). Die Embryonen wurden dann 2 x 1h in PBSMT (2% Milchpulver, 0.1% Triton-X100 in PBS) bei RT geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper, 1:4 in PBSMT verdünnt, inkubiert. Die Waschschriffe erfolgten 2 x 1h bei 4°C in PBSMT und 3 x bei RT in PBSMT. Die Embryonen werden ÜBER NACHT mit einem biotinilieren sekundären Antikörper bei 4°C inkubiert. Der Antikörper wurde 1:200 in PBSMT verdünnt. Erneut erfolgten die gleiche Waschschriffe wie oben beschrieben. Dann wurde das Gewebe erst 20 min in PBT (0,2% BSA, 0,1% Triton-X100 in PBS) und dann 3 x 20 min in PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde der Peroxidase Vectastain ABC kit von Alexis und die DAB Lösung, wie unter 5.6.2 beschrieben, vorbereitet. Um den Embryo mit DAB zu sättigen wurde er vor der Färbereaktion mit DAB Lösung ohne Urea Hydrogen Peroxid 20 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Färbereaktion durch 1-5 minütiger Inkubation in DAB Lösung. Die Reaktion wurde durch fünfmaliges waschen in PBS gestoppt und die Embryonen in 4% PFA fixiert. Zur Visualisierung des Signals wurde der Embryo flach auf einen Objektträger gelegt und unter einem Zeiss Stemi-2000-C Binocular detektiert.

## **5.7 Fixierung und Weiterverarbeitung von Embryonen**

### **5.7.1 Perfusion von Mäusen**

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 1ml 4,5% igem Chloralhydrat narkotisiert. Die Tiere wurden von der Bauchseite aufgeschnitten, das Herz freigelegt, eine Kanüle von unten durch die linke Herzkammer in die Kopfaorta geschoben und mit einer Klemme festgesteckt. An die Kanüle war eine Pumpe mit Heparinlösung (physiologische Kochsalzlösung, 0,01% Heparin, 2% Dextran) angeschlossen (Pumpgeschwindigkeit 210). Ein Schnitt in den rechten Vorhof verhindert das Aufstauen von Heparin Lösung im Herz. Nachdem 20 ml Heparin Lösung durchspült worden war, wurde eine 4%ige Paraformaldehyd (PFA) Lösung in PBS and die Pumpe angeschlossen. Hiervon wurden 150 ml für die Perfusion eingesetzt. Danach wurden die Embryonen bzw. die fixierten Organe heraus präpariert und über Nacht bei 4°C in 4% PFA/PBS Lösung gelagert.

### 5.7.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Die Embryonen wurden nach der Präparation 2h–18h (je nach Alter des Embryos) bei 4°C in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und danach 2 x 15 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in 30% Sucrose (PBS) bei 4°C inkubiert. Nach Absinken der Embryonen wurden sie in TissueTek (Sakura) eingebettet und in einem Ethanol/Trockeneis Bad eingefroren. Die Embryonen können so mehrere Monate bei –80°C gelagert werden. Dann wurden im Kryostat (2800 Frig-Cut E, Reichert-Jung) bei –20°C Gefrierschnitte von 10 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschichteten Objektträger aufgezogen, getrocknet und dann bei –80°C gelagert oder sofort verwendet.

### 5.7.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Embryonen wurden nach der Präparation 2h–18h (je nach Alter des Embryos) bei 4°C in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und danach 2 x 15 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in Paraffin Einbettkassetten (Histosettes) überführt und dehydriert. Dazu werden die Embryonen jeweils 30 min in einer Alkoholreihe (50%Ethanol, 70% Ethanol, 2x95% Ethanol, 2x99% Ethanol, 100% Ethanol, 3x100% Xylen) inkubiert. In 70% Ethanol können die Embryonen einige Tage bei 4°C gelagert werden. Danach wurden die Embryonen 3 x 12h in flüssigem Paraffin bei 65°C inkubiert. Die Embryonen wurden dann in Metallformen, in der richtigen Position eingebettet, indem das Paraffin erkaltete. Am Mikrotom (Leika) wurden Paraffinschnitte von 5-10 µm angefertigt. Diese wurden zur Glättung auf die Wasseroberfläche eines Wasserbades überführt und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

Für immunohistologische Untersuchungen oder *in situ* Hybridisierungen muss das Paraffin vorher wieder entfernt werden. Dazu werden die Objektträger mit den Paraffinschnitten jeweils 2 min in einer Alkoholreihe (2 x Xylen, 2 x 100% Ethanol, 2 x 95% Ethanol, 2 x 70% Ethanol, 50% Ethanol, H<sub>2</sub>O) inkubiert.

