

**Untersuchungen über die Funktion von *sonic hedgehog*
bei der Musterbildung im Neuralrohr des Zebrafisches
*Danio rerio***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Andre Quinkertz
aus Goch

Köln 2002

Berichterstatter:

Prof. Dr. Jose A. Campos-Ortega

Berichterstatter:

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

06. Februar 2002

Danksagung

Alle Experimente zu dieser Arbeit wurden unter der Leitung und Betreuung von Prof. Dr. Campos-Ortega durchgeführt. Ihm gilt mein erster und zugleich großer Dank für die gute Zusammenarbeit in dieser Zeit. Sein – im positiven Sinne – stetes Fordern nach kritischer Auseinandersetzung mit den Ergebnissen und auch den Fehlschlägen während dieser Arbeit haben mir sehr geholfen. Nicht alles war immer gut, aber immer war alles fair.

Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Roth für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Beiden Prüfern ein herzliches Dankeschön für die schnelle Anfertigung der Gutachten.

Prof. Dr. Leptin möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken. Dr. Klaus Rohr gebührt ein großer Dank für die hilfreiche Korrektur. Außerdem wurde mein Bild über Leben und Arbeiten auf den Britischen Inseln entscheidend korrigiert.

Diese Arbeit wäre ohne die Mithilfe exzellenter Technischer Assistenten nicht möglich gewesen. Zuerst großen und herzlichsten Dank an meine langjährige Platznachbarin Christel. Dies nicht nur für die mittlerweile schon legendäre Fähigkeit zur Herstellung von Präparaten aller Art, sondern auch für den positiven Langmut im Ertragen einiger meiner Launen über die Jahre hinweg und die gute Stimmung an der "bench". Thomas meinen Dank für große Hilfe in der kleinen, unseligen Klonierungsarbeit.

Der ganzen Fischgruppe – in ihrer jetzigen und vormaligen Zusammensetzung – einen großen Dank für die immer gute Arbeitsatmosphäre. Was man alles mit Teebeuteln so machen kann.....

Jemandem für die Hilfe bei Computer-Problemen zu danken, schenke ich mir mal aus den bekannten Gründen.....

Ein ganz großer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung in all diesen Jahren. Ihr habt vieles erst möglich gemacht.

Ohne Freunde ist man nichts – deshalb gilt mein erster Dank meinem Freund Andre für sein immer offenes Ohr und seine lange und verlässliche Freundschaft. Vielen Dank ebenso meinem Freund Lutz. Auch den Mitgliedern des Donnerstags-Stammtisch möchte ich gerne danken für viele nette Stunden nicht nur Donnerstags.

Iris möchte ich danken für große Hilfe und tatkräftige und moralische Unterstützung. Vor allem aber für ein ganzes Universum an kleinen und großen Freuden und Erfahrungen, in dem jeden Tag neue Welten zu erforschen sind. Ich hoffe, diese Reise hört nie auf.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Allgemeines	7
1.2	Entwicklung und Aufbau des Zentralnervensystems	8
1.2.1	Allgemeines	8
1.2.2	Musterbildung im Neuralrohr	8
1.3	Aufbau und Funktion von Sonic Hedgehog	10
1.3.1	Das Hedgehog-Protein in <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.3.2	Struktur und intrazelluläre Prozessierung des Proteins	10
1.3.3	Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg	11
1.3.4	<i>Sonic Hedgehog</i> , Paraloge und Signalweg im Zebrafisch	13
1.4	Neurale Musterbildung durch Sonic Hedgehog	14
1.4.1	Neuronale Marker	15
1.4.2	Interpretation des Hedgehog-Konzentrationsgradienten durch kombinatorische Expression verschiedener Homöodomänen-Proteine	16
1.5	Der Transkriptionsfaktor Nkx6.1	18
1.6	Der Zebrafisch <i>Danio rerio</i> als Modellorganismus	19
1.7	Die Verwendung transgener Stämme	19
1.8	Das GAL4/UAS-System	20
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Chemikalien, Bezugsquellen und Allgemeines	23
2.2	Abkürzungen und Symbole	23
2.3	Medien, Puffer und Lösungen	25
2.4	Genetische Nomenklatur in dieser Arbeit	27
2.5	Generelle Methoden zur Haltung und Zucht des Zebrafisches	27
2.5.1	Verwendete Zebrafischstämme	27
2.5.2	Haltung und Zucht des Zebrafisches	27
2.5.3	Eiablage	28
2.5.4	Einteilung der Entwicklungsstadien	28
2.6	Mikroinjektion	28
2.6.1	Injektionslösungen	29
2.6.2	Injektionen	29
2.6.3	Morpholino-Injektion	30
2.7	Hitzeschock von Zebrafisch-Embryonen	30

2.8	Cyclopamin-Behandlung	30
2.9	Histologische Methoden	30
2.9.1	Enzymatisches Dechorionisieren von Embryonen	30
2.9.2	Fixierung von Zebrafischembryonen	31
2.9.3	Glyzerin-Einbettung	32
2.9.4	<i>Durcupan</i> TM -Einbettung	32
2.9.5	Gelatine-Beschichtung für Objektträger	32
2.9.6	Semi-Dünnschnitte	32
2.9.7	Bleichen pigmentierter Embryonen	32
2.9.8	Kollagenase-Verdau für Embryonen	33
2.9.9	Antikörper-Färbungen	33
2.9.10	Verwendete Antikörper	35
2.9.11	whole mount- <i>in situ</i> Färbungen an Embryonen	37
2.9.12	Digoxigenin / Fluorescein-Doppelfärbung	40
2.9.13	Verwendete Sonden	40
2.10	Molekularbiologische Methoden	41
2.10.1	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	41
2.10.2	Quantifizierung von DNA und RNA	42
2.10.3	Agarosegelelektrophorese	43
2.10.4	Modifikation von Nukleinsäuren	43
2.10.5	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	43
2.10.6	Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten	43
2.10.7	Dephosphorylierung von Vektorenden	44
2.10.8	Elution von DNA-Fragmenten	44
2.10.9	Ligation von DNA-Fragmenten	44
2.10.10	Ligation von PCR-Produkten	44
2.10.11	Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab ("Mini-Präp")	44
2.10.12	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	45
2.10.13	Phenol-Chloroform-Extraktion	45
2.10.14	Extraktion von total-RNA mit <i>Trizol</i> TM	46
2.10.15	<i>In vitro</i> mRNA-Synthese zu Injektionszwecken	46
2.11	Morpholinos	46
2.11.1	Sequenzierungen	47
2.12	Sichtung transgener Fische	48
2.12.1	Extraktion genomischer DNA aus F1-Embryonen und Schwanzflossen	48
2.12.2	PCR zur Identifikation transgener Zebrafische	49

2.13	Sequenzanalyse	51
2.14	Klonierung <i>nkx6.1</i>	52
2.14.1	PCR	52
2.14.2	Schnelle Amplifikation von 3'-Enden (3'RACE)	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Markergene im Wildtyp	54
3.1.1	Neuronale Marker	54
3.1.2	Marker für Oligodendrozyten-Vorläufer	57
3.2	Klonierung und Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors <i>nkx6.1</i> im Zebrafisch	58
3.2.1	Klonierung	58
3.2.2	Expression im Wildtyp	59
3.3	Wildtypisches Expressionsmuster verschiedener Homöobox-Gene im Ze- brafisch	60
3.4	Überexpression von <i>shh</i> im Neuralrohr des Zebrafisches mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems	63
3.4.1	Transaktivierbarkeit des <i>UAS:shh</i> -Effektorkonstruktes	63
3.4.2	Misexpression von <i>sonic hedgehog</i> führt zu starken Defekten bei der Entwicklung des somitischen Mesoderms und der Augen	65
3.4.3	Ektopische Expression von Shh führt zu deutlichen Veränderun- gen der Homöobox-Genexpression im Neuralrohr	68
3.4.4	Misexpression von <i>shh</i> führt zu einer Zunahme von sekundären Motorneuronen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im ventra- len Neuralrohr	70
3.5	Verlust von HH-Signal	74
3.5.1	Ausfall des Hedgehog-Signalweges führt zum Verlust verschiede- ner neuraler Subtypen im ventralen Neuralrohr	74
3.6	<i>nkx6.1</i> als <i>downstream target</i> von Shh	75
3.6.1	Die Expression von <i>nkx6.1</i> ist abhängig vom Sonic Hedgehog Si- gnaltransduktionsweg	75
3.6.2	Ein Morpholino-vermittelter Translationsblock führt zu Verlust von Nkx6.1-Protein	76
3.6.3	Der Verlust von Nkx6.1-Funktion führt zur Reduktion von sekun- dären Motorneuronen und <i>vsx2</i> -positiven Interneuronen	77
3.6.4	Ausfall von Nkx6.1-Funktion hat keine Auswirkungen auf andere HD-Proteine	78

3.6.5	Überexpression von <i>nkx6.1</i> zeigt keinerlei Effekte auf die neurale Musterbildung	78
4	Diskussion	79
4.1	Das GAL4/UAS-System zur gezielten Misexpression von <i>shh</i>	79
4.2	Shh und Somitogenese	81
4.3	Die Funktion von <i>shh</i> bei der Augenentwicklung im Zebrafisch	81
4.4	Die Funktion von <i>shh</i> während der Musterbildung im ventralen Neuralrohr des Zebrafisches	83
4.4.1	Neuronale Markergene	83
4.4.2	Die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren im Neuralrohr von <i>Danio rerio</i> wird von Sonic Hedgehog beeinflusst	84
4.4.3	Die Bedeutung von Shh für die Spezifikation neuraler Subtypen im Neuralrohr von <i>Danio rerio</i>	88
4.4.4	Die Spezifikation sekundärer Motorneurone und die Funktionen des Transkriptionsfaktors Nkx6.1 in diesem Prozeß	94
4.5	Offene Fragen und Ausblicke	96
4.5.1	Sind alle neuronalen Identitäten im ventralen Neuralrohr des Zebrafisch abhängig von Shh-Signal ?	97
4.5.2	Wie redundant sind die Funktionen einzelner Hedgehog-Paraloge während der neuralen Musterbildung ?	97
4.5.3	Unterscheiden sich primäre und sekundäre Motorneurone des Zebrafisch auch durch die Expression verschiedener Gene, die für ihre Entwicklung nötig sind?	98
5	Anhang	118
5.1	Sequenz EST fd24e09.y1	118
5.2	cDNA-Sequenz <i>nkx6.1</i>	118
5.3	Aminosäuren-Sequenz von Nkx6.1	119
5.4	Alignment von Nkx6.1-Proteinen	120
6	Zusammenfassung	121
7	Abstract	122
8	Erklärung	123
9	Lebenslauf	124

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Entwicklungsbiologie befasst sich mit den Fragestellungen, die sich aus dem Problem ergeben, aus einem befruchteten Ei - einer einzelnen Zelle - einen Organismus mit verschiedenen Zelltypen, Geweben und Organen zu generieren. Viele Prozesse, morphologisch-mechanische wie molekularbiologisch-genetische, spielen hierbei eine Rolle.

Stets ergibt sich z.B. bei Wirbeltieren das Problem, aus der einfachen Blastula die letztendlich für alle Wirbeltiere gültige Anordnung von außen-, bzw. innenliegendem Ektoderm bzw. Endoderm und dem dazwischen angeordneten Mesoderm zu erreichen. Die umfassenden Zellbewegungen und Zell-Zell-Kommunikationen während der Gastrulation dienen alle dazu, diesen so wichtigen Aufbau zu vervollständigen. Ohne die "richtige" Anordnung der Keimblätter zueinander wäre eine weitere korrekte Entwicklung unmöglich. Frühe Versuche haben bereits gezeigt, daß das Mesoderm für die Induktion des Neuroektoderms verantwortlich ist und es deshalb unabdingbar ist, daß nach der Gastrulation das Ektoderm über dem Mesoderm liegt.

Zur Untersuchung dieser Fragen wurde stets auf Organismen zurückgegriffen, die durch ihre Entwicklung und/oder durch ihre Vorteile als experimentelles System (leichte Haltung, gute Beobachtbarkeit, etc.) als Modelle für allgemeinere Embryonalentwicklung dienten. So sind die bekanntesten Modelle für die Invertebratenentwicklung die Taufliege *Drosophila melanogaster* und der Nematode *Caenorhabditis elegans*. Bei den Vertebraten sind es hauptsächlich Maus (*Mus musculus*) und Huhn (*Gallus gallus*) als Beispiele für die Entwicklung bei den höheren Vertebraten, sowie der Afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* und der Zebrafisch *Danio rerio* für die niederen Wirbeltiere. Keiner dieser Organismen ist das "perfekte" Modellsystem: Was der eine an Vorteilen bietet, sind oft die Nachteile des anderen. So eignet sich die Maus hervorragend für molekulargenetische Manipulationen, jedoch ist durch die intrauterine Entwicklung die Analyse der morphogenetischen Prozesse während der Entwicklung sehr schwierig. Hingegen ist die extrakorporale Entwicklung des Huhnes im Ei zwar gut zu beobachten, genetische Manipulationen sind aber nur begrenzt möglich.

So ergeben sich vielfach aus den Untersuchungen der einzelnen Modellorganismen Erkenntnisse über ganz unterschiedliche Probleme: Vieles, was wir über klonalen Beziehungen von Zellen wissen, stammt aus der vollständigen Analyse des Zellstammbaums von *C. elegans* (Brenner (1974); Sulston and Horvitz (1977, 1981); Horvitz et al. (1983)). Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Zellen untereinander stammen u.a. aus Untersuchungen an Amphibien (Spemann (1918); Spemann and Mangold (1924); Man-

gold (1933); Nieuwkoop (1973)). Die Analyse von Mutationen in *D. melanogaster* hat viele Erkenntnisse über Musterbildung und Achsenformationen geliefert und vor allem die Verbindung von Genetik und Molekularbiologie mit der "klassischen" experimentellen Morphologie ermöglicht (Nüsslein-Volhard and Wieschaus (1980)).

Eines von vielen Feldern, bei denen auch die Untersuchungen an allen o.g. Organismen bereits zu weitreichenden Erkenntnissen geführt haben, ist die Entwicklung des Nervensystems.

1.2 Entwicklung und Aufbau des Zentralnervensystems

1.2.1 Allgemeines

In Vertebraten besteht nach Abschluß der Gastrulation das Neuroektoderm aus einem einschichtigen Epithelium, der Neuralplatte. Während der Neurulation falten sich die Ränder der Neuralplatte nach dorsal hin auf, gleichzeitig bildet sich medial eine Vertiefung. Am Ende dieses Prozesse stoßen die beiden Faltungsränder dorso-medial zusammen, fusionieren und bilden einen hohlen Zylinder unterhalb des nicht-neuralen Ektoderms, die Neuralröhre. Der genaue Ablauf der Neurulation unterscheidet sich zwischen einzelnen Wirbeltierklassen. Bei Vögeln beginnt die Neurulation anterior auf Höhe des späteren Mittelhirns und setzt sich dann nach anterior und posterior fort. Bei Säugetieren beginnt die Einfaltung des Neuralrohrs an verschiedenen Stellen entlang der anterior-posterioren Achse und dazwischen liegende Abschnitte werden im Verlauf der Neurulation ebenfalls geschlossen. Alle diese Neurulationsformen werden jedoch unter dem Begriff PRIMÄRE NEURULATION zusammengefasst, weil sich die Neuralplatte direkt in ein hohles Neuralrohr einstülpt.

Der Primären Neurulation steht die SEKUNDÄRE NEURULATION gegenüber: Bei dieser Variante falten sich die Ränder ebenfalls zunächst nach dorsal auf, bilden aber dann eine kompakte Struktur, den Neuralstab. Dieser höhlt sich im weiteren Verlauf aus und bildet so das Neuralrohr (Schmitz (1991); Schmitz et al. (1993)). Die Sekundäre Neurulation kommt hauptsächlich bei Knochenfischen vor – und dort exklusiv –, jedoch gibt es auch bei Vögeln und Amphibien Mischformen aus Primärer und Sekundärer Neurulation innerhalb des Embryos.

1.2.2 Musterbildung im Neuralrohr

Die Neurulation des Zebrafisches wurde von Schmitz (1991), Schmitz et al. (1993) und Papan and Campos-Ortega (1994) eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sich am Ende der Gastrulation entlang der medio-lateralen Achse der Neuralplatte liegende Zellen nach Abschluss der Neurulation entlang der ventro-dorsalen Achse wie-

derfinden (Schmitz (1991); Schmitz et al. (1993); Papan and Campos-Ortega (1994)). Für die Musterbildung im Neuralrohr ist dies von entscheidender Bedeutung: Im Zebrafisch entstehen die ersten motorischen Neurone bereits am Ende der Gastrulation, ca. 10h nach Fertilisation (10 hpf bei 28.5°C) ((Myers et al., 1986; Kimmel et al., 1994, Eisen 1991)). Alle Vorläufer dieser sog. PRIMÄREN MOTORNEURONE (pMN) sind zu diesem Zeitpunkt im medialen Teil der Neuralplatte auf beiden Seiten der Mittellinie bereits vorhanden - ihre letzte Mitose liegt etwa am Ende der Gastrulation bei 10 hpf (Myers et al. (1986); Kimmel et al. (1994)). Die pMN unterscheiden sich von den später, ab ca. 14 hpf auftretenden SEKUNDÄREN MOTORNEURONEN (sMN) in Charakteristik und Funktion (Kimmel and Westerfield (1991)): Primäre MN beginnen mit der Axogenese bei ca. 17 hpf, sind größer und (bei 22 hpf) etwas weiter dorsal angesiedelt als die sMN. Axogenese von sMN findet erst gegen Ende und auch noch nach der Segmentierungsperiode (die bei ca. 24 hpf endet) statt; zum Ende dieses Prozesses gibt es ca. 30-40 sMN pro spinalem Hemisegment (Myers et al. (1986); Westerfield et al. (1986); Pike et al. (1992); Kimmel et al. (1994)). Ebenfalls sind im frühen Neuralplattenstadium bereits erste sensorische Neurone, sog. ROHON-BEARD Neurone, sichtbar, die in den lateralen Bereichen der Neuralplatte entstehen (Cornell and Eisen (2000)).

Entscheidend ist, daß während der dorso-medialen Konvergenzbewegungen der lateralen Bereiche der Neuralplatte die relativen Positionen dieser Zellen erhalten bleiben, so daß am Ende des Prozesses die Motorneurone den ventralen und die sensorischen Neurone den dorsalen Teil des Neuralrohres besetzen (Papan and Campos-Ortega (1994)). Die dazwischenliegenden Regionen werden von verschiedenen INTERNEURONEN (IN) besiedelt (Bernhardt et al. (1990, 1992)).

Für die Musterbildung vor allem im ventralen Neuralrohr sind zwei Strukturen von zentraler Bedeutung: Zum einen die Chorda dorsalis, eine embryonale Struktur mesodermalen Ursprungs. Die Chorda verläuft in anterior-posteriorer Richtung direkt unterhalb des Neuralrohres und ist im Zebrafisch wegen ihrer großen, vakuolisierten Zellen gut zu erkennen.

Die andere Struktur ist die Bodenplatte, eine spezielle Population glialer Zellen der ventralen Mittellinie des Neuralrohres. Die Bodenplatte entsteht durch Induktion durch Signale aus der Chorda (s.u.). Neue Experimente zeigen jedoch zudem, daß in einigen Organismen auch die Abstammung aus bestimmten Zelllinien für das Schicksal einiger Bodenplattenzellen wichtig ist (Placzek (1995); Placzek et al. (2000); Le Douarin and Halpern (2000)).

Für Chorda und Bodenplatte konnte gezeigt werden, daß sie induktive Wirkung auf die Musterbildung im Neuralrohr haben. Transplantationsexperimente v.a. im Huhn konnten nachweisen, daß sowohl die Chorda als auch die Bodenplatte in "naivem" Neu-

roektoderm dorsale Identitäten reprimieren und Bodenplatte sowie ventro-laterale Motoneurone induzieren können (van Straaten et al. (1988); Yamada et al. (1991); Placzek (1995)). Ebenso führt die Ablation von Chorda zu Verlust von Bodenplatte und Motoneuronen und zur Expression dorsaler Markergene im ventralen Neuralrohr (Placzek et al. (1991); Yamada et al. (1991); Placzek et al. (2000)). Viele Experimente haben mittlerweile zu der Auffassung geführt, daß für die induktive Wirkung von Chorda und Bodenplatte vor allem ein Protein verantwortlich ist: Sonic Hedgehog.

1.3 Aufbau und Funktion von Sonic Hedgehog

1.3.1 Das Hedgehog-Protein in *Drosophila melanogaster*

Das *hedgehog*-Gen (*hh*) der Taufliege *Drosophila melanogaster* ist der Namensgeber der gesamten Genfamilie. Es gehört hier zu den so genannten Segment-Polaritätsgenen und ist wichtig für die Etablierung der antero-posterioren Grenze der Parasegmente. Zellen, in denen das Protein Wingless erzeugt wird, lösen durch die Sekretion dieses Proteins in den benachbarten posterioren Zellen die Expression des Gens *engrailed* (*eng*) aus. Dies führt dann im weiteren zur Produktion von Hedgehog in diesen *engrailed*-exprimierenden Zellen. Hedgehog wiederum wird sekretiert und führt erneut zur Ausprägung des Gens *wingless* (*wg*) in den anterior anschließenden Zellen (Mohler and Vani (1992)). Über diesen Auto-Regulationsmechanismus wird das Expressionsmuster der Gene *wg*, *eng* und *hh* aufrecht erhalten und eine stabile antero-posteriore Parasegmentgrenze gebildet (Gilbert (1997)).

Eine weitere bedeutende Rolle in der Emryonalentwicklung von *D. melanogaster* - kommt Hedgehog u.a. bei der Festlegung von Zellschicksalen innerhalb der Parasegmente zu (Heemskerk and DiNardo (1994)).

1.3.2 Struktur und intrazelluläre Prozessierung des Proteins

Wie viele andere sekretierte Proteine wird auch Sonic Hedgehog nach der Translation noch modifiziert, bevor es aus der Zelle entlassen wird. In diesem Falle ist auch diese intrazelluläre Modifikation interessant, da immer noch nicht ganz klar ist, welche Auswirkungen die einzelnen Modifikationen auf die Wirkungsweise des Proteins *in vivo* haben.

Das ca. 45 kDa große Vorläuferprotein spaltet sich, nach Abspaltung der Signalsequenz, zunächst autoproteolytisch in eine ca. 20 kDa große amino-terminale Einheit (im weiteren abgekürzt mit N-Shh) und in ein ca. 25 kDa großes C-terminales Peptid (C-Shh), die beide sekretiert werden. Während alle bisher bekannten Signalwirkungen N-Shh zugeschrieben werden, ist C-Shh für die Proteolyse und die Modifikation von N-Shh verantwortlich.

Vor seiner Sekretion unterliegt N-Shh zweierlei Modifikationen:

Das carboxy-terminale Ende wird kovalent mit Cholesterin verbunden. Diese bisher für andere Proteine unbekanntes Assoziation wird direkt von C-Shh vermittelt. Es ist bisher unklar, ob diese Modifikation eine Rolle spielt bei der Reichweite des sekretierten Proteins und/oder ob sie für die Bindung an den Rezeptor Patched wichtig ist (Goetz et al. (2002)). Am amino-terminalen Ende wird eine Palmitoyl-Gruppe angehängt, ein Prozess, der z.B. in *Drosophila* durch die Transmembran-Acyl-Transferase *skinny hedgehog/sightless* vermittelt wird. Was dies für die Funktion von N-Shh bedeutet, ist ebenfalls noch unklar und Gegenstand intensiver Forschung. Einiges deutet aber darauf hin, daß die Acylierung für die induktive Funktion von N-Shh von Bedeutung ist (als Review siehe Ingham (2001)).

1.3.3 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg

Der Rezeptor für das Hedgehog-Protein ist eigentlich ein Rezeptor-Komplex, bestehend aus zwei wesentlichen Komponenten: Die Bindung von Shh erfolgt über das Protein Patched (Ptc), einem Transmembran-Protein. In Vertebraten sind bisher zwei Paraloge des Gens bekannt, Ptc1 scheint aber der für die Signaltransduktion im ZNS wesentliche Rezeptor zu sein (Concordet et al. (1996); Lewis et al. (1999)). Bindung von Shh an Ptc bewirkt eine Aufhebung der Inhibition von Smoothened, so daß nun das Signal von Smoothened weitergeleitet werden kann (Alcedo et al. (1996); van den Heuvel and Ingham (1996); Murone et al. (1999); Alcedo et al. (2000)). Man nimmt an, daß die Inhibition von Smoothened durch Patched mit Hilfe einer Phosphatase geschieht, die die Phosphorylierung (und somit Aktivierung) von Smo verhindert (Denef et al. (2000)).

Patched ist also der Shh-bindende Teil des Rezeptorkomplexes, während Smo für die Signalweiterleitung verantwortlich ist. Diese Signaltransduktion ist wahrscheinlich abhängig von G-Proteinen, die an Smo gebunden sind (Hammerschmidt and McMahon (1998)). Dominant-negative Varianten von Patched sowie konstitutiv aktive Varianten von Smoothened können daher den gleichen Effekt haben, wie fortdauerndes Shh-Signal (Xie et al. (1998)). Neueste Forschungen haben gezeigt, daß beide Proteine, Ptc und Smo, nicht als Komplex vorliegen und daß beide ständig zwischen der Zelloberfläche und Endosomen hin und her wandern und über Lysosome langsam abgebaut werden (Strutt et al. (2001); Martin et al. (2001)). Bei Bindung von Shh an Ptc werden alle drei Proteine in Endosomen internalisiert, die Abbaurate von Smoothened aber wird drastisch reduziert, ebenso steigt der Gehalt von Smo an der Zelloberfläche stark an (Incardona et al. (2002)). Der Sinn dieses Mechanismus ist allerdings weiterhin unklar (als Review siehe Stark (2002)).

Weitere Komponenten des Signalweiterleitungsweges sind Zink-Finger Transkripti-

onsfaktoren der *Cubitus interruptus* (Ci)/Gli-Familie. Ein Teil der Gli-vermittelten Transkription der Zielgene des Hedgehog-Signalweges wird über die Proteinkinase A (Pka) reguliert. Dominant-negative Formen von Pka zeigen *in vivo* den gleichen Phänotyp wie eine Überexpression von *shh*.

Die Signalstärke von Shh wird auch über das Hedgehog Interacting Protein (Hip) reguliert, das mit Shh um die Bindung an Patched konkurriert. Eine starke Hip-Konzentration sorgt somit für eine Dämpfung der Signalstärke. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wird in unserer Arbeitsgruppe an der Klonierung eines *hip*-Orthologen im Zebrafisch gearbeitet (Dirk Gilson, pers. Mitteilung).

Die Signalweiterleitung des Hedgehog-Signals kann künstlich unterdrückt werden. Die Verabreichung des Alkaloids Cyclopamin, isoliert aus der Pflanze *Veratrum californicum* (Kalifornischer Weißer Germer) führt zu gleichen Effekten wie bei den Ausfall-Mutanten von *shh* (Incardona et al. (1998)). Entdeckt durch auftretende Holoprosenzephalie bei Nachkommen von weidenden Schafen, die die Pflanze gefressen hatten, wird Cyclopamin mittlerweile auch medizinisch zur Behandlung von erblichen oder erworbenen Überfunktionen im Hedgehog-Signalweg eingesetzt (Taipale et al. (2000), s. auch 1.4).

Einen Überblick über die bekannten Komponenten des Hedgehog-Signalweges gibt Abb.

1

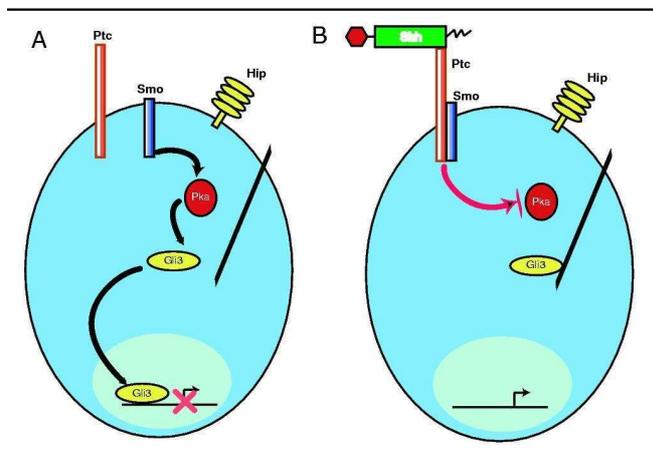


Abbildung 1: Der Shh-Signalweg

(A) Keine Bindung von Shh. Aktive Pka sorgt dafür, daß Gli3 in den Kern gelangt und die Transkription von Shh-Zielgenen reprimiert. (B) Bindung von Shh. Ptc und Smo bilden einen Komplex, Pka wird reprimiert. Dadurch kann Gli3 nicht in den Kern gelangen. Möglicherweise wird Gli3 mit Hilfe anderer Proteine an Mikrotubuli gebunden. Zur Vereinfachung wurden einige Komponenten ausgelassen. Abb. sinngemäß nach Marti and Bovolenta (2002).

1.3.4 *Sonic Hedgehog*, Paraloge und Signalweg im Zebrafisch

Vergleichbar mit der Situation in der Maus, bei der man ebenfalls mehrere Mitglieder der Hedgehog-Genfamilie finden kann, gibt es auch im Zebrafisch drei bekannte Paraloge: *sonic hedgehog* (*shh*), *tiggy-winkle hedgehog* (*twhh*) und *echidna hedgehog* (*ehh*). Aufklärung über die genaue Anzahl existierender Paraloge wird sicher durch die bereits begonnene komplette Sequenzierung des Zebrafisch-Genoms erreicht werden.

Die Expression von *shh* im Zebrafisch ist bereits detailliert untersucht worden: Sie beginnt bei ca. 60 % Epibolie im axialen Mesoderm und diese Expressionsdomäne bleibt während der Gastrulation und Segmentierung erhalten, so daß *shh* am Ende der Segmentierung in der gesamten Chorda exprimiert wird (s. Abb. 7a). Zusätzlich wird *shh* in der Bodenplatte, sowie in der Prächordalplatte exprimiert (Krauss et al. (1993)). Dabei ist zu erwähnen, daß – anders als bei Maus oder Huhn – die Bodenplatte im Zebrafisch aus zwei unterschiedlichen Zelltypen besteht (Odenthal et al. (2000)): Eine einzelne, mittlere Zellreihe (MFP) in der *shh* exprimiert wird und mehrere Reihen lateral dazu liegender Zellen (LFP), denen diese Expression fehlt. Alle Zellen können aber über Bodenplattenspezifische Markergene wie *fkf4* (Odenthal et al. (2000)) oder *axial* (*HNF3 β* -Homolog, Strähle et al. (1996)) angesprochen werden. Untersuchungen an Mutanten, sowie verschiedene andere Experimente haben gezeigt, daß nur die lateralen Zellen durch Shh induziert werden können (Schauerte et al. (1998); Odenthal et al. (2000); Hammerschmidt et al. (1997)). Die Spezifizierung der MFP-Zellen scheint hingegen bereits schon früh im embryonalen Schild zu erfolgen (Halpern et al. (1997)).

Im Vergleich zur Expression von *shh* wird *twhh* ausschliesslich in der Bodenplatte, *ehh* dagegen nur in der Chorda exprimiert (Ekker et al. (1995); Currie and Ingham (1996)). Untersuchungen an Mutanten, sowie Morpholino-Experimente haben gezeigt, daß alle drei für die Musterbildung im ventralen Neuralrohr wichtig sind (Beattie et al. (1997); Chandrasekhar et al. (1998); Lewis and Eisen (2001)). Dabei sind jedoch vor allem *shh* und *twhh* von Bedeutung – und fast redundant in ihrer Wirkung –, während *ehh* einen eher kleinen Einfluß auf das Neuroektoderm ausübt und eher für Musterbildung im somitischen Mesoderm entscheidend ist (Bingham et al. (2001); Lewis and Eisen (2001)).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Gene und Mutanten des Shh-Signaltransduktionsweges in *Danio rerio*.