#### 5.7.4 Präparation der embryonalen Hirnstämme

10.5–12.5 Tage alte Embryone wurden aus dem Uterus der Muttermaus und anschließend aus der Amnionhülle präpariert und wie unter 5.5.3 beschrieben fixiert. Der in 100% Methanol gelagerte Embryo wurde rehydriert (5.5.3) und danach auf der dorsalen Seite in anteroposteriorer Richtung, parallel zum Neuralrohr aufgeschnitten. Mit einem Skalpell wurde das gesamte Gewebe ventral vom Neuralrohr entfernt. Restgewebe wurde vorsichtig mit zwei Pinzetten bis zu den Hirnhäuten abgezogen, so dass nur der dorsal aufgeschnittene Hirnstamm zurück blieb. So präparierte Hirnstämme wurde bei anschließenden *in situ* Hybridisierungen wie unter 5.5.3, 5.5.4 beschrieben weiter behandelt. Zur Visualisierung der Hybridisierungssignale wurde der Hirnstamm flach auf einen Objektträger gelegt, ein Deckglas aufgelegt und bei Durchlicht unter einem Zeiss Stemi-2000-C Binocular detektiert. Die Rhombomergrenzen lassen sich morphologisch durch Einstülpungen im Gewebe erkennen. Weitere Orientierungspunkte sind die Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze und das otische Vesikel, welches in Höhe von R5 bis zum rostralen Drittel von R6 nachzuweisen ist.

#### 5.8 Retrograde Markierung der kranialen Nerven

11.5 – 13.5 Tage alte Embryonen wurden aus dem Uterus präpariert und über Nacht bei 4°C in 4% PFA in PBS fixiert. Zur retrograden Markierung von Hirnnerven wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiI (1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat) (Molekular Probes) benutzt. Hierzu wurden, DiI getränkte Filterstreifen an die Nervaustrittsstelle des *Nervus trigeminus* (V), *Nervus facialis* (VII) und *Nervus glossopharyngeus/vagus* Nerv gelegt. DiI ist ein lipophiler Fluoreszenzfarbstoff, der sich in der Lipidproteindoppelschicht der Nervenzelle löst und anschließend durch Diffusion in der Plasmamembran entlang der Axone bis in die Zellkörper transportiert wird. Nach 2-5 Tagen wurden die Hirnstämme wie unter 5.7.4 beschrieben präpariert und auf ein Objektträger mit Glycerol überführt. Die Visualisierung der Fluoreszenz Signale fand an einem konfokalen Mikroskop statt (Biorad Radiance 2000).