Gen	beschrieben in	Mutante	beschrieben in
<i>sonic hedgehog (shh)</i>	Krauss et al. (1993)	<i>sonic you (syu)</i>	Schauerte et al. (1998)
<i>tiggy-winkle hedgehog (twhh)</i>	Ekker et al. (1995)	n.b.	-
<i>echidna hedgehog (ehh)</i>	Currie and Ingham (1996)	n.b.	-
<i>patched1 (ptc1)</i>	Concordet et al. (1996)	n.b.	-
<i>patched2 (ptc2)</i>	Lewis et al. (1999)	n.b.	-
<i>smoothened homolog (smoh)</i>	Chen et al. (2001)	<i>slow muscle omitted (smu)</i>	Varga et al. (2001)
<i>GLI-Krüppel family member GLI2 (gli2)</i>	Karlstrom et al. (1999)	<i>you too (yot)</i>	van Eeden et al. (1996)
<i>hedgehog interacting protein (hip)</i>	D. Gilson, pers. Mitteilung	n.b.	-
n.b.	-	<i>you (you)</i>	van Eeden et al. (1996)
n.b.	-	<i>chameleon (con)</i>	van Eeden et al. (1996)
n.b.	-	<i>iguana (igu)</i>	Brand et al. (1996)
n.b.	-	<i>detour (dtr)</i>	Brand et al. (1996)
n.b.	-	<i>umleitung (uml)</i>	Karlstrom et al. (1996)

Tabelle 1: Bekannte Gene und Mutanten in möglichen weiteren Komponenten des Hh-Signaltransduktionsweges im Zebrafisch (n.b. = nicht bekannt)

1.4 Neurale Musterbildung durch Sonic Hedgehog

Die meisten Erkenntnisse über die Funktion von Shh bei der neuralen Musterbildung wurden in Maus und in Huhn durchgeführt. Man hat in diesen Organismen bereits sehr gute Kenntnisse über die spezifischen genetischen Aspekte bei der Zelltypspezifikation. Es sollen hier daher zunächst die akzeptierten Modelle für diese beiden Organismen vorgestellt werden:

Verschiedene Experimente haben gezeigt, daß Shh offenbar von Chorda und Bodenplatte ausgehend (Marti et al. (1995)) in das ventrale Neuralrohr diffundiert und das dieser Proteingradient entscheidend ist für die Musterbildung im Neuralrohr. Von Chorda und Bodenplatte ausgesandte Signale konnten in Transfilter- (Tanabe et al. (1995)) und Explant-Experimenten (Roelink et al. (1994)) Motorneurone und Bodenplatte in neuralem Gewebe induzieren (Echelard et al. (1993); Hynes et al. (1995); Placzek et al. (1993); Yamada et al. (1993)). Diese induktive Fähigkeit kann durch Zugabe eines Antikörpers gegen Shh blockiert werden (Ericson et al. (1996)). Weitere Versuche haben außerdem gezeigt, daß von Shh regulierte Zielgene auch einige Zelldurchmesser entfernt von Chorda und Bodenplatte exprimiert werden (Ericson et al. (1997a); Marigo et al. (1996); Marigo

and Tabin (1996)). *Loss-of-function* Mutationen in *shh*^{-/-}-Mäusen zeigen den Verlust von Chorda und Motorneuronen (Chiang et al. (1996)). Mutanten für *shh* fehlt außerdem das gesamte ventrale Vorderhirn, was zu einer zyklischen Augenentwicklung führt (Chiang et al. (1996)). Die Bedeutung von *Sonic Hedgehog* in der Entwicklung zeigen auch die verschiedenen Krankheitssyndrome beim Menschen, die auf Störungen des Signalweges zurückgeführt werden konnten, wie Basalzellen-Karzinom (Basaliom, Xie et al. (1998); Goodrich et al. (1999)), Medulloblastoma (Peringa et al. (1995); Rorke et al. (1997); Novakovic et al. (1994)), Holoprosenzephalie (Belloni et al. (1996); Roessler et al. (1996)), Gorlin's Syndrom (Hahn et al. (1996)) und andere Tumortypen (Gailani et al. (1996); Hahn et al. (1996); Gorlin (1997); Kimonis et al. (1997)).

Für die Existenz einer konzentrationsabhängigen Wirkung von Shh spricht, daß rekombinantes Shh *in vitro* in unspezifiziertem neuralem Gewebe die Induktion verschiedener ventraler Zelltypen auslösen kann. Die unterschiedlichen Zelltypen, die nach Zugabe steigender Konzentrationen von Shh *in vitro* entstehen, entsprechen der dorso-ventralen Anordnung dieser Zelltypen *in vivo* (Ericson et al. (1997a)). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß für die Induktion des jeweils nächsten ventralen Zelltyps die Konzentration von Shh um das ca. Zwei- Dreifache steigen muss (Ericson et al. (1997a)).

1.4.1 Neuronale Marker

Bei der Analyse der Neuralentwicklung anderer Vertebraten, vorrangig Huhn und Maus, hat man fünf unterschiedliche Klassen einzelner neuronaler Subtypen im ventralen Neuralrohr gefunden (Ericson et al. (1996, 1997a)), bei denen sich die einzelnen Neurone durch verschiedene Markergene ansprechen lassen: Direkt an die Chorda angrenzend und daher am meisten ventral ist die V₃-Region, mit V₃-Interneuronen, ansprechbar durch den Marker *sim1* (Briscoe et al. (1999)). Danach folgen die Motorneuron-Region (*isl1*, *lim3*, MNR2, HB9; Tanabe et al. (1998); Arber et al. (1999)), die V₂-Region (*chx10*; Ericson et al. (1997a)), die V₁-Region (*en1*; Ericson et al. (1997a); Pierani et al. (1999)) und die V₀-Region (*evx1/2*; Ericson et al. (1997a); Pierani et al. (1999)). Für die Entwicklung aller dieser neuronalen Subtypen konnte in Maus und Huhn eine direkte Abhängigkeit von unterschiedlichen Shh-Konzentrationen nachgewiesen werden (als Review, s. Marti and Bovolenta (2002)).

1.4.2 Interpretation des Hedgehog-Konzentrationsgradienten durch kombinatorische Expression verschiedener Homöodomänen-Proteine

Wie aber wird der Shh-Proteingradient interpretiert? Durch Arbeiten hauptsächlich aus dem Labor von Thomas Jessell hat sich ein Modell entwickelt, daß im wesentlichen aus drei verschiedenen Stufen besteht (Briscoe et al. (2000)):

1. Zu Beginn der neuronalen Differenzierung kann das ventrale Neuralrohr in mindestens vier verschiedene Regionen entlang der dorso-ventralen Achse unterteilt werden. Diese unterschiedlichen Domänen sind gekennzeichnet durch die Expression verschiedener Kombinationen von Homöoboxgenen, wie *pax6*, *dbx1*, *dbx2*, *nkx2.2*, *nkx6.1* und *nkx6.2*.

Diese Homöoboxgene können in zwei Gruppen unterteilt werden: Eine Gruppe wird durch die Expression von Shh negativ, die andere positiv reguliert. Man bezeichnet die beiden Gruppen als Klasse I, respektive Klasse II. In Klasse I (Repression durch Shh) fallen *pax6* und *pax7*, *dbx1*, *dbx2* sowie *irx3* (Pierani et al. (2001); Ericson et al. (1997b); Briscoe et al. (2000)). Damit ergibt sich eine Abfolge der ventralen Grenzen der Expressionsdomänen von Pax6, Dbx1, Dbx2, Irx3 und Pax7 (ventral nach dorsal, s. Abb. 2).

Zu Klasse II gehören *nkx2.2*, *olg2*, *nkx6.1* und *nkx6.2* (Qiu et al. (1998); Briscoe et al. (1999); Vallstedt et al. (2001); Sander et al. (2000); Takebayashi et al. (2002); Rowitch et al. (2002)). Dabei wird *nkx2.2* ventral direkt angrenzend an die Bodenplatte exprimiert, es folgen *nkx6.1* und *nkx6.2* (s. Abb. 2).

2. Die Proteine der beiden Klassen reprimieren einander und verfeinern so die Grenzen ihrer Proteinexpressionen, indem Klasse I-Proteine mit Klasse II-Proteinen interagieren und umgekehrt. Dabei gehört zu jedem Interaktionspaar je ein Protein der beiden Klassen. Die gegenseitige Repression führt zur Bildung einer Expressionsgrenze, die die Begrenzung einer Zelltypdomäne darstellt. Am Beispiel der Domäne, in der die V₃-Interneurone entstehen (V₃), soll dies dargestellt werden: Zur Repression von *pax6* ist eine recht hohe Shh-Konzentration nötig (Briscoe et al. (2000)). Daher wird Pax6 auch fast im gesamten ventralen Neuralrohr exprimiert, mit Ausnahme der am ventralsten gelegenen Zellen (und der Bodenplatte, Ericson et al. (1997b)). Die Expression von *nkx2.2* wird zumindest indirekt durch hohe Konzentrationen von Sonic Hedgehog induziert (Ericson et al. (1997a)), was dazu führt, daß die Zellen direkt dorsal der Bodenplatte Nkx2.2 exprimieren. Durch die gegenseitige Repressionswirkung der beiden Proteine aufeinander wird nun eine

scharfe Grenze zwischen den Expressionsdomänen erreicht, so daß diese Domänen sich nicht überlappen (s. 2).

3. Die unterschiedliche Kombination der Homöodomänen-Proteine in den Zellen der einzelnen Domänen sorgt für die jeweilig unterschiedliche Expression von nachgeschalteten Genen, die die Spezifikation der einzelnen Zelltypen einleiten. Dabei ergeben sich für die einzelnen Domänen von ventral nach dorsal folgende Kombinationen (genannt sind nur Proteine, bei deren Verlust die einzelnen Domänen und neuronalen Identitäten fehlen):

V ₃ :	Nkx2.2
MN	Nkx6.1, Olg2
V ₂ :	Nkx6.1 + Irx3 + Pax6
V ₁ :	Dbx2 + Irx3 + Pax6
V ₀ :	Dbx1 + Irx3 + Pax6

Zusammenfassend läßt sich das Modell also wie folgt beschreiben: Ein Shh-Konzentrationsgradient sorgt für einen bestimmten Code an Homöodomän-Proteinen in jeder Zelle des ventralen Neuralrohrs entlang der dorso-ventralen Achse. Dieser Code bestimmt, welcher neurale Subtypus sich postmitotisch aus den einzelnen Vorläuferzellen entwickelt.

Andere Experimente haben gezeigt, daß TGF β -Signale, vor allem Mitglieder der BMP-Familie, für die Musterbildung des dorsalen Neuralrohr verantwortlich sind und daß BMP- und Hh-Signale im Neuralrohr überlappen ((Barth et al., 1999; Bauer et al., 2001; Nguyen et al., 2000; Timmer et al., 2002, Bauer H, 2)).

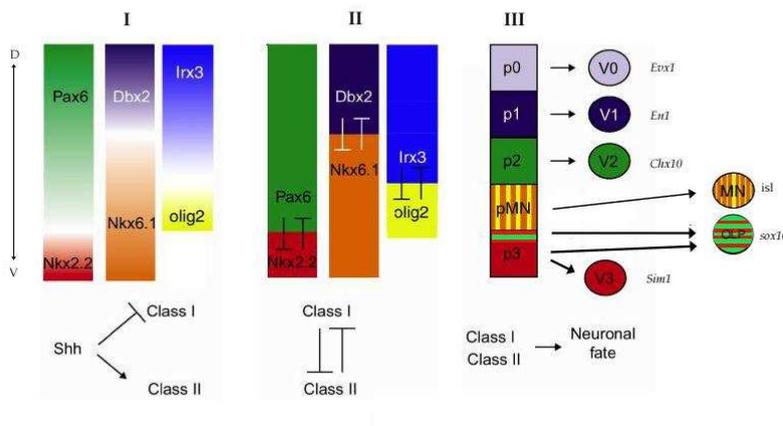


Abbildung 2: Interpretation des Shh-Gradienten durch Kombinationen verschiedener Transkriptionsfaktoren (I) und deren gegenseitige Wechselwirkungen (II) führt zur Ausbildung unterschiedlicher Regionen von neuronalen Vorläuferzellen im ventralen Neuralrohr (III). Abb. modifiziert nach Briscoe and Ericson (2001)

1.5 Der Transkriptionsfaktor Nkx6.1

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, ist die Expression eines bestimmten Homöobox-Gens entscheidend für die Festlegung bestimmter Domänen im ventralen Neuralrohr, in denen sich Vorläuferzellen bilden können. Untersuchungen vor allem an der Maus haben gezeigt, daß der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 – zunächst aus pankreatischen Zellen isoliert (Rudnick et al. (1994); Jensen et al. (1996)) und in der Pankreasanlage exprimiert (Sussel et al. (1998)) – zur Klasse II der Homöodomänen-Proteine gehört und entscheidende Bedeutung für die Spezifikation von Motorneuronen und einiger ventraler Interneuronen hat (Sander et al. (2000); Briscoe et al. (2000)). In der Maus ist *Nkx6.1* während der späten Neurulation im ventralen Drittel des Neuralrohr exprimiert (Qiu et al. (1998)) und umfaßt die Regionen der Vorläuferzellen von drei verschiedenen neuronalen Klassen: MN, V_2 - und V_3 -Interneurone. Die dorsale Grenze der Expression wird durch das zugehörige Klasse I-Protein Dbx2 festgelegt. In *nkx6.1*^{-/-}-Mutanten führt der Verlust dieser Expression zu einer deutlichen Abnahme der Anzahl der Motorneurone, sowie der V_2 -Interneurone. Im Gegensatz dazu verbreitert sich die Domäne der V_1 -IN nach ventral (Sander et al. (2000)). Diese Zunahme von V_1 -IN ist durch die ventrale Erweiterung der Expressionsdomäne von Dbx2 erklärbar, was zu einer Veränderung des "Protein-Codes" führt, die dem der V_1 -IN entspricht (s. auch Abb. 2).

1.6 Der Zebrafisch *Danio rerio* als Modellorganismus

Als Modellorganismus hat der Zebrafisch *Danio rerio* in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Die extrakorporale Entwicklung der zudem noch recht lange sehr transparenten Embryonen, eine Vielzahl von erzeugten mutanten Stämmen, sowie bewährte, auf den Zebrafisch übertragene genetische und molekularbiologische Methoden, machen ihn geeignet für eine Vielzahl von Studien. *Danio rerio* gehört zur Ordnung der Teleostier, also der Knochenfische. In den letzten Jahren hat seine Bedeutung als Modellorganismus für die Wirbeltierentwicklung stark zugenommen. Der Zebrafisch bietet verschiedene Vorzüge, die ihn als Studienobjekt besonders geeignet machen:

- **Haltung** - Durch seine geringe Größe ist der Zebrafisch auch unter modernen, meist räumlich begrenzten Laborbedingungen gut zu halten. In einem 65L-Tank können (eine gute Wasserversorgung vorausgesetzt) schon ca. 30 adulte Fische gehalten werden.
- **Verfügbarkeit** - Ein gut ernährtes Pärchen kann bis zu 500 befruchtete Eier in der Woche legen. Durch die Haltung in Anlagen mit Lichtrhythmus-Steuerung ist die Produktion von Nachkommen keinen saisonalen Schwankungen unterworfen.
- **Entwicklung** - Die Embryonen entwickeln sich extrakorporal und sind somit auch für morphologische experimentelle Eingriffe sehr gut zugänglich.
- **Transparenz** - Der Embryo bleibt bis zum Pharyngula-Stadium (ca. 24h nach Befruchtung) nahezu vollständig transparent, so daß die embryonale Entwicklung unter einem einfachen Stereomikroskop gut zu beobachten ist. Auch später kann die Pigmentierung durch geeignete Chemikalien im Wasser noch unterdrückt werden. Beobachtungen bis in das frühe Larvenstadium (ca. 3 Tage nach Schlüpfen) sind ohne Probleme möglich.
- **Generationszeit** - Eine für Wirbeltiere recht kurze Generationszeit von ca. drei Monaten erleichtert zusammen mit der einfachen Haltung genetische Studien, wie Erzeugung und Sichtung von Mutanten, sowie die Herstellung transgener Stämme.

1.7 Die Verwendung transgener Stämme

Auch in dieser Arbeit wurde auf transgene Stämme zurückgegriffen. Zur Herstellung dieser Stämme hat sich dabei ein letztlich recht einfach zu handhabendes System

bewährt: Die Fremd-DNA wird kurz nach der Befruchtung in das Zytoplasma des Embryos injiziert und integriert während der weiteren Zellteilungen auf noch unbekannt Weise in das Zebrafisch-Genom. Die Insertionsrate schwankt bei dieser Methode zwischen 0% und 25%. Trotz dieser Schwankungen ist diese Herstellung von Transgenen die bisher einzige, bei der das Aufwand/Nutzen-Verhältnis in vernünftigem Maßstab stehen. Viele Arbeiten sind bereits mit diesem System durchgeführt worden (Stuart et al. (1988, 1990); Culp et al. (1991); Bayer and Campos-Ortega (1992); Lin et al. (1992, 1994); Patil et al. (1994); Caldovic and Hackett Jr (1995); Higashijima et al. (1997); Caldovic et al. (1999); Scheer and Campos-Ortega (1999); Halloran et al. (2000); Scheer (2000); Hans (2001); Scheer et al. (2002)). Als Alternative stehen zwar andere Möglichkeiten zur Verfügung, z.B. die retrovirale Transformation (Lin et al. (1994)), jedoch eignet sich diese Methode nicht für alle experimentellen Ansätze, wie das Einbringen großer Konstrukte (Scheer (2000)). Zudem sind zum Arbeiten mit Retroviren besondere Sicherheitsmaßnahmen nötig.

Der Nachteil an der Arbeit mit transgenen Stämme in *Danio rerio* ist generell, daß die Integrationsloci der Fremd-DNA nicht vorher zu bestimmen sind. Darauf beruht auch die unterschiedlich starke Expressionsstärke unterschiedlicher Integrationsereignisse desselben Konstruktes (Stuart et al. (1988, 1990); Culp et al. (1991); Lin et al. (1994); Caldovic et al. (1999); Scheer and Campos-Ortega (1999)). Darüberhinaus bestimmt auch die Herkunft der eingebrachten DNA stark die Expressionsstärke: Integrationsereignisse mit heterologer DNA, z.B. aus *Xenopus*, unterliegen viel häufigeren und stärkeren Schwankungen als Konstrukte mit DNA aus dem Zebrafisch selbst. Dies gilt in besonderem Maße bei der Verwendung von Promotoren. Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden daher sorgfältig auf das Expressionsmuster des Transgens kontrolliert.

1.8 Das GAL4/UAS-System

Viele Erkenntnisse, die man über die Funktion und die Wirkungsweise von bestimmten Genen gewonnen hat, beruhen auf der Analyse von Mutanten. Auch im Zebrafisch sind bereits viele Mutanten untersucht und unterschiedlichsten Genen zugeordnet worden (Mullins et al. (1994); Driever et al. (1996); Haffter et al. (1996)). Eine große Zahl an Mutationsereignissen ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht und kartiert worden. Im übrigen liefert die Analyse von Mutanten zwar wichtige und oft auch hinreichende Hinweise über die Aufgabe eines Genes während der Entwicklung, die Untersuchungen gestalten sich jedoch dann schwierig, wenn das mutante Gen viele Aufgaben während unterschiedlicher Zeitpunkte der Entwicklung übernimmt. Als Beispiel sei hier das in dieser Arbeit untersuchte Gen *sonic hedgehog (shh)* genannt. Erschwert zudem durch Paraloge mit teilweise redundanter Funktion, liefert die Analyse der bekannten Mutation

in *shh* keine ausreichenden Informationen, um abschließend alle Funktionen von Sonic Hedgehog beurteilen zu können. Es lag daher auf der Hand, die Wirkung von Über- und Misexpressionen eines Gens ebenfalls zu untersuchen. Doch bei diesem Ansatz ergeben sich weitere Schwierigkeiten: Wählt man als Methode zur Überexpression z.B. die Injektion von Boten-RNA (mRNA) des betreffenden Genes im frühen Blastula-Stadium, so beeinflusst man zwar frühe Entwicklungsprozesse, dies aber möglicherweise so stark, daß nicht mehr klar ist, ob spätere Effekte auf die frühen Störungen zurückgehen oder tatsächlich auf die gestörte Funktion des Proteins zu einem späteren Zeitpunkt. Als Beispiel: Sonic Hedgehog beeinflusst die Musterbildung innerhalb des Somiten - es sorgt mit für die Unterteilung in Sklerotom und Myotom (Bumcrot and McMahon (1995); Tajbakhsh and Cossu (1997); Borycki et al. (1998); Marcelle et al. (1999)). Injektion von *shh*-mRNA im 1-2 Zellstadium kann aber die Achsen- und Musterbildung derart verändern, daß spätere Effekte in der Somitendifferenzierung allein auf die frühe Störung der Mesodermentwicklung zurückzuführen sein können. Von diesen wären dann die Effekte von Shh im späteren Stadium nicht mehr zu trennen (eigene Beobachtungen).

Die Injektion von mRNA kann daher gute Ergebnisse bei der Untersuchung früher Entwicklungsprozesse und der Rolle einzelner Gene liefern (Chitnis et al. (1995); Harvey and Melton (1988); Kintner (1988); Turner and Weintraub (1994)), für die Analyse späterer Abläufe und Regulationsmechanismen ist diese Methode aber nur sehr begrenzt geeignet.

Zur Vermeidung dieses Problem es bietet sich das GAL4/UAS-System an. Es beruht auf der Fähigkeit des Transkriptionsfaktors GAL4, die Expression von einem Minimalpromotor zu aktivieren, wenn diesem die Bindungsstellen für GAL4 vorgestellt sind (Guairente et al. (1982); Kakidani and Ptashne (1988)). Diese 17 bp langen Bindungsstellen mit dyadischer Symmetrie nennt man nach ihrer Lage und Funktion nach "GAL upstream activating sequences" (Giniger et al. (1985)). Beide Komponenten stammen aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das Protein GAL4 besteht aus einer DNA-bindenden und einer transaktivierenden Domäne (Gill and Ptashne (1987)). Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Verwendung des System ist natürlich, daß es im verwendeten Organismus keine homologen Elemente zu *Gal4* und *UAS* gibt. Nach aller Erfahrung scheint dies bei allen höheren Eukaryoten der Fall zu sein.

Der große Vorteil des Systems ist sein modularer Aufbau: Das Gen für GAL4 kann *in trans* zur UAS-kontrollierten Zielsequenz stehen. Daher ist es möglich, zwei getrennte transgene Stämme zu erzeugen – eine GAL4- oder Aktivatorlinie und eine UAS-oder Effektorlinie – die dann bei Bedarf gekreuzt werden können. Da GAL4 alleine keine Effekte in höheren Eukaryoten hat (Ornitz et al. (1991); Scheer and Campos-Ortega (1999)) und UAS ohne GAL4 keine Aktivierung des untergeordneten Promotors zu vermitteln ver-

mag (Giniger et al. (1985)), sind die einzelnen Stämme "wildtypisch", der Effekt selbst tritt nur in den Nachkommen einer Kreuzung auf. Gerade Gene mit morphogenetischer Funktion können daher einfach untersucht werden, weil die zusätzlichen Kopien in dem UAS-Stamm die Entwicklung und vor allem Haltung und Weiterzucht des Stamms nicht behindern – sie können ja ohne GAL4 nicht exprimiert werden. Durch die Verwendung geeigneter Promotoren kann man die Ausprägung von GAL4 zudem auch räumlich und zeitlich gezielt steuern. Die Mixexpression eines Gens unter UAS-Kontrolle kann so auch auf bestimmte Gewebe in definierten Entwicklungszeiträumen begrenzt werden (Fischer et al. (1988); Ornitz et al. (1991); Brand and Perrimon (1993)). Durch die Modularität des Systems sind natürlich viele Kombinationen von Aktivator- und Effektorlinien möglich.

In *Drosophila* ist die Verwendung des Systems seit Jahren gebräuchlich und seine Vorteile hinreichend bestätigt (Fischer et al. (1988); Brand and Perrimon (1993)). Einige Versuche in Maus und *Xenopus* verliefen ebenfalls positiv (Ornitz et al. (1991); Hartley et al. (2002)). Im Zebrafisch wurde das System in unserem Institut etabliert, getestet und erste Funktionsanalysen vorgenommen (Scheer and Campos-Ortega (1999); Scheer (2000); Lawson et al. (2001); Scheer et al. (2001, 2002)).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie oben beschrieben, ist *sonic hedgehog* sehr wichtig für den korrekten Ablauf der neuronalen Musterbildung. Überexpressionen dieses Gens mit Hilfe von mRNA-Injektionen konnten bisher nur eingeschränkte Erkenntnisse über die Aufgaben dieses Gens während der verschiedenen Stadien der Neurogenese im Zebrafisch liefern (Krauss et al. (1993); Ecker et al. (1995); Currie and Ingham (1996); Chandrasekhar et al. (1998)). Um die genaue Funktion von *shh* v.a bei der neuronalen Musterbildung von *Danio rerio* besser zu verstehen, sollten in dieser Arbeit mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems unterschiedliche Mixexpressionen dieses Gens vorgenommen und die Auswirkungen auf die neuronale Entwicklung analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Bezugsquellen und Allgemeines

Verbrauchskemikalien wurden, soweit erhältlich, in der Qualität pro analysi (p. A.), wenn nicht anders genannt, von folgenden Firmen bezogen:

Biometra (Göttingen); Biomol (Hamburg); Biozym (Hameln); Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); Fluka (Neu-Ulm); Invitrogen (Eggenstein); Merck (Darmstadt); Pharmacia/LKB (Freiburg); Roth (Karlsruhe); Sigma (Deisenhofen).

Zum Ansetzen der Medien und für sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurde Reinstwasser (Milli-Q Wasserreinigungssystem, Millipore Eschborn) verwendet. Lösungen für die Molekularbiologie wurden autoklaviert bzw. sterilfiltriert (0,2 μm Filter, Schleicher und Schüll).

Glaswaren wurden entweder autoklaviert oder hitzesterilisiert.

Enzyme für die Molekularbiologie wurden, soweit nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen : Roche (Mannheim); Invitrogen (Eggenstein).

Diese Arbeit wurde unter dem Betriebssystem *Linux (SuSE 7.3)* mit dem Textverarbeitungsprogramm *Lyx (v.1.2.0)* geschrieben. Die gezeigten Bildtafeln wurden an einem *Apple Macintosh G4* mit dem Programm *Adobe Photoshop 7.0*, sowie unter *Linux* mit dem Programm *The Gimp* bearbeitet und über einen Drucker auf *Epson Glossy Paper (Photo Quality)* ausgegeben. .

2.2 Abkürzungen und Symbole

AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
°dH	Grad Deutscher Härte
Dig	Digoxigenin
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethan) -Sulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
MO	Morpholino
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBT	PBS mit 0,1 % Triton X-100
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SSC	standard saline citrate (Sambrook et al., 1989)
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer (Sambrook et al., 1989)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheit (unit)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolette Strahlung
h	Stunde
'	Minute
''	Sekunde
x	-fach

Die Benutzung wissenschaftlicher Einheiten sowie die Verwendung der Symbole für Nuklein- und Aminosäuren erfolgte gemäss der international gebräuchlichen Konventionen.

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

Antibiotika	Tetracyclin: 10 mg/ml in 100% Ethanol wird nach Herstellung steril filtriert Ampicillin: 50 mg/ml in 70% Ethanol wird nach Herstellung steril filtriert
Auftragspuffer	0,1 % Bromphenolblau
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP-Toluidinsalz in Dimethylformamid
DAB-Stocklösung	1 mg/ml Diaminobenzidin-Hydrochlorid in PBT
DEPC-H ₂ O	0,1 % (w/v) DEPC in H ₂ O ü.N. auf 37°C stellen, dann autoklavieren
Dig-Färbelösung:	100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; 100 mM Tris/HCl pH 9,5; 0,1 % Tween 20; 1 mM Levamisol (Sigma)
DNA-Extraktionspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,2; 10 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,5 % (v/v) SDS; 200 µg/mL Proteinase K (frisch zugegeben)
Glukose-Lösung	2,25 g Glukose; 6,25 mL Tris/HCl, pH 8,0; 0,93 g EDTA; mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen
Hyb+:	50 % Formamid; 5x SSC; 0,1 % Tween 20
Hyb-:	976 µl Hyb-; 10 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml); 5 µl Heparin (10 mg/ml); 4 µl Hefe-tRNA (25 mg/ml)
Injektionspuffer (5x)	25 mM Tris, pH 8,0; 2,5 mM EDTA pH 8,0; 0,5 M KCl

Mesab (Tricain)	400 mg 3-amino benzoic acidethylester (Sigma) in 97,9 ml H ₂ O; mit 2,1 ml Tris/HCl, pH 9,0 auf pH 7,0 einstellen; Zur Betäubung: 4,2 mL auf 100 mL Aquarienwasser
Methylzellulose	3 % in Zebrafischringer
NH ₄ Ac-Isopropanol	10 M NH ₄ -Acetat mit Isopropanol 1:4 mischen
NBT-Lösung	100 mg/ml NBT-Salz in 70 % DMF
P1	50 mL Glukoselsg.; 250 mg Lysozym; 250 mg RNase A; mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen
P2	0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS
P3	3 M KaAc; 11,5 % (v/v) Essigsäure
PBS	130 mM NaCl; 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,6)
PBT	PBS mit 0,1 % Triton X-100
PFA	4 % (w/v) PFA in PBS
Phenolrot	2 % (w/v) in H ₂ O
Proteinase K	14-22 mg/ml (Roche Diagnostic GmbH)
RNase Stocklösung	10 mg/ml in H ₂ O; zur Inaktivierung von DNasen 10 min kochen lassen
RNase-H ₂ O	50 µg RNase/ml
SSC (20x)	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat
TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 7,7, 0,1 M EDTA
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA
1/3 Zebrafischringer (ZFR)	40 mM NaCl; 1 mM KCl; 1,5 mM HEPES; 2,5 mM CaCl ₂ ; mit 2 M NaOH auf pH 7,2 einstellen

Nährmedien

LB-Medium (1L)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl in 1 H ₂ O Liter lösen, autoklavieren
LB-Agarplatten	1 Liter LB-Medium; 5 g NaCl; 15 g Agar-Agar mischen, autoklavieren
NZY-Medium (1L)	10 g Caseinhydrolysat; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 5 g MgCl ₂ in 1 Liter H ₂ O lösen, autoklavieren
NZY-Agarplatten	1 Liter NZY-Medium; 15 g Agar-Agar mischen, dann autoklavieren
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose

2.4 Genetische Nomenklatur in dieser Arbeit

Gene, mRNAs und Mutanten klein und kursiv. Proteine nicht-kursiv und Anfangsbuchstaben groß.

2.5 Generelle Methoden zur Haltung und Zucht des Zebrafisches

2.5.1 Verwendete Zebrafischstämme

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit einer Zebrafisch-Wildtypelinie gearbeitet, deren Gründertiere aus einem Kölner Zoofachgeschäft bezogenen wurden.

2.5.2 Haltung und Zucht des Zebrafisches

Zebrafische wurden bei einer Wassertemperatur von 24-28°C und einem Lichtrhythmus von 14h hell zu 10h dunkel in einem geschlossenen Aquariensystem gehalten (Firma Schwarz Aquarienbau Göttingen; nähere Beschreibung des Systems zu finden in Mullins et al. (1994).

Eine gute Wasserqualität ist für Gesundheit, Reproduktivität und Überlebensrate der Fische essentiell: das zur Aquarienfällung verwendete, über Aktivkohle gereinigte Leitungswasser wurde mit entmineralisiertem (VE) Wasser verschnitten (Leitwert von ca. 500-600 μ S, pH = 7, Gesamthärte 17-20°dH, Nitrit- und Ammoniumkonzentration = 0, Nitratkonzentration < 50 mg/l).

Jungfische wurden ohne Fütterung bis zum 5. Tag ihrer Entwicklung in mit Embryowasser oder Zebrafischringer gefüllten Petrischalen in einem 29°C-Brutschrank gehalten. Anschließend wurden die Fische in 2 l Wassercontainern aufgezogen. Bis zu einem Alter von zwei Wochen wurde ein spezielles Trockenfutter (*Tetra*) für Jungfische verfüttert, danach zunächst *Artemia salina* und schließlich Bosmiden (Rüsselflohkrebs).

In Fällen, in denen das Auskreuzen einzelner Fische notwendig war, wurden geschlechtsreife Fische separat in 1 l Plastikboxen gehalten.

Eiablage und Aufzucht erfolgten nach Empfehlungen aus Westerfield (1995), die auf die konkreten Gegebenheiten der benutzten Aquarienanlage ausgerichtet wurden.

2.5.3 Eiablage

Eier wildtypischer Fische wurden in aller Regel aus Kreuzungen mehrerer adulter Tiere erhalten. Dazu wurden 4 Monate bis 2 Jahre alte Zebrafisch-Männchen und -Weibchen bis zu einer Gesamtzahl von maximal 20 Tieren in großen 20 l-Tanks zusammengesetzt. Einmal in der Woche wurde abends eine Laichbox in den jeweiligen Tank gestellt und am nächsten Morgen wurden die Embryonen ca. eine halbe Stunde nach Beginn der Hellzeit abgesammelt. Einzelkreuzungen wurden in 2l-Wassercontainern durchgeführt, deren Böden mit Murmeln bedeckt waren. Die zu kreuzenden Männchen und Weibchen wurden bis zu 6 Stunden vor Beginn der Dunkelzeit zusammengesetzt und die Eier kurz nach dem Beginn der darauffolgenden Hellzeit abgesammelt

2.5.4 Einteilung der Entwicklungsstadien

Die Bestimmung und Einteilung der Entwicklungsstadien des Zebrafisches erfolgte durch einfache Beobachtung unter dem Stereomikroskop (10-40-fache Vergrößerung) nach den Vorgaben von Kimmel et al. (1995). Bei älteren Stadien wurde die Zeit nach der Befruchtung unter standardisierten Aufzuchtbedingungen zur Bezeichnung eines Stadiums verwendet. Da sich selbst unter diesen Bedingungen nicht alle Individuen genau gleich schnell entwickeln (Kimmel et al. (1995)), mag es zu leichten Unterschieden im Alter zweier Vergleichstiere kommen. Da in dieser Arbeit aber in allen Fällen mit einer relativ großen Zahl von Nachkommen gearbeitet werden konnte, sollten sich solche Unterschiede über die betrachtete Organismenzahl herausmitteln. Zeitangaben zur Bezeichnung eines Entwicklungsstadiums beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, immer auf den Zeitpunkt der Befruchtung. In Fällen bei denen der Ausdruck Larve verwendet wurde, müssen drei Tage zur Berechnung der seit der Befruchtung vergangenen Zeit hinzugezählt werden, da Larven mit ca. drei Tagen aus dem Chorion schlüpfen.

2.6 Mikroinjektion

Zur Misexpression einzelner Gene wurde *in vitro* transkribierte mRNA benutzt (s. 2.10.15).