## 6 Literaturverzeichnis

- Ackerman, S.L., Kozak, L.P., Przyborski, S.A., Rund, L.A., Boyer, B.B., Knowles, B.B. (1997) The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5 like protein. *Nature* 388, 833-838.
- Alcantara, S.R., M.; De Castro, F.; Soriano, E.; Sotelo, C. (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127, 1359-1372.
- Altman, J.a.B., S. A. (1982) Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 74, 1-90.
- Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J. M. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 222, 629-634.
- Anderson, S.A., Eisenstat D.D., Shi, L., Rubenstein, J.L. (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474-476.
- Ashwell, K.W.a.W., C. R. (1983) The development of facial motoneurons in the mouse--neuronal death and the innervation of the facial muscles. *J Embryol Exp Morphol* 77, 117-41.
- Astic, L., Pellier-Monnin, V., Saucier, D., Charrier, C., Mehlen, P. (2002) Expression of Netrin-1 and netrin receptor, DCC, in the rat olfactory nerve pathway during development and axonal regeneration. *Neuroscience* 109, 643-56.
- Auclair, F., Valdes, N. and Marchand, R. (1996) Rhombomere-specific origin of branchial and visceral motoneurons of the facial nerve in the rat embryo. *J Comp Neurol* 369, 451-61.
- Awatramani, R., Beesley, J., Yang, H., Jiang, H., Cambi, F., Grinspan, J., Garbern, J. and Kamholz, J. (2000) *Gtx*, an oligodendrocyte-specific homeodomain protein, has repressor activity. *J Neurosci Res* 61, 376-87.
- Baloh, R.T.e.a. (1998) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family supports peripheral and central neurons and signals through the GFR alpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21, 1291-1302.
- Barrow, J.R., Capecchi, M.R. (1996) Targeted disruption of *Hoxb-2* locus in mice interferes with expression of *Hoxb-1* and *Hoxb-4*. *Development* 122, 3817-28.
- Bertrand, N. (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-530.
- Biben, C., Palmer, S., Elliott, D.A. and Harvey, R.P. (1997) Homeobox genes and heart development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 395-403.
- Bloch-Gallego, E.E., F.; Tessier-Lavigne, M.; Sotelo, C. (1999) Floor plate and Netrin-1 involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *Journ Neurosci* 19, 4407-4420.
- Briscoe, J. and Ericson, J. (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11, 43-9.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M. and Ericson, J. (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-45.
- 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.

- Buttiglione, M.R.J., Pavlou O, Karagogeos D, Furley A, Rougon G, Faivre-Sarrailh C. (1998) A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. *Development* 126, 6853-70.
- Cai, J., St Amand, T., Yin, H., Guo, H., Li, G., Zhang, Y., Chen, Y. and Qiu, M. (1999) Expression and regulation of the chicken Nkx-6.2 homeobox gene suggest its possible involvement in the ventral neural patterning and cell fate specification. *Dev Dyn* 216, 459-68.
- Cai, J.e.a. (2001) Mice lacking der Nkx6.2 (Gtx) homeodomain transcription factor develop and reproduce normally. *Mol Cell Biol* 21, 4399-4403.
- Carpenter, E.M., Goddard, J.M., Chisaka, O., Manley, N.R. and Capecchi, M.R. (1993) Loss of Hox-A1 (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* 118, 1063-75.
- Casanova, B.a. (2002).
- Chen, Y.H., Huang, L., Russo, A.F., Solursh, M. (1992) Retinoic acid is enriched in Hensen's node in the early chicken embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10056-9.
- Cooper, K.L.a.M., C.B. (2002) Autonomous and non-autonomous functions for Hox/Pbx in cranial motor neuron development. In *Development of the spinal cord and neural crest*, (ed.Keystone, Colorado).
- Cordes, S.P., Barsh, G.S. (1994) The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* 79, 1025-1034.
- Davenne, M., Maconochi, M.K., Neun, R. (1999) Hoxa2 and Hoxb2 control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* 22, 677-691.
- Denaxa, M., Chang, C.H., Schachner, M., Parnavelas J.G., Karagogeos, D. (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128, 4635-4644.
- Dickson, B.J. (2002a) Molecular mechanism of axon guidance. *Science* 298, 1959-64.
- Dickson, B.J., Keleman, K. (2002b) Netrins. *Curr Biol* 12.
- Dodd, J., Morton, S.S., Karagogeos, D., Yamamoto, M., Jessel, T.M. (1988) Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1, 105-116.
- Dubreuil, V., Hirsch, M.R., Jouve, C., Brunet, J.F., Goridis, C. (2002) The role of Phox2b in synchronizing pan-neuronal and type specific aspects of neurogenesis. *Development* 129, 5241-5253.
- Dubreuil, V., Hirsch, M.R., Pattyn, A., Brunet, J.F., Goridis, C. (2000) The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity. *Development* 127, 5191-5201.
- Durbec, P.L., Larsson-Bromberg, L.B., Schuchardt, A., Costantini, F., and Pachnis, V. (1996b) Common origin and developmental dependence on c-ret of subset of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122, 349-358.
- Engelkamp, D. (2002) Cloning of three mouse *Unc5* genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech Dev* 118, 191-7.
- Enomoto, H.e.a. (2000) Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential action of GDNF and neurturin. *Development* 127, 4877-89.
- Enomoto, H.e.a. (2001) RET signalling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development* 128, 3963-74.
- 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.