2.6.1 Injektionslösungen

Die Injektionslösung enthielten die jeweils folgenden Komponenten:

mRNA-Lösungen

- 300-500 ng/ μ l der zu injizierenden mRNA (s. Text)
- 0,2 % Phenolrot zur Abschätzung des Injektionsvolumens
- DEPC-H₂O zur Verdünnung

Morpholino-Lösungen

- x ng zu injizierendes MO (s.Text)
- 0,2 % Phenolrot zur Abschätzung des Injektionsvolumens
- H₂O zur Verdünnung

2.6.2 Injektionen

Die RNA- oder MO-Lösung wurde vornehmlich in die sich bildende Plasmakappe des frühen Zygotenstadiums oder in eine der beiden Blastomeren im Zwei-Zell-Stadium injiziert. Die Mikroinjektionen erfolgten unter einem Zeiss-Stereomikroskop (Stemi DRC). Der für die Injektionen notwendige Druck wurde mit gasförmigem Stickstoff erzeugt und durch ein WPI-Injektionsgerät (PV 820) reguliert. Die Bewegungen der Kapillare wurden mit Hilfe eines Leitz-Mikromanipulators ausgeführt. Als Mikropipetten wurden 1 mm Hilgenberg-Glaskapillaren mit Innenfilament verwendet, die auf einem Flaming/Brown P-97 Micropipette Puller der Firma Sutter Instruments Co ausgezogen und unmittelbar vor der Injektion unter dem Stereomikroskop mit einer feinen Uhrmacherpinzette auf eine geeignete Länge gekürzt wurden. Als Geräteeinstellung wurden folgende Parameter zur Herstellung geeigneter Injektionsnadeln empirisch ermittelt:

- heat-537
- pull-100
- velocity-100
- time-150

Die Injektionen erfolgten in Zebrafischringer. Dabei wurde das Ei mit der Kapillarenspitze in eine für die Injektion günstige Orientierung gebracht und die Kapillare in steilem Winkel durch das Chorion hindurch in das Zytoplasma eingeführt. Daraufhin wurde durch Betätigung eines Fußschalters für eine Sekunde der Injektionsdruck aufgebaut und die RNA-Lösung ins Ei injiziert. Erfolgreiche Injektionen waren durch eine leichte Rotfärbung des Cytoplasmas zu erkennen. Aus der Zahl der Embryonen, die mit einem gegebenen Volumen Lösung injiziert werden konnten ergab sich, daß pro Embryo ungefähr 2-8 nl Injektionslösung injiziert wurden.

2.6.3 Morpholino-Injektion

Das von der Firma gelieferte Lysat wurde zunächst in Wasser aufgenommen, um eine Stammlösung von 1 mM (= 8 mg/ml) zu erhalten. Weitere Verdünnungen und Injektionslösungen wurden mit $H_2O_{dest.}$ angesetzt. Injektionen erfolgten wie in Kap. 2.6 beschrieben.

2.7 Hitzeschock von Zebrafisch-Embryonen

Um eine induzierbare Expression bestimmter Gene zu ermöglichen, wurden Hitzeschock-Experimente an Zebrafisch-Embryonen durchgeführt, in deren Aktivator-konstrukt ein endogener Hitzeschock-Promotor (*hsp70*, Halloran et al. (2000)) die Expression von *Gal4* kontrollierte. Dazu wurden bis max. 15 Embryonen in Zebrafisch-Ringer in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß der Firma *Biozym* überführt. Die Reaktionsgefäße wurden in einer PCR-Maschine (*TRIO-ThermoblockTM*, *Biometra*) für eine bestimmte Zeit mit einer bestimmten Temperatur erhitzt. Falls nicht anders angegeben, lagen diese Werte typischerweise bei 41°C für 30 Minuten.

2.8 Cyclopamin-Behandlung

Cyclopamin der Firma *Toronto Research Chemicals, Inc., Toronto, Kanada* wurde zunächst aufgelöst in Ethanol in einer Konzentration von 10 mM. Jeweils 10 Embryonen (im Chorion) wurden ab 50% Epibolie in mit 100 μ M Cyclopamin in Zebrafisch-Ringer gefüllte Reaktionsgefäße transferiert, der Deckel nicht ganz geschlossen und zur weiteren Entwicklung bei 28,5°C im Dunkeln gehalten.

2.9 Histologische Methoden

2.9.1 Enzymatisches Dechorionisieren von Embryonen

Bei der Fixierung älterer Embryonen (24-48 hpf) ist das vorherige Dechorionisieren wichtig, da sich der Embryo im Chorion zusammenkrümmt und diese Krümmung nach der Fixierung sonst erhalten bliebe. Dies würde gerade die Analyse von Färbungen im

Rumpf- und Schwanzbereich unnötig erschweren.

Dieses Dechorionisieren kann enzymatisch vorgenommen werden:

- Embryonen in 10 ml ZFR geben
- 330 μ l 10 mg/ml Pronase E (aus *Streptomyces griseus*) zugeben
- 10-15' inkubieren, nach ca. 10' die Eier immer mal wieder mit einer Transferpipette aufsaugen und wieder ausstoßen.

2.9.2 Fixierung von Zebrafischembryonen

Um die nachfolgend beschriebenen Färbungen durchzuführen, wurden Zebrafischembryonen wie folgt fixiert und gegebenenfalls gelagert:

PFA-Fixierung

- Embryonen im gewünschten Stadium ÜN bei 4°C in 4% PFA fixieren
- 3x kurz in PBT waschen
- Embryonen mit feinen Uhrmacherpinzetten dechorionisieren
- Embryonen für 5' in Methanol waschen
- Methanol durch frisches ersetzen und bei -20°C lagern (mindestens 1 Jahr möglich).

Osmium-Fixierung

Zur besseren Konservierung morphologischer Strukturen, wurden einige Embryonen, die für Semi-Dünnschnitte verwendet wurden, einer Osmium-Fixierung unterzogen:

- 4x 15' in Mix-Puffer waschen
- 1h in 1% (w/v) OsO₄ in Mix-Puffer auf Eis im Dunkeln fixieren
- Mix-Puffer: 0,2 M NaH₂PO₄ · H₂O; 0,2 M Na₂HPO₄ · 2H₂O
- Phosphat-Lösungen erst einzeln ansetzen, dann 1:1 mischen

2.9.3 Glyzerin-Einbettung

Embryonen oder Larven nach Waschen in PBT nacheinander jeweils solange in 30%, 50%, 70% und 87% Glyzerin aufbewahren, bis sie absinken. Embryonen jünger als 20 hpf wurden in aller regel mit spitzen Wolfram-Nadeln vom Dottersack befreit und freie Dotterschollen mit einem feinen Haar beseitigt. Danach wurden sie mit der ventralen Seite zum Objektträger hin eingedeckelt. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden meist 1-2 Tropfen Glycerin zugegeben.

2.9.4 Durcupan™-Einbettung

- je 5' in 70%, 80%, 90%, 96% Ethanol
- 2 x 10' in 100% Ethanol
- 2 x 10' Aceton
- ü.N. bei 4°C in 1:1 Aceton/Durcupan™- Gemisch
- zur endgültigen Einbettung in frisches Durcupan überführen.

2.9.5 Gelatine-Beschichtung für Objektträger

- Objektträger kurz unter fließendem Wasser spülen
- 5' in H₂O dest. spülen
- 2 x kurz in 96% Ethanol waschen, dann trocknen
- kurz in 0.5% (w/v) Gelatine-Lösung in H₂O dippen, dann trocknen

2.9.6 Semi-Dünnschnitte

Semi-Dünnschnitte (2-15µm) wurden mit Glasmessern an einem *LKB Ultratom (Ultratome III)* hergestellt, auf Gelatine-beschichtete Objektträger überführt, auf einer Heizplatte getrocknet und dann mit einer dünnen Schicht Durcupan™ eingedeckelt.

2.9.7 Bleichen pigmentierter Embryonen

Die mit ca. 22h einsetzende Bildung von Melanozyten kann bei der Färbung älterer Embryonen hinderlich sein. Durch Behandlung mit H₂O₂ können die Pigmente gebleicht werden, was die Untersuchung sehr erleichtert:

- Embryonen 20' in 4% PFA fixieren
- 5' mit PBT waschen
- 5h in 5% H₂O₂ in PBT (oder ü.N in 1% H₂O₂ in PBT) bleichen

2.9.8 Kollagenase-Verdau für Embryonen

Bei Embryonen über 24h setzt eine verstärkte Ausbildung der Epidermis ein, die die Permeabilität für Antikörper und insbesondere RNA-Sonden stark herabsetzt. Neben der später beschriebenen Behandlung mit Proteinase K hat die Verwendung von Kollagenase den Vorteil, daß sie den Embryo nicht so stark angreift und daher schonender ist. Bei Embryonen älter als 24h wurde daher vor einer Färbung nach folgendem Protokoll verfahren:

- 20' in 4% PFA in PBT fixieren
- 2x 5' in PBT waschen
- 15-30' in 0.1% (v/v) Kollagenase in PBT inkubieren

2.9.9 Antikörper-Färbungen

Embryonen oder Larven in ggf. bleichen (s. Kap. 2.9.7) und in 4% PFA fixieren (s. Kap. 1.9)

- 2x kurz mit PBT waschen
- falls nicht schon geschehen (s. Kap. 2.9.1), Embryonen mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten dechorionisieren
- evt. bei -20°C in MeOH lagern
- 2 x 5' mit PBT waschen
 - Falls Embryonen älter als 24hpf:
 - Kollagenase-Behandlung (s. Kap. 2.9.8)
 - 2 x 5' mit PBT waschen
 - 10' in 4% PFA fixieren
 - 1 x 5' mit PBT waschen
 - 8' in 2 µg/ml Proteinase K inkubieren (nicht auf Taumler stellen)

- 1 x 5' mit PBT waschen
- 10' in 4% PFA fixieren
- 2 x 5' mit PBT waschen

- kurz mit H₂O spülen
- 7' in eiskaltem Aceton bei -20°C inkubieren
- kurz mit H₂O spülen
- 2 x 5' mit PBT waschen
- 2 h bei RT in 10 % Ziegenserum¹, 5% DMSO in PBT präinkubieren
- bei 4°C ü.N. mit dem 1. Antikörper in 10% Ziegenserum, 5% DMSO in PBT inkubieren
- 8 x 10' mit PBT waschen
- bei 4°C ü.N. mit dem 2. Antikörper (Meerrettich-Peroxidase gekoppelt oder mit Fluorophor markiert) in 10% Ziegenserum, 5% DMSO in PBT inkubieren
- 4 x 15' mit PBT waschen
 - Falls der 2. Antikörper nicht durch Autofluoreszenz nachweisbar ist, folgt die Detektion:
 - 400 µl PBT und 100 ml 10% DAB-Lösung zugeben und mindestens 15' bei RT im Dunkeln inkubieren
 - Farbreaktion durch Zugabe von 1,5 µl 30% H₂O₂ starten und unter Stereomikroskop kontrollieren
 - Bei ausreichender Färbung durch mehrmaliges Waschen mit PBT abstoppen

Bei schwachen Färbungen konnte die Intensität des Signals durch die Verwendung eines "Verstärker-Kits" (*Vectastain®Universal Elite ABC Kit*, Firma *Vector Laboratories, Inc.*) erhöht werden. Hierzu wurde das Protokoll wie folgt modifiziert:

- Präinkubation und Inkubation mit 1. AK wurden in 3% Pferdeserum, 5% DMSO in PBT durchgeführt, jeweils 2h bei RT, bzw. bei 4°C ü.N. (s.o).

¹Wahl des Serums hängt von der Herkunft des 2. Antikörpers ab, in dieser Arbeit meist aus Ziege, s. Kap. 2.9.10

- als 2. Antikörper wurde ein Biotin gekoppelter Antikörper aus dem Pferd benutzt, der spezifisch gegen den 1.AK gerichtet war. Die Wahl dieses 2.AK ist abhängig von der Herkunft des 1. AK; in dieser Arbeit wurde ausschließlich Pferd α Maus verwendet.
- Die Inkubation des 2.AK erfolgte bei 4°C ü.N. in PBT
- 10 x 10' mit PBT waschen
- währenddessen je 20 μ l der Komponenten A und B in 1 mL PBT geben (**KEIN** Serum verwenden), mischen und ca. 30' bei RT inkubieren (Komplexbildung)
- Embryonen in A/B-Komplex bei 4°C ü.N. inkubieren
- 10 x 10' mit PBT waschen
- Detektion wie oben

2.9.10 Verwendete Antikörper

Tabelle 2 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Name und Art des verwendeten AK Kurzbezeichnung	Erhalten von / Referenz	Verdünnung
monoklonaler Maus-AK gegen DM-GRASP Protein in sek.. Motorneuronen des ZF zn-8	Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa, USA Trevarrow et al. (1990); Fashe- na and Westerfield (1999)	1:50
monoklonaler Maus-AK gegen nicht identifiziertes Antigen in radialen Gliazellen des ZF zrf-1	Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa, USA Trevarrow et al. (1990)	1:50
monoklonaler Maus-AK gegen acetyliertes Tubulin aus Seeigel α -acet.-tub	Sigma, Deisenhofen	1:100
Polyklonales Ziege F(ab') ₂ -Fragment gegen Maus IgM + IgG (H+L), Meerrettich-Peroxidase konjugiert goat α - mouse-HRP	Dianova, Hamburg	1:1000
polyklonaler Ziege α -Maus Antikörper, Cy2-konjugiert goat α -mouse-Cy2	Dianova, Hamburg	1:100
polyklonaler Schaf α -Digoxigenin, alkal. Phosphatase konjugiert α -dig-AP	Roche, Mannheim	1:6000
polyklonaler Schaf α -Fluorescein, alkal. Phosphatase konjugiert α -flu-AP	Roche, Mannheim	1:2000
polyklonaler Ziege α -Maus Antikörper, Cy2-konjugiert goat α -mouse-Cy2	Dianova, Hamburg	1:100
polyklonaler Kaninchen-AK gegen Nkx6.1 aus Maus α -Nkx6.1	Hagedorn Research Institute, Dänemark Jensen et al. (1996)	1:100

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

2.9.11 whole mount-*in situ* Färbungen an Embryonen

Sonden für die *in situ*-Hybridisierung am Zebrafisch wurden durch *in vitro*-Transkription unter Verwendung des Roche Kits *Dig RNA Labeling and Detection Kit nonradioactive* mit Digoxigenin-markiertem dUTP hergestellt. Das Protokoll des Herstellers wurde im wesentlichen befolgt.

Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Der Vektor pBluescript mit dem als Sonde dienendem cDNA-Fragment wird linearisiert; die Linearisierung sollte so erfolgen, daß stromabwärts zum Insert möglichst wenig Vektor-Sequenzen bestehen bleiben, um nicht-spezifische Hybridisierungen zu vermeiden. Der linearisierte Vektor wird mit Phenol und Chloroform extrahiert, gefällt und in einem geeigneten Volumen H₂O aufgenommen.

Zur Markierung dient folgender Reaktionsansatz:

- $x \mu\text{l}$ linearisierter Vektor (eingesetzte Menge sollte 1 μg kloniertem Fragment entsprechen)
- 2 ml 10x Transkriptionspuffer
- 2 μl Dig-NTP labeling Mix
- 2 μl T3- bzw. T7-Polymerase (Roche)
- 0,5 μl RNase-Inhibitor (Roche, 40 U/ μl)
- auf 20 μl mit DEPC-H₂O auffüllen und 2h bei 37°C inkubieren
- um die noch vorhandene Vektor-DNA abzubauen, 1 U RNase-freie DNase (Roche, 10 U/ μl) zugeben, 30' bei 37°C inkubieren
- Reaktion stoppen mit 2 μl 0,1 M EDTA
- füllen mit 2,5 μl 4 M LiCl und 75 μl 100 % Ethanol bei -70°C für 30'
- kurz waschen in 70 % Ethanol, trocknen
- aufnehmen in 100 μl DEPC-H₂O plus 0,5 μl RNase-Inhibitor (40 U/ μl)

Aufreinigung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Digoxigenin-markierte RNA-Sonden wurden mittels einer einfachen Methode gereinigt (Stefan Schulte-Merker, persönliche Mitteilung). Bei dieser Reinigung werden eventuell noch vorhandene DNA-, sowie kleine Digoxigenin-markierte RNA-Fragmente abgetrennt:

- 500 μ l einer gesättigten Lösung von Sephadex G50-50 (Fluka) in DEPC-H₂O auf eine "PCR purification - Säule" (Qiagen) auftragen
- 1' bei 4000g zentrifugieren und Eluat verwerfen
- in DEPC-H₂O gelöste RNA-Sonde auf die Säule auftragen
- 1' bei 4000g zentrifugieren
- Eluat fällen mit 12,5 μ l 4 M LiCl und 375 μ l Ethanol (-20°C) pro 100 μ l eingesetzter Sonde für 30' bei -70°C
- 30' bei 14.000 rpm zentrifugieren
- kurz waschen in 70 % Ethanol, trocknen
- aufnehmen in gleicher Menge DEPC-H₂O wie zuvor eingesetzt plus 0,5 μ l RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)

Färbung

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei RT ausgeführt.

- Embryonen in 4 % PFA über Nacht bei 4°C oder 2h bei RT fixieren
- kurz in PBT waschen und dechorionisieren
- Embryonen können bei -20°C in Methanol entweder für mindestens 3h inkubiert und dann wie unten weiterbehandelt oder für mindestens 1 Jahr gelagert werden
- für 5' mit 50 % Methanol/PBT bei RT waschen
- für 5' mit 30 % Methanol/PBT bei RT waschen
- 2x 5' mit PBT waschen
- nachfixieren für 20' in 4 % PFA bei RT
- 2x 5' mit PBT waschen
- um die Permeabilität der Embryonen zu erhöhen, ohne Taumeln bei Raumtemperatur mit 1 mg/ml Proteinase K (Proteinase K solution, Roche) 1:500 verdünnt in PBT verdauen:

- 3' (bis 12 Somiten-Stadium), 5' (bis 24 Somiten-Stadium) oder 8' (ab 30h)
- kurz mit PBT spülen, dann 5' mit PBT waschen
- 20' in 4 % PFA nachfixieren
- 5' mit PBT waschen
- zur Unterdrückung endogener Phosphatasen Embryonen in 1 ml 0,1 M Triethanolamin pH 7 mit 2,5 μ l Acetanhydrid für 10' bei Raumtemperatur inkubieren
- 2x 5' in PBT waschen
- Embryonen für 5' in Hyb- bei 65°C inkubieren, dann 4 h bei 65°C in Hyb+ prähybridisieren
- 100 μ l frisches Hyb+ mit 1 μ l denaturierter, Dig-markierter RNA-Probe zugeben und für 16 h bei 65°C inkubieren
- Hybridisierungslösung entfernen, kann wiederverwendet werden
- 10' bei 65°C mit 75% Hyb+ / 25% 2x SSC waschen
- 10' bei 65°C mit 50% Hyb+ / 50% 2x SSC waschen
- 10' bei 65°C mit 25% Hyb+ / 75% 2x SSC waschen
- 10' bei 65°C mit 2x SSC waschen
- 2x 30' bei 65°C mit 0,2x SSC waschen
- 10' mit 75% 0,2x SSC / 25% PBT waschen
- 10' mit 50% 0,2x SSC / 50% PBT waschen
- 10' mit 25% 0,2x SSC / 75% PBT waschen
- 10' mit PBT waschen
- 2 h in 1 % BSA/PBT präinkubieren
- Inkubation ü.N bei 4°C mit den alkalische Phosphatase-gekoppelten α -Dig Fab-Fragmenten (zuvor auf unbehandelten Embryonen präabsorbiert),
- 1:6000 verdünnt in 1 % BSA/PBT
- 8x 15' waschen in PBT
- die Embryonen 2x 5' in Dig-Färbelösung waschen, 1 ml frische Dig-Färbelösung mit 4,5 μ l NBT und 3,5 μ l BCIP zugeben und in Dreierblockschälchen überführen
- nach ausreichender Färbung Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT stoppen

2.9.12 Digoxigenin / Fluorescein-Doppelfärbung

In manchen Fällen wurde eine Dig (blau) / Flu (rot)-Doppelfärbung an Embryonen durchgeführt, um die Expression zweier unterschiedlicher RNA-Typen in einem Embryo beobachten zu können. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Protokoll von oben verfolgen, nur die Embryonen jetzt mit beiden markierten Sonden ü.N. bei 65°C inkubieren und bei der Inkubation mit den Fab-Fragmenten den anti-Flu Antikörper (1:1000) verwenden, nach den 8 x 15'-Waschschritten in PBT die Embryonen 2 x 5' in 0,1 M Tris pH 8,2 / 0,1 % Tween 20 waschen, während des Waschens eine Fast-Red-Tablette (Roche) in 2 ml 0,1 M Tris pH 8,2 / 0,1 % Tween 20 auflösen, Embryonen zusammen mit der Färbelösung in Dreierblockschälchen überführen und wie bei der Dig-Reaktion färben lassen, bei ausreichender Färbung 3 x 5' mit PBT waschen, freie Phosphataseaktivität durch Inkubation für 10' in 0,1 Glycin-HCl pH 2,2 / 0,1 % Tween 20 blockieren, 4 x 5' mit PBT waschen, Inkubation bei 4°C ü.N. mit alkalische Phosphatasegekoppelten anti-Dig Fab-Fragmenten, wie oben beschrieben und danach das Protokoll für die Dig-Färbung zu Ende führen.

2.9.13 Verwendete Sonden

Tabelle 3 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit für eine *in situ* Färbung benutzten Sonden. Zur Herstellung von Sonden siehe 2.9.11.

Sonde	erhalten von	Vektor	lin. mit	Polymerase
<i>isl1</i>	V. Korzh	pBS SK-	EcoRI	T7
<i>isl2</i>	H. Okamoto	pBS KS-	SpeI	T3
<i>lim3</i>			BamHI	T3
<i>vsx1</i>				
<i>vsx2</i>				
<i>olg2</i>	B. Appel	pCR Script	BglIII	T3
<i>evx1</i>	F. Avaron	pCS2+	BamHI	T7
<i>eng1b</i>	selbst klon./EST	pGEM-T Easy		
<i>pax6a</i>	selbst klon./EST	pGEM-T Easy	SmaI	SP6
<i>Gal4</i>	N. Scheer	pBS KS+	Asp718	T7
<i>pax7a</i>	H.C Seo	pT7/ Blue	EcoRI	T7
<i>dbx1a</i>	H.C Seo	pTarget	Not I	T7
<i>dbx2a</i>	H.C Seo	pTarget	Not I	T7
<i>nkx2.2</i>	K. Rohr	PBS SK-	BamHI	T7
<i>nkx6.1</i>	selbst klon.	pGEM-T Easy	ApaI	SP6
<i>shh</i>	S.C. Ekker	pBS SK-	HindIII	T7
<i>twhh</i>	S.C. Ekker	pBS SK-	PstI	T7
<i>sox10</i>	R. Kelsh	pBS SK+	Sall	T7
<i>iro3</i>	Z. Gong	pBS SK+	BamHI	T7
<i>ptc1</i>			XbaI	T3

Tabelle 3: Verwendete Sonden

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation in Bakterien transformiert. Als transformationskompetente Bakterien wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Hanahan (1985)) verwendet. Die Herstellung erfolgte nach folgendem Verfahren:

- Animpfen von 1 l LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur im Verhältnis 100:1
- Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD600 von 0,5-1
- 15-20 min auf Eis kühlen
- 15 min bei 4°C und 4000 rpm in einem GSA-Rotor zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)

- Pellet in 0,5 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 20 ml 10 % Glycerin/H₂O lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 2-3 ml 10 % Glycerin/H₂O lösen
- Suspension in 40 μ l Aliquots aufteilen und in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei -70°C

Für die Transformation wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit 0,5-2 μ l der gewünschten Plasmid-DNA gemischt und in, auf Eis gekühlte, 0,2 cm Elektroporationsküvetten überführt. Die Küvette wurde in einen *Gene Pulser*TM(Biorad) gestellt und es wurde für 4-5 ms eine Feldstärke von 12,5 kV / cm angelegt (Geräteeinstellung: Kapazität 25 μ F; Spannung 2,5 kV; Widerstand 200 Ω). Anschließend wurde die Küvette schnell entnommen, 1 ml bei 37°C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für ca. 60 min bei 37°C belassen. Schließlich wurde ein geeignetes Volumen auf selektive Agarplatten (LB-Agarplatten mit 50 μ g Ampicillin / ml) ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

2.10.2 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Mengenbestimmung von DNA/RNA erfolgte bei dieser Arbeit normalerweise durch den Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Menge (1,6 kB-Bande der kB-Leiter von *Invitrogen*) im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel unter UV-Bestrahlung. Für eine genauere Quantitätsbestimmung der DNA wurde eine photometrische Quantifizierung vorgenommen. Dazu wurden geeignete Verdünnungen in Wasser hergestellt und deren Extinktionen bei $\lambda = 260$ nm gemessen.

Für eine Schichtdicke von 1 cm gilt hier:

doppelsträngige DNA 1 OD = 33 μ g/ml einzelsträngige DNA

RNA 1 OD = 50 μ g/ml

Zur Überprüfung der Sauberkeit wurde auch die Extinktion bei $\lambda = 280$ nm gemessen und ein Quotient gebildet.

Hier gilt für DNA bzw. RNA guter Reinheit: OD 260 nm / 280 nm = 1,8-2.

2.10.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) in 0.8-1.5% TAE-Agarosegelen bei einer Feldstärke von ca.10V/cm aufgetrennt. Pro 100ml Gelvolumen wurden 0.5ml einer Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) zugegeben. Mit einem UV-Transluminator ($\lambda=312\text{nm}$) konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht, über Videokamera und das *Bioprint DS-System* (Froebel Labor-Technik, Software *Amibios* von American Megatrends) fotografiert und das Bild über einen *Mitsubishi Video Copy Processor* Thermodrucker ausgegeben werden. Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte über Vergleich der Laufstrecken mit Fragmenten bekannter Länge (1 kb-Leiter von *Invitrogen*).

2.10.4 Modifikation von Nukleinsäuren

2.10.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Analytische Restriktionsverdau zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurden in Endvolumina von $20\mu\text{l}$ durchgeführt, präparative Totalverdau in Endvolumina von $50\text{-}200\mu\text{l}$. Die Inkubation erfolgte für 1-2 Stunden bei für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur- und Pufferbedingungen (beides laut Herstellerangaben).

2.10.6 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Während die meisten Klonierungsschritte über kohäsive Enden ("sticky ends") erfolgten, war es manchmal notwendig, die Enden von zu ligierenden DNA-Fragmenten durch eine Auffüllreaktion kompatibel zu machen ("blunt ends"). Hierzu wurde das "Klenow-Fragment" der Polymerase I aus *E.coli* verwendet, welches die Fähigkeit besitzt, die komplementären Nukleosidtriphosphate (dNTPs) an 5'-überhängenden Enden einzufügen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von $30\mu\text{l}$ unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- $1\mu\text{g}$ DNA
- $0,5\text{ mM}$ dNTPs
- 1 x Klenow-Puffer
- 1 U Klenow-Enzym
- Inkubation: 30' auf Eis. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.

2.10.7 Dephosphorylierung von Vektorenden

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektorenden zur Vermeidung von Religation erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). 1 U Enzym wurde dem Restriktionsansatz direkt zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase 15 min bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.

2.10.8 Elution von DNA-Fragmenten

Die Elution definierter DNA-Fragmente aus Agarosegelstücken erfolgte mit Hilfe des *Easy Pure DNA-Purification Kit* der Fa. *Biozym* unter den dort aufgeführten Vorgaben. Es wurden ca. 1-3 µg zu eluierendes Fragment eingesetzt.

2.10.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten durch das Enzym T4-DNA-Ligase (*Invitrogen*). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl durchgeführt. Es wurden 100-200 ng geschnittene und mit CIP behandelte Vektoren eingesetzt. Die zu klonierenden Restriktionsfragmente wurden in einem dreifachen molaren (sticky ends) bzw. zehnfachen molaren (blunt ends) Überschuß hinzugegeben. Die Reaktionen wurden bei 16°C ü.N. unter den empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt. Bei "blunt end"-Ligationen wurden, anstelle der sonst üblichen 1 U Ligase, 2-3 U des Enzyms eingesetzt.

2.10.10 Ligation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *pGEM®-T Easy Vector System* der Firma *Promega* in den Vektor *pGEM®-T Easy* kloniert. Die Herstellerangaben wurden befolgt.

2.10.11 Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab ("Mini-Präp")

Zur schnellen analytischen Charakterisierung von Plasmiden in transformierten Bakterien wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Animpfen einer einzelnen Bakterienkolonie von Platte in ca. 2 ml LB / Amp-Medium
Inkubation in einem Roller bei 37°C ü.N.
- Bakterienkultur bei 5000 rpm für 5' in Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 100 µl P1-Puffer lösen
- + 200 µl P2-Lösung, schütteln und 5' bei RT stehen lassen (alkalische Lyse)
- +150 µl P3-Lösung, schütteln und 5' bei RT stehen lassen (Neutralisation)

- \odot 30', 14000 rpm
- Überstand in neues Gefäß überführen, Pellet verwerfen
- Fällern der DNA durch Zugabe von 1 ml 100% Ethanol
- \odot 27', 14000 rpm, Überstand verwerfen
- Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol waschen und unter Tischlampe trocknen
- Pellet in 30 -50 μ l H₂O lösen

2.10.12 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Bei Plasmidpräparationen für Ausbeuten von ca. 100 μ g DNA wurden die Bakterien in einer Abwandlung der von Birnboim and Doly (1979) entwickelten alkalischen Lyse-Methode aufgeschlossen und die DNA auf Ionenaustauschsäulen der Firma *Genomed* (*Jet Star 2.0, Plasmid Midi Prep Kit*) aufgereinigt. Eine von einer Einzelkolonie angeimpfte über Nacht-Kultur von Bakterien in einem Volumen von 50 ml LB mit 50 μ g/ml Ampicillin diente als Ausgangsmaterial. Es wurde nach den von den Herstellern empfohlenen Protokollen vorgegangen.

2.10.13 Phenol-Chloroform-Extraktion

50 μ l als kleinste Menge, ggf. mit H₂O auffüllen

- 50 μ l Phenol zugeben, vortexen
- \odot 1', 14.000 rpm
- obere Phase abnehmen und in neues Eppendorfgefäß überführen
- 25 μ l Phenol + 25 μ l Chloroform zugeben, vortexen
- \odot 1', 14.000 rpm
- obere Phase abnehmen und in neues Eppendorfgefäß überführen
- 50 μ l Chloroform zugeben, vortexen
- \odot 1', 14.000 rpm
- obere Phase abnehmen und in neues Eppendorfgefäß überführen
- 125 μ l Ethanol + 5 μ l 3 M Na-Acetat zugeben, vortexen
- \odot 30' , 14.000 rpm
- Flüssigkeit absaugen, Pellet mit 70% Ethanol waschen, Alkohol absaugen und Pellet trocknen
- DNA in geeignetem Volumen H₂O aufnehmen

2.10.14 Extraktion von total-RNA mit *Trizol*TM

- Pro Reaktion ca. 1 mg Zebrafisch-Embryonen (mit Chorion) verwenden
- Homogenisierung in 1 ml *Trizol*TM(*Invitrogen*)
- ∅ 10', 12.000g, 4°C
- ÜS in neues Eppi, 5' bei RT inkubieren
- 200 µl Chloroform je 1 mL *Trizol*TMzugeben
- 15'' sehr gut schütteln, Inkubation 3' bei RT
- ∅ 15', 12.000g, 4°C
- ÜS in neues Eppi
- 500 µl Isopropanol je 1 mL *Trizol*TMzugeben, Inkubation 10' bei RT
- ∅ 10', 12.000g, 4°C
- Waschen mit 75% EtOH in DEPC-H₂O, vortexen
- ∅ 5', 7500g, 4°C
- Trocknen, in 100 µl DEPC-H₂O lösen

2.10.15 *In vitro* mRNA-Synthese zu Injektionszwecken

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *SP6-RNA-Polymerase Message Kit* der Firma *Ambion* verwendet. Pro Reaktion wurde 1µg linearisierte DNA eingesetzt und die Reaktion gemäss den Herstellerangaben durchgeführt. Alle Konstrukte befanden sich im Expressionsvektor pCS2+(Turner and Weintraub (1994)).

Verwendete Konstrukte: pCS2+*shh*, pCS2+*twhh*, pCS2+*nk6.1* (alle selbst hergestellt). Alle Vektoren wurden vor der Transkriptionsreaktion mit NotI linearisiert.

2.11 Morpholinos

Alle Morpholinos (MO) wurden bei der Firma *Gene Tools, LLC, Philomath, Oregon, USA* (<http://www.gene-tools.com>) bestellt. Dabei wurde die Möglichkeit genutzt, die Zielsequenz des MO von der Firma selbst bestimmen zu lassen. Hierzu wurde ein Teil der jeweiligen cDNA-Sequenz (ca. 75 bp oberhalb und ca. 25 bp 3' des Translationsstarts) angegeben (s. auch Kap. 2.6.1).

2.11.1 Sequenzierungen

Sequenzierungen erfolgten unter Verwendung des *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer). In Anlehnung an die Vorgaben des Herstellers wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Reaktionsansatz (auf Eis):

- 8 μl Reaction Mix
- 1,5 - 2,5 μl doppelsträngige DNA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 3,2 pM Primer auf 20 μl mit H₂O auffüllen

PCR: Nach Zugabe von Paraffin wurden 25 Zyklen mit folgender Einstellung durchlaufen:

- 30'' bei 96°C
- 15'' bei 50°C
- 4' bei 60°C

Nach Durchlaufen der PCR wurden die Proben in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in dem 50 μl 95% Ethanol sowie 2 μl 3 M Na-Acetat pH 4,6 vorgelegt wurden. Die weitere Behandlung der Proben geschah wie folgt:

- vortexen
- 10' auf Eis
- \odot 15 - 30', 14.000 rpm
- Ethanol absaugen und Pellet mit 250 μl 70% Ethanol waschen
- Pellet trocknen
- aufnehmen in 5 μl Formamid + 1 μl 50 mM EDTA
- 2-3' bei 90°C denaturieren und auf Eis abkühlen

Die Auftrennung der in der Sequenzreaktion erzeugten Fragmente geschah in einer denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese in einem 0,2mm dicken Gel aus:

- 6% Acrylamid/N, N'-Methylenbisacrylamid, 19:1
- 42 % Harnstoff
- 1x TBE
- Laufpuffer: 1x TBE
- Leistung 95 W; Elektrophoresekammer S2 von Gibco/BRL

Nach dem Lauf wurde das Gel in einer Lösung aus 10 % Essigsäure/ 10 % Methanol für 20' fixiert, dann gewässert und schließlich bei 80°C für 1 h getrocknet.