- Flint, A.c., Kriegstein, A.R. (1997) Mechanism underlying neuronal migration disorders and epilepsy. *Curr Opin Neurobiol* 10, 92-97.
- Frasch, M., Chen, X., Lufkin, t. (1995) Evolutionary conserved enhancers direct region specific expression of the murin *Hoxa-1* and *Hoxa-2* loci in both mice and *Drosophila*. *Development* 121, 957-974.
- Fritsch, B.a.N., D. H. (1993) *DiI* reveals a prenatal arrival of efferents at the differentiating otocyst of mice. *Hear Res* 65, 51-60.
- Gad, J.M., Keeling, S. L., Wilks, A.F., Tan, S.S., Cooper, h:M. (1997) The expression pattern of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Dev Biol* 192, 258-273.
- Garel, S., Garcia-Dominguez, M. and Charnay, P. (2000) Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development* 127, 5297-307.
- Gaufo, G.O., Flodby, P., Capecchi, M.R., (2000) *Hoxb1* controls effectors of sonic hedgehog and *Mash1* signalling pathway. *Development* 127, 5343-54.
- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P. and Rijli, F.M. (1997) Role of *Hoxa-2* in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* 124, 3693-702.
- Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A. (1999) *Hoxa1* and *hoxb1* synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* 125, 1123-1136.
- Gehring, W.J. (1987) Homeoboxes in the study of development. *Science* 236, 1245-52.
- Gehring, W.J. (1998) Master control genes in the development and evolution: the homeobox story. Yale University press, New Haven and London.
- Gehring, W.J., Affolter, M., Burling, T. (1994b) Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 487-526.
- Gehring, W.J., Aian, YQ., Billeter, M., Furukubo-Tokonata, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., Wuthrich, K. (1994a) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.
- Goddard, J.M., Rossel, M., Manley, N. R. and Capecchi, M. R. (1996) Mice with targeted disruption of *Hoxb-1* fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* 122, 3217-28.
- Golden, J., Zitz, J., McFadden, K., Cepko, C. (1997) Cell migration in the developing chick diencephalon. *Development* 124, 3522-3533.
- Guthrie, S. and Lumsden, A. (1991) Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development* 112, 221-9.
- Hamburger, V. (1943) The effect of wing bud extirpation on the development of the cranial nervous system in chick embryos. *J Exp Zool* 68, 449-494.
- Hatten, M.E. (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 511-539.
- Hatten, M.E. (2002) New directions in neuronal migration. *Science* 297, 1660-3.
- Hatten, M.E., Heintz, N. (1998) Neurogenesis and migration. *Fundamentals of Neuroscience*, Academic Press, New York.
- Hatten, M.E., Mason, C.A. (1990) Mechanism of glia guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 46, 907-916.
- Hedgecock, G.M., Culotti, J.G., Hall, D. (1990) The *unc-5*, *unc-6* and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *c. elegans*. *Neuron* 4, 61-85.
- Hogan, B.L.M., Thaller, C., Eichele, G. (1992) Evidence that Hensen's node is a site of retinoic acid synthesis. *Nature* 359, 237-241.