2.12 Sichtung transgener Fische

Transgene Individuen jedes Stamms wurden nach Gewinnung genomischer DNA aus den Schwanzflossen der einzelnen Adulttiere mittels Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) identifiziert. Es handelt sich dabei um eine Methode zur gezielten Amplifikation geringer Mengen spezifischer DNA-Fragmente um einen Faktor von 10⁵-10⁹ (Mullis (1990)). Der Nachweis des Transgens in der Schwanzflosse wurde auch in den folgenden Generationen für jedes Einzeltier in der beschriebenen Weise erneut durchgeführt. In aller Regel wurde ein Transgen nicht über mehrere Generationen in Homozygose gehalten, sondern Träger der Insertion wurden immer wieder gegen Wildtyppartner gekreuzt, da sich Inzuchtlinien als weniger robust im Vergleich zu heterogenen Fischen erwiesen haben (Cyrus Papan und Christoph König, persönliche Mitteilung; eigene Beobachtung).

2.12.1 Extraktion genomischer DNA aus F1-Embryonen und Schwanzflossen

F₁-Embryonen wurden für einen Tag in Embryowasser oder Zebrafischringer bei 29°C gehalten. Adulte Fische wurden für die Schwanzflossen-Amputation mit Mesab betäubt und die Schwanzflosse mit einer feinen Schere abgeschnitten. Die Fische wurden danach bis zur Auswertung des Ergebnisses in Einzelboxen gehalten. Nach einer Woche hatte sich die Schwanzflosse in aller Regel regeneriert und die Fische konnten gekreuzt werden. Die Extraktionen wurden nach einem Protokoll aus dem Zebrafischbuch durchgeführt:

- Überführen von bis zu 50 Embryonen bzw. einer abgeschnittenen Schwanzflosse in ein Eppendorf-Zentrifugenröhrchen und Absaugen der Flüssigkeit
- Waschen mit H₂O, Absaugen der Flüssigkeit

- Zugabe von 50 μl DNA-Extraktionspuffer/Proteinase K zur Schwanzflosse oder zu den Embryonen oder bei mehr als fünf Embryonen 10 μl pro Embryo
- Inkubation bei 50°C für mindestens 3 h unter gelegentlichem Vortexen
- Zugabe eines doppelten Volumens EtOH, mischen und 30' auf Eis stellen
- \odot 10', 13000 rpm, Überstand verwerfen
- Pellet mit 70 % EtOH waschen und für 2' zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet trocknen
- Pellet aus Schwanzflossen-Präparation in 40 μl TE lösen, Pellet genomischer DNA aus Embryonen in 20 μl TE oder in 4 μl pro Embryo bei mehr als fünf Embryonen lösen, Lagerung bei -20°C

Für die 25 μl PCR-Reaktionen wurden 5 μl genomischer DNA-Lösung eingesetzt.

2.12.2 PCR zur Identifikation transgener Zebrafische

Primer

Für die PCR-Analysen wurden Primer verwendet, die mit den Programmen *PRIMERS* für den *Apple Macintosh* und *prime* des *GCG Wisconsin Package* der Firma *Accelrys Inc.* (s.u.) nach folgenden Kriterien ausgewählt wurden:

- Der vom jeweiligen Primerpaar amplifizierte Bereich sollte nicht mehr als 1 kb betragen, um eine schnelle und effiziente Amplifikation zu ermöglichen.
- Die Anlagerungstemperatur TA ("annealing") sollte bei über 54°C liegen, damit eine hohe Spezifität gewährleistet ist.
- Störende Interaktionen der Primer mit sich selbst (Haarnadelschleifen, Dimerisierung) und mit dem anderen Primer sollten möglichst ausgeschlossen werden.
- Unspezifische Bindungen in der Zielsequenz sollten minimiert werden.

Folgende Primer wurden ausgewählt und von der Firma *Eurogentec* synthetisiert:

Name	Sequenz (5'->3')	Länge (bp)	TA (°C)	Lage des Primers
UASdir2	CCATCGCGTCTCAGCCTCACT	21	54,6	<i>UAS</i> (di)
shh-6	GCGCGTTATCTTGCCCTCGTAT	22	53,6	<i>shh</i> (re)
HSPDI	CGGGCATTACTTTATGTTGC	21	59,9	<i>hsp70</i> Promotor (di)
ZFARE2	GCCTTGATTCCACTTCTGG	19	58,7	<i>Gal4</i> (re)

di = direct primer; re = reverse primer

Für die spezifische Erkennung der injizierten Konstrukte wurden folgende Primer-Kombinationen ausgewählt:

Erkanntes Konstrukt	Primerkombination	TA (°C)	Länge des amplif. Bereiches (bp)
<i>UAS::shh</i>	UASdir2 + shh-6	56	ca. 500 bp
<i>UAS::shhloxP</i>	UASdir2 + shh-6	56	ca. 500 bp
<i>hsp70::Gal4</i>	HSPDI + ZFARE2	57	ca. 950 bp

PCR

Die PCR-Analysen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 μ l mit der *BioTherm*TM-Polymerase und dem mitgelieferten, optimierten Puffer der Firma *Genecraft*, Münster durchgeführt.

Folgende Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten wurden gewählt:

- 0,4 μ M je Primer
- 1x optimierter Puffer (enthält 1,5 mM MgCl₂)
- 5 μ l extrahierte genomische DNA
- 0,28 mM dNTPs
- 1 U Taq-Polymerase
- H₂O add 25 μ l

Die Reaktionen wurden in einem der Firma *TRIO-Thermoblock*TM der Firma *Biometra* durchgeführt. Dabei betrug die Denaturierungstemperatur 94°C, die Elongationstemperatur 72°C, während die "annealing"-Temperatur (TA) für das jeweilige Primerpaar spezifisch war.

PCR-Programm zur Identifizierung von transgenen Zebrafischen:

- Schritt 1: 94°C, 3'
- Schritt 2: 94°C, 1'

- Schritt 3: TA, 1'
- Schritt 4: 72°C, 1'
- Schleife: Schritte 2-4, 32x durchlaufen
- Schritt 5: 72°C, 7'
- Schritt 6: 4°C, Pause

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu gewährleisten und um unspezifische Reaktionen vor dem Erreichen des ersten Denaturierungsschrittes zu vermeiden, wurden die Reaktionen nach einem so genannten *hot start*-Protokoll durchgeführt (Innis et al. (1990)). Dabei wurden die einzelnen Komponenten den Ansätzen zu zwei unterschiedlichen Zeiten zugefügt. Bereits vor Beginn der anfänglichen Denaturierungsperiode waren in einem Volumen von 20 μ l die thermostabilen Komponenten (Primer, gen. DNA und Reaktionspuffer mit MgCl₂) enthalten ("hot mix"). Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet, um Evaporation während der gesamten PCR-Reaktion zu vermeiden. Die Nukleotide und die Polymerase wurden in einem Volumen von 5 μ l erst nach Erreichen der Denaturierungstemperatur hinzugefügt ("Taq mix").

2.13 Sequenzanalyse

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenzen wurden mit den Programmpaketen *GCG Wisconsin Package* der Firma *Accelrys Inc.*, San Diego, Kalifornien, USA (auf einem *Unix*-Server der Universität zu Köln, <http://gendb.rrz.uni-koeln.de>) und *Lasergene/DNA STAR-Biocomputing Software for the Macintosh* der Firma *DNASTAR Inc.*, Madison, Wisconsin, USA bearbeitet. Diese Programmpakete ermöglichen neben der Erstellung von Restriktionskarten und der Auswertung und Abstimmung von Sequenzdaten auch Sequenzvergleiche mehrerer, ausgewählter Sequenzen. Die im Anhang gezeigten alignments wurden mit dem Teilprogramm *pileup* des *GCG*-Pakets erstellt. Es wurde die *CLUSTAL*-Methode verwendet (residue weight: identity; gap penalty = 10; gap length penalty = 10). Bei der Bewertung konservativer Aminosäureaustausche wurden funktionelle Kriterien (sauer: D, E; basisch: H, R, K; hydrophob: A, F, I, L, M, P, V, W; polar: C, G, N, Q, S, T, Y) zugrunde gelegt. Homologiesuchen wurden nach dem *BLAST*-Algorithmus Altschul et al. (1990) online im Internet über den *BLAST Sequence Similarity Searching Service* des *National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Suchen nach *Expressed Sequence Tags (ESTs)* des Zebrafisch liefen über den Server der *Washington Universität*, St. Louis, Mississippi, USA (http://www.genetics.wustl.edu/fish_lab/frank/cgi-bin/fish).

2.14 Klonierung *nkx6.1*

2.14.1 PCR

Aus der Sequenz des ermittelten ESTs fd24e09.y1 (s. 3.2.1 und 5.1) wurden folgende primer zur Klonierung über PCR ausgewählt:

Name	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	T _A
EST_fw	TGAAAGGACGACGCTCTGTTGTAT	24	70°C
EST_rev	CTGTCGGTGAAGTGGAGGATGCT	23	72°C

PCR-Bedingungen:

- Schritt 1: 94°C, 3'
- Schritt 2: 94°C, 1'
- Schritt 3: 65°C, 1'
- Schritt 4: 72°C, 1'
- Schleife: Schritte 2-4, 28x durchlaufen
- Schritt 5: 72°C, 7'
- Schritt 6: 4°C, Pause
- Als Template-DNA dienten je 1 µl einer Zebrafisch cDNA-Bibliothek (aus 15-19 hpf Embryonen, Geschenk von Bruce Appel)

2.14.2 Schnelle Amplifikation von 3'-Enden (3'RACE)

Benutzte genspezifische Primer:

Name	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	T _A
nk6.1_GSP2	CTAAAAGAACAGAATGGATA	20	52°C

Zur Klonierung des 3'-Endes von *nkx6.1* wurde das *FirstChoice*TMRLM-RACE Kit der Firma *Ambion Inc.*, Austin, Texas, USA benutzt und die Vorgaben des Herstellers befolgt.

- total-RNA:
Zur Herstellung von total-RNA wurden 3 Reaktionen mit je 40 Embryonen im Alter von 24hpf angesetzt und die RNA nach der *Trizol*TM-Methode (s.2.10.14) extrahiert.
- RT-PCR:

- 1 μg total-RNA
- 4 μl dNTP-Mix
- 2 μl 3' RACE-Adapter
- 2 μl 10 x Puffer
- 1 μl RNase Inhibitor
- 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase
- ad 20 μl H₂O
- 1h bei 42°C inkubieren

Nested PCR:

- PCR I:

- 5 μl 10 x Puffer
- 4 μl dNTP-Mix
- 1 μl EST_fw (20 μM), s. 2.14.1
- 2 μl 3'RACE Outer Primer
- 36,75 μl H₂O
- 1 μl RT-Reaktion (s. 2.14.2)
- 0,25 μl *SuperTaqTMPlus* (Ambion)
- Schritt 1: 3' 94°C
- Schritt 2: 30'' 94°C
- Schritt 3: 30'' 60°C
- Schritt 4: 90'' 68°C
- Schleife Schritt 2 - Schritt 4, 35x
- Schritt 5: 7' 72°C

- * PCR II:

- * 1 μl aus PCR I (s.o.)
 - * 4 μl dNTP-Mix
 - * 5 μl 10x Puffer
 - * 1 μl nk6.1_GSP2 (10 μM)
 - * 2 μl 3'-RACE Inner Primer
 - * 36,75 μl H₂O
 - * 0,25 μl *SuperTaqTMPlus*
 - * Bedingungen wie in PCR I
 - * Ligation (s.2.10.10)

3 Ergebnisse

3.1 Markergene im Wildtyp

3.1.1 Neuronale Marker

Wie in Abschnitt 1.4.1 dargestellt, gibt es vor allem in Huhn und Maus gut charakterisierte Markergene für die einzelnen neuronalen Subtypen des ventralen Neuralrohrs, für Motorneurone und die verschiedenen Interneurone. Für die meisten dieser Marker sind im Zebrafisch Homologe kloniert worden. Allerdings ist nicht klar, ob die Abfolge der einzelnen neuronalen Domänen (V_3 , MN, V_2 , etc.) so auch im Zebrafisch vorhanden ist oder ob es diese Regionen in dieser Form überhaupt gibt. So wurde zunächst untersucht, welche Gene sich als neurale Markergene in dieser Arbeit nutzen lassen, um verschiedene neuronale Klassen ansprechen zu können.

Im Vergleich mit den bekannten Markern aus Maus und Huhn wurden folgende Gene untersucht:

Gen	beschrieben in	homolog zu:
<i>even-skipped homeobox 1 (evx1)</i>	Thaeron et al. (2000); Borday et al. (2001)	<i>evx1</i>
<i>engrailed 1b (eng1b)</i>	Hatta et al. (1991)	<i>en1</i>
<i>visual system homeobox 1 (vsx1)</i>	Passini et al. (1997, 1998)	<i>chx10</i>
<i>visual system homeobox 2 (vsx2)</i>	Barabino et al. (1997); Passini et al. (1997)	<i>chx10</i>
<i>islet 1 (isl1)</i>	Inoue et al. (1994)	<i>isl1</i>
<i>islet 2 (isl2)</i>	Tokumoto et al. (1995)	<i>isl1</i>
<i>oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (olg2)</i>	Park et al. (2002)	<i>olg2</i>
<i>SRY-box containing gene (sox10)</i>	Dutton et al. (2001b,a)	<i>sox10</i>

Tabelle 4: Verwendete Markergene

Alle genannten Gene sind postmitotische Marker und wurden – soweit noch nicht bekannt – über die Suche nach Sequenzhomologien zu den Genen in Maus und Huhn identifiziert und Proben zur RNA-Sonden-Herstellung in den u.g. Arbeitsgruppen erbeuten. Abbildung 3 zeigt die einzelnen Expressionsmuster.

evx1 markiert sehr dorsal liegende Neurone (Abb. 3a), die nach Lage und Größe wahrscheinlich Interneurone sind. Leider ist bei diesem Marker die stärkste Expression schon im Stadium von ca. 10 Somiten auszumachen, während ab ca. 14 Somiten kei-

ne Expression mehr nachzuweisen ist. Der Vergleich mit der Expression der anderen Marker bei 18-24 hpf ist daher schwieriger. Ventral dazu schließt sich die Expressionsdomäne der *engrailed1b*-positiven Zellen an (Abb. 3b). Während *vsx1* nur einige sehr wenige IN färbt (Abb. 3c), gibt es in der gleichen Region Gruppen von mehreren Zellen, die *vsx2* exprimieren (Abb. 3d). Doppelfärbungen an Embryonen ergaben außerdem, daß beide Gene nicht koexprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Für die Interneurone ergibt sich somit eine dorso-ventrale Abfolge der Expressionsdomänen von *evx1*, *eng1b* und *vsx1/vsx2*.

Als Marker für die verschiedenen Motorneurone wurden *isl1*, *isl2* und der Antikörper zn8 verwendet. Die primären MN im Zebrafisch liegen bei ca. 20 hpf als bilaterale, serielle Cluster von Zellen vor, bestehend aus mindestens drei, manchmal vier Neuronen pro spinalem Hemisegment (Eisen et al. (1986, 1990)). Die einzelnen Neuronen können anhand ihrer stereotypen Lage innerhalb des Clusters identifiziert und exprimieren verschiedene Kombinationen der o.g. Gene (Appel et al. (1995); Beattie et al. (1997)). Alle pMN können daher durch die beiden verschiedenen Sonden erfaßt werden. Allerdings ist zu beachten, daß ab ca. 22 hpf *isl1*-Expression auch in einigen sMN einsetzt (Appel et al. (1995)).

Sekundäre Motorneurone und ihre Axone können durch den zn8-Antikörper nachgewiesen werden (Fashena and Westerfield (1999), s. 2.9.10). Die Datenbanksuche ergab auch zwei Zebrafisch-Homologe für den V₃-Marker *sim1* (Serluca and Fishman (2001); Wen et al. (2002)), beide sind jedoch nicht im Neuralrohr des Zebrafisches exprimiert, so daß nicht untersucht werden konnte, ob diese Region und die darin enthaltenen Interneurone im Zebrafisch analog zu Maus und Huhn existiert.

Abbildung 3e, f und Abb. 4a zeigt die einzelnen Expressionsmuster von *isl1*, *isl2* und zn8 im Wildtyp, in Abb.3e und f sind dabei zur Verdeutlichung einige Motorneurone jeweils durch Pfeile markiert.