- Hollyday, M., Hamburger, V. (1976) Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J Comp Neurol* 170, 311-320.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M. and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97, 927-41.
- Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., Hedgecock, E.M. (1992) UNC-6, a laminin related protein, guides cell and pioneer axon migration. *Neuron* 9, 873-881.
- Jacquin, T., et al (1996) Reorganisation of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron* 17, 747-758.
- Jensen, J., Serup, P., Karlsen, C., Nielsen, T.F. and Madsen, O.D. (1996) mRNA profiling of rat islet tumors reveals nkx 6.1 as a beta-cell-specific homeodomain transcription factor. *J Biol Chem* 271, 18749-58.
- Jessel, T.M. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1, 20-29.
- Jungbluth, S., Bell, E., Lumsden, A. (1999) Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. *Development* 126, 2751-2758.
- Keeling, S.L., Gad, J.M., Cooper, H.M. (1997) Mouse Neogenin, a DCC like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis. *Oncogene* 15, 691-700.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996) Deleted in Colateral Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.
- Keleman, K.a.D., B. J. (2001) Short- and long-range repulsion by the Drosophila Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32, 605-17.
- Kennedy, T.S., T., de la Torre, J.R. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.
- Komuro, I., Schalling, M., Jahn, L., Bodmer, R., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Izumo, S. (1993) Gtx: A novel murin homeobox-containing gene, expressed specifically in glia cells of the brain and germ cells of testis, has a transcriptional repressor activity in vitro for a serum-inducible promoter. *Embo J* 12, 1387-1401.
- Kotzbauer, P.T.e.a. (1996) Neurturin, a relative of glia cell line derived neurotrophic factor. *Nature* 384, 467-470.
- Krumlauf, R. (1994) Mouse Hox genetic functions. *Curr Opin Genet Dev* 3, 621-625.
- Kyriakopoulou, K., de Diego, I., Wassef, M., Karagoos D. (2002) A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 129, 287-96.
- Leber, s., Breedlove, S, Sanes, J. (1990) Lineage arrangement and death of clonally related motoneurons in the chick spinal cord. *J Neurosci* 10, 2451-2462.
- Lee, K.J., Jessell, T.M. (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 261-94.
- Lee, S.K.a.P., S.L. (2001) Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* 4, 1183-18.
- Leonardo, E.D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S.L., Tessier-Lavigne, M. (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate Netrin receptors. *Nature* 388, 833-838.
- Leung-Hagesteijn, C., Spence, A.M., Stern, B.D., Zhou, J., Su, M.W., Hedgecock, E.M., Culotti, J.G. (1992) UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71, 289-299.

- Lin, L.-F.H.e.a. (1993) GDNF: A glia cell line derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132.
- Livesey, F.J. (1999) Netrins and netrin receptor. *CMLS* 56, 62-68.
- Lu, Q.R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C.D., Rowitch, D.H. (2002) Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109, 75-86.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109-15.
- Manzanares, M.e.a. (1999) The role of kreisler in segmentation during hindbrain development. *Dev Biol* 211, 220-237.
- Marin, F., Puellas, L. (1995) Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* 7, 1714-1738.
- Marquardt, T., Pfaff, S. L. (2001) Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. *Cell* 106, 651-654.
- Marshall, H., Studer, M., Popperl, H., Aparicio, S., Kuroiwa, A., Brenner, S., Krumlauf, R. (1994) A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature* 370, 567-571.
- Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D.A., Sasaki, H., McMahon, A.P., (1995) Distribution of sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* 121, 2537-47.
- Martinez, S., Puellas, L., Alvarado-Mallart, R.M. (1992) Tangential neuronal migration in the avian tectum: cell type identification and mapping of regional differences with quail/chick homotopic transplants. *Brain Res Dev Brain Res* 56, 153-163.
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, a., Gehring, W.L. (1984a) *Cell* 37, 403-408.
- McGinnis, W., Levinem.S., Hafen, E., Kuroiwa, a., Gehring, W.L. (1984b) *Nature* 308, 428-33.
- McKay, I.J.e.a. (1994) The kreisler mouse: a hindbrain segmentation mutant that lack two rhombomeres. *Development* 120, 2199-2211.
- Mellerick, D.M., Nirenberg, M. (1995) Dorsal ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system. *Dev Biol* 171, 306-316.
- Mildbrandt, J.e.a. (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20, 245-253.
- Misson (1991).
- Moore, M.W.e.a. (1998) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76-79.
- Morris, R. (2000) A rough guide to a smooth brain. *Nature Cell Biology* 2, 201-202.
- Mountcastle (1997).
- Muhr, J., Andersson, E., Persson, M., Jessell, T.M. and Ericson, J. (2001) Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 104, 861-73.
- Murase, S., Horwitz, A.F. (2002) Deleted in colateral carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22, 3568-79.
- Nadarajah, B.a.P., J.G. (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3, 423-432.
- Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y. and Orkin, S. H. (1999) Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* 210, 305-21.