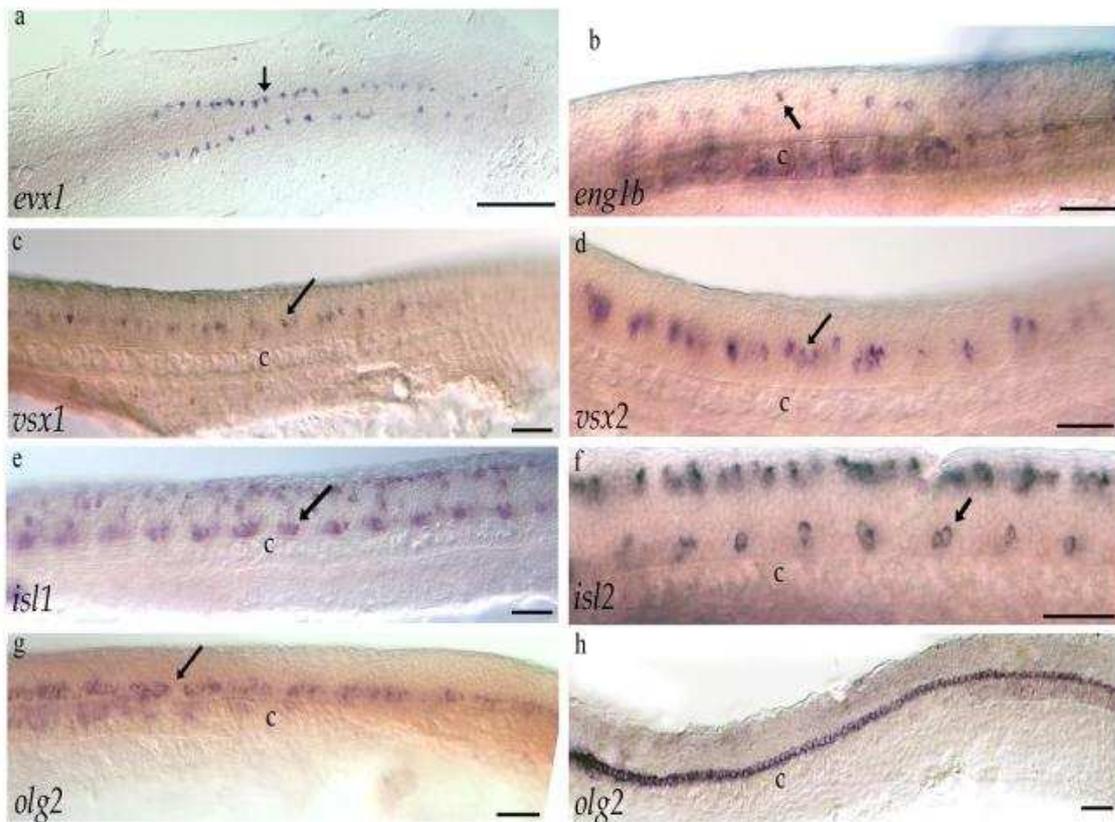


Abbildung 3: Wildtypisches Expressionsmuster verschiedener neuronaler Marker. (a) 10 Somiten, Flachpräparat in Dorsalansicht, anterior ist links. (b-g) 22 h nach Befruchtung, (h) 24 h nach Befruchtung. (b-h) sind Lateralansichten, rostral ist jeweils links, dorsal ist oben. Pfeile in (a-d) markieren jeweils ein oder mehrere Interneurone, in (e+f) Gruppen von Motorneuronen und in (g) Gruppen von *olg2*-positiven Zellen. c, Chorda. Maßstabsbalken in (a) 50 μm , in (b-h) 100 μm .

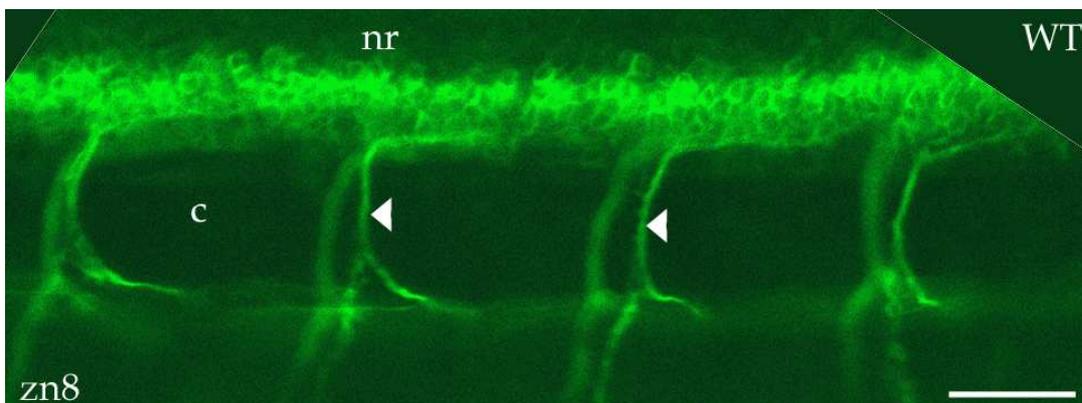


Abbildung 4: Der Antikörper zn8 markiert Zellkörper und Axone (Pfeilköpfe) von sMN. Lateralansicht, 48 hpf, anterior ist links, dorsal ist oben. c, Chorda; nr, Neuralrohr. Maßstabsbalken = 50 μm .

3.1.2 Marker für Oligodendrozyten-Vorläufer

Als Marker für Oligodendrozyten-Vorläufer (OLP) im Zebrafisch wurden zunächst Antikörper getestet, die vor allem im Huhn gute Ergebnisse zeigten: Der Antikörper O4 markiert verschiedene OLPs im Neuralrohr des Huhns (Sommer and Schachner (1981); Bansal et al. (1989); Bansal and Pfeiffer (1992); Ono et al. (1995, 1997)). Der Antikörper AA3 ist gegen das Protein PLP/DM-20 gerichtet ist, einem Hauptbestandteil des Myelins im ZNS höherer Wirbeltiere (Carnow et al. (1984); Griffiths et al. (1998); Yamamura et al. (1991)) und markiert eine Subpopulation aus den O4⁺-Zellen (Spassky et al. (1998)). Beide Antikörper zeigten jedoch trotz intensiver Versuche keine Färbungen (Daten nicht gezeigt). Auch die Verwendung zweier Subklone von mutmaßlichen Homologen der Gene *plp/dm-20* und *pdgfra*, die über Datenbanksuche als ESTs identifiziert und dann mit geeigneten Primern aus einer cDNA-Bank kloniert wurden, zeigten keine Färbungen im Neuralrohr. Daraufhin wurden verschiedene Markergene getestet: Für *olig2* konnte gezeigt werden, daß es im Zebrafisch sowohl pMN als auch OLPs markiert (Park et al. (2002)); *sox10* wird ebenfalls in OLPs exprimiert, unter anderem auch in *olig2*-positiven Zellen (Dutton et al. (2001b); Park et al. (2002)). Abb. 16 zeigt die Expressionsmuster von *olig2* (a) und *sox10* (b) bei 24 hpf, bzw. 36 hpf.

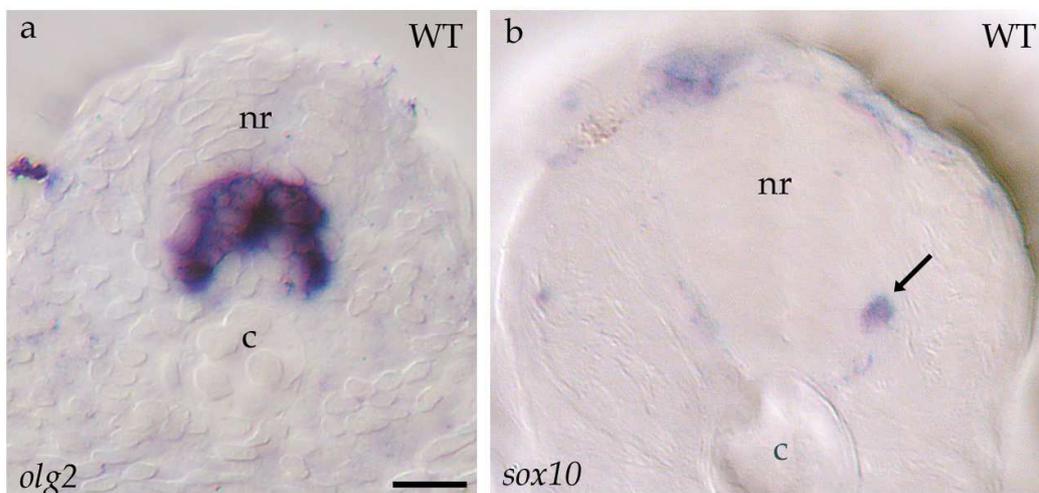


Abbildung 5: Wildtypische Expression in OLP durch *olig2* und *sox10*. Transversalschnitte, dorsal ist oben. (a) *olig2*, 22 h nach Befruchtung. Gut zu sehen ist die Expression in einer Region oberhalb der Bodenplatte. (b) *sox10*, 36 h nach Befruchtung. c, Chorda; nr, Neuralrohr. Maßstabsbalken = 50 µm.

3.2 Klonierung und Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors *nkx6.1* im Zebrafisch

3.2.1 Klonierung

In Huhn und Maus markiert der Homöobox-Transkriptionsfaktor Nkx6.1 die Region, in der die Motorneurone und die V₂-Interneurone entstehen (s. Kap. 3.1.1). Um festzustellen, ob es im Zebrafisch einen vergleichbaren Marker für die Region der Motorneurone gibt, wurde versucht, ein entsprechendes Homolog im Zebrafisch zu klonieren. Durch Sequenzvergleiche von bekannten *nkx6.1*-Genen mit der EST-Datenbank der Universität von Washington (s. 2.13), konnte ein entsprechender EST mit ca. 500 bp gefunden werden (fd24e09.y1, s. Anhang 5.1). Dieser EST enthielt den Translationsstart, sowie einen größeren Bereich des 5'-gelegenen, nicht kodierenden Bereiches (5'-UTR). Nach dieser Sequenz wurden Primer konzipiert, mit denen ein Teil (ca. 450 bp) dieses ESTs dann mittels PCR aus einer cDNA-Bibliothek des Zebrafisches kloniert wurde (s.2.14).

Zur Klonierung des fehlenden 3'-Endes wurde die Methode der schnellen Amplifikation von 3'-Enden (3'RACE) eingesetzt (s. 2.14.2). Tatsächlich konnte mit dieser Methode das fehlende Reststück kloniert werden, so daß am Ende ein ca. 1,4 kb großer Klon zu Verfügung stand, der die gesamte kodierende Region von *nkx6.1* des Zebrafisches enthielt (Anhang 5.2).

Die aus einem Leseraster des Klon ermittelte Proteinsequenz (s. Anhang 5.3) zeigte starke Übereinstimmung mit den bekannten Proteinen aus Mensch, Maus, Ratte und Goldhamster (Anhang 5.4). Die durchschnittliche Ähnlichkeit betrug dabei 59%. Auffällig ist allerdings der starke Sequenzunterschied zwischen Regionen starker Übereinstimmung am Amino-terminalen Ende und der (in 5.3 grün markierten) Homöodomäne und Regionen mit deutlich schwächerer Ähnlichkeit in der Mitte des Proteins. Die Homöodomäne selbst ist allerdings stark konserviert (82%), wie Vergleiche der bekannten Nkx6.1- Proteine zeigten.

3.2.2 Expression im Wildtyp

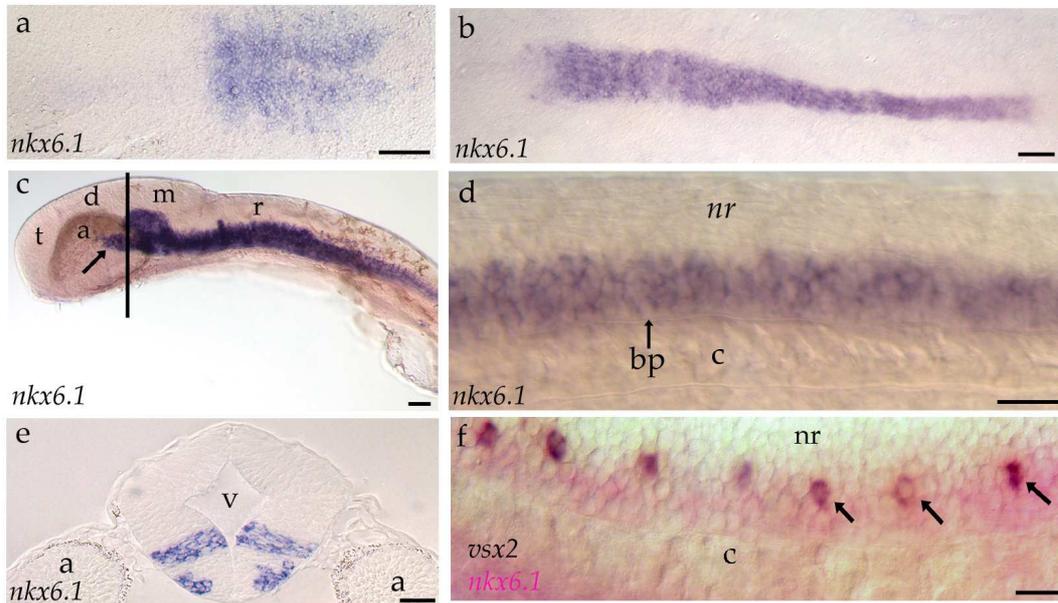


Abbildung 6: Wildtypisches Expressionsmuster von *nkx6.1*

(a) 85% Epibolie, (b) 6 Somiten, Flachpräparate, anterior ist links. (c-d, f) Lateralansichten, rostral ist links. (c) 26 h nach Befruchtung. Der Pfeil markiert die – wahrscheinlich diencephalische (s. Text) – Domäne, der Balken zeigt die Ebene des Transversalschnittes in (e) an. (d) Expression von *nkx6.1* im Neuralrohr bei ca. 22h nach Befruchtung. (e) Transversalschnitt durch Embryo in (c). (f) Doppel-*in situ*-Färbung an 22hpf altem Embryo. Die Pfeile markieren einige *vsx2*-positive Interneurone (in Blau) innerhalb der Expressionsdomäne von *nkx6.1* (in rot). a, Auge; bp, Bodenplatte; c, Chorda; d, Diencephalon; m, Mesenzephalon; nr, Neuralrohr; r, Rhombenzephalon; t, Telenzephalon; v, Ventrikel. Maßstabsbalken 100 μm in (a, b, c, e) und 50 μm in (d, f).

Die Expression von *nkx6.1* beginnt bei ca. 75 % Epibolie im dorso-medialen Neuroektoderm. Vergleiche mit der Expression von *shh*, die bei ca. 70% Epibolie im axialen Mesoderm beginnt zeigen, daß *nkx6.1* dorso-lateral von *shh* exprimiert wird. Abbildung 6a zeigt das Expressionsmuster bei 85% Epibolie. Die mediale Expression von *nkx6.1* in der Neuralplatte führt durch die Konvergenzbewegungen während der Neurulation zu einer ventralen Expression im Neuralkiel (Abb. 6b) und später im Neuralrohr. Bei 22h nach der Befruchtung nimmt die Expressionsdomäne einen großen Teil des ventralen Neuralrohrs ein, wobei die Bodenplatte ausgespart bleibt (Abb. 6d und Abb. 7c). Im ZNS zeigt sich eine starke Expression im ventralen Mittelhirn (Tegmentum), sowie im ventralen Rhombenzephalon (s. Abb. 6c). Nicht eindeutig zu bestimmen, war die Lage des rostralsten Teils der Expression im ZNS (Pfeil in Abb. 6c). Wahrscheinlich ist diese Region Teil des Diencephalons. Der Vergleich mit der *shh*-Expression in diesem Stadium

– in Chorda und Bodenplatte im Neuralrohr, sowie in der Prächordalplatte im ZNS – zeigt, daß sich die *nkx6.1*-exprimierenden Regionen jeweils dorsal zur Expressionsdomäne von *shh* befinden (Abb. 7a+c).

Bei 22 hpf schliesst die Expressionsdomäne im Neuralrohr sowohl die Region der Motoneuron-Vorläuferzellen, als auch eine Region von ventralen Interneuronen mit ein, die durch das Gen *vsx2* markiert werden (s. Kapitel 3.1.1, sowie Abb. 3 e,f und 6f).

3.3 Wildtypisches Expressionsmuster verschiedener Homöobox-Gene im Zebrafisch

Um festzustellen, ob die Hedgehog-abhängige Musterbildung im Neuralrohr des Zebrafisches ebenfalls über spezielle Kombinationen von Homöodomän-Proteinen erfolgt, wurden zunächst die Expressionsmuster der bekannten *Danio rerio*-Homologe zu den Genen aus Huhn und Maus untersucht. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Zebrafisch-Homologe:

Gen	beschrieben in	homolog zu
<i>paired box gene 7a (pax7a)</i>	Seo et al. (1998)	<i>pax7</i>
<i>paired box gene 6a (pax6a)</i>	Krauss et al. (1991)	<i>pax6</i>
<i>developing brain homeobox 1a (dbx1a)</i>	Fjose et al. (1994)	<i>dbx1</i>
<i>developing brain homeobox 1b (dbx1b)</i>	Seo et al. (1999)	<i>dbx2</i>
<i>iroquois homeobox protein 3 (iro3)</i>	Tan et al. (1999)	<i>irx3</i>
<i>NK2 transcription related factor 2 (nkx2.2)</i>	Barth and Wilson (1995)	<i>nkx2.2</i>
<i>NK6 transcription related factor 1 (nkx6.1)</i>	diese Arbeit	<i>nkx6.1</i>

Tabelle 5: Untersuchte Homöobox-Transkriptionsfaktoren

Als Referenzstadium wurde ca. 17-22h nach Befruchtung gewählt, da in diesem Stadium die meisten der untersuchten Gene die stärkste Expression zeigen.

Deutlich zu sehen war die dorsal