- Nelson, H.C.M. (1995) Structure and function of DNA-binding proteins. *Curr Biol* 5, 180-189.
- Nishino, J.e.a. (1999) GFRalpha3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron* 23, 725-736.
- Norman, M.G., McGillivray, B.C., Kalousek, D.K., Hill, A., Poskitt, K.J. (1995) Neuronal migration disorders and cortical dysplasias. Oxford University Press, New York, 223-277.
- Novitch, B., Chen, A.I., Jessel, T.M. (2001a) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* 31, 773-89.
- Novitch, B.G., Chen, A.I., Jessell, T.M. (2001b) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor protein Olig2. *Neuron* 31, 773-789.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Iimura, T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S. and Eto, K. (1997) Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* 124, 2961-72.
- Pabst, O., Herbrand, H. and Arnold, H.H. (1998) Nkx2-9 is a novel homeobox transcription factor which demarcates ventral domains in the developing mouse CNS. *Mech Dev* 73, 85-93.
- Pabst, O., Herbrand, H., Takuma, N. and Arnold, H.H. (2000) NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Dev Genes Evol* 210, 47-50.
- Pachnis, V.M., B., Costantini, F. (1993) Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119, 1005-1017.
- Papalopulu, N., Lovell-Badge, R., Krumlauf, R. (1991) The expression of murine Hox-2 genes is dependent on the differentiation pathway and displays colinear sensitivity to retinoic acid in F9 cells and *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res* 19, 5497-5506.
- Parnavelas, J.G. (2000) The origin and migration of cortical neurons: new vistas. *Trends Neurosci* 23, 126-131.
- Pata, I., Studer, M., van Doorninck, J. H., Briscoe, J., Kuuse, S., Engel, J. D., Grosveld, F. and Karis, A. (1999) The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development* 126, 5523-31.
- Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C., and Brunet J. F. (2000) Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. *Development* 127, 1349-1358.
- 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, 4065-4075.
- Pearlman, A.L., Faust, P.L., Hatten, M.E., Brunstrom, J.E. (1998) New directions of neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* 8, 45-54.
- Phelps, P., Barber, R., Vaughn, J. (1996) Nonradial migration of interneurons can be experimentally altered in spinal cord slice culture. *Development* 122, 2013-2022.
- Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Goulding, M. and Jessell, T.M. (2001) Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* 29, 367-84.
- Przyborski, S.A., Knowles, B.B., Ackerman, S.L. (1998) Embryonic phenotype of unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of rostral cerebellar boundary. *Development* 125, 41-50.

- Puschel, A.W. (1999) Divergent properties of mouse netrins. *Mech Dev* 83, 65-75.
- Qiu, M., Shimamura, K., Sussel, L., Chen, S. and Rubenstein, J.L. (1998) Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev* 72, 77-88.
- Rakic, P. (1972) Model of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145, 61-83.
- Rakic, P. (1990) Cytological and quantitative characteristics of four cerebral commissures in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 291, 520-537.
- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., Jessell, T.M. (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.
- Rosenthal, A. (1999) The GDNF protein family: gene ablation studies reveal what they really do and how. *Neuron* 22, 201-203.
- Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S., Morelli, G. (1991) A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *Embo J* 10, 1787-91.
- Rudnick, A., Ling, T.Y., Odagiri, H., Rutter, W.J. and German, M.S. (1994) Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12203-7.
- Ryder, E.F., Cepko, C.L. (1994) Migration pattern of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12, 1011-28.
- Sander, M., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., Berber, E., German, M., Jessell, T.M. and Rubenstein, J.L. (2000) Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev* 14, 2134-9.
- Schneider-Maunoury, S.e.a. (1993) Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75, 1199-1214.
- Scott, M.P. (1992) Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 71, 551-553.
- Scott, M.P., Tamkun, J.W. and Hartzell, G.W.I. (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta* 989, 25-48.
- Scott, M.P., Weiner, A.J., (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4115-19.
- Seaman, C., Cooper, H.M. (2001) Netrin-3 protein is localized to the axons of motor, sensory and sympathetic neurons. *Mech Dev* 1001, 245-8.
- Seitanidou, T., Schneider-Maunoury, S., Desmarquet, C., Wilkinson, D. G. and Charnay, P. (1997) Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Development* 124, 1215-26.
- Serafini, T.K., T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., Tessier-Lavigne, T.M. (1994) The netrins define a family of axon outgrowth promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.
- Shawlot, W. and Behringer, R.R. (1995) Requirement for Lim1 in head-organizer function [see comments]. *Nature* 374, 425-30.
- Stewart, O. (2002) Translating axon guidance cues. *Cell* 110, 537-40.
- Studer, M. (2001) Initiation of facial motoneuron migration is dependent on rhombomeres 5 and 6. *Development* 128, 3707-16.
- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A. and Krumlauf, R (1996) Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* 384, 630-4.
- Swiatek, P.J., Gridley, T. (1993) Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev* 7, 2071-2084.

- Takahashi, M., Osumi, N. (2002) Pax6 regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* 129, 1327-38.
- Tan, S.S., Kalloniatis M., Sturm K., Tam P.P., Reese B.E., Faulkner-Jones B. (1998) Separate progenitors for radial and tangential cell dispersion during development of the cerebral neocortex. *Neuron* 21, 295-304.
- Tiveron, C.M., Hirsch, M.R., Brunet, J.F. (1996) The expression pattern of the transcription factor Phox2 during neurogenesis. *J Neurosci* 16, 7649-60.
- Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., Jessell, T. M. and Ericson, J. (2001) Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron* 31, 743-55.
- Varela-Echavarria, A., Pfaff, S. L. and Guthrie, S. (1996) Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *MCN* 8, 242-257.
- Varela-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A. W. and Guthrie, S. (1997) Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18, 193-207.
- Wadsworth, W.G., Bhatt, H., Hedgecock, E.M. (1996) Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *cc. elegans*. *Neuron* 16, 35-46.
- Wolfer DP, G.R., Stagliar M, Sonderegger P, Lipp HP. (1998) Expression of the axon growth-related neural adhesion molecule TAG-1/axonin-1 in the adult mouse brain. *Anat Embryol (Berl)* 197, 177-85.
- Yee, K.T., Simon, H.H., Tessier-Lavigne, M., O'Leary D.D.M. (1999) Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant Netrin-1. *Neuron* 24.
- Zhou, Q., Anderson, D.J. (2002) The bHLH transcription factors Olig1 and Olig2 couple neuronal and glia subtype specification. *Cell* 109, 61-73.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Myriam Müller  
Geburtsdatum/-ort: 05. 01.1973 in Köln  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

Juli 1979 – Juni 1983 **Grundschule** Köln/Heimersdorf  
Aug. 1983 – Juni 1992 **Allgemeine Hochschulreife** , Köln

## Studium

Okt. 1992 – Sept. 1994 **Grundstudium** Dipl. Biologie an der Universität zu Köln  
(Fächer: Zoologie, Botanik, Chemie und Physik)  
Okt. 1994 – Febr. 1997 **Hauptstudium** Dipl. Biologie an der Universität zu Köln  
Studienschwerpunkte: Zoologie, Genetik, Biochemie  
März 1997 – Juni 1998 **Diplomarbeit** unter der Leitung von Prof. Dr. Neumann  
an der Außenstelle des zoologischen Instituts der  
Universität zu Köln in Rees  
Abschluss: Diplom Biologin, Note: sehr gut

## Promotion

Mai 1999 – Februar 2003 **Dissertation** am Institut für Molekulare Neurobiologie in  
Hamburg (ZMNH) unter der Leitung von Frau Dr. Maike  
Sander. Thema: Die Funktion des Homeodomänen  
Transkriptionsfaktors Nkx6.1 bei der Entwicklung von  
Motoneuronen im Hirnstamm der Maus (*mus musculus*)

Hamburg, den 19.02.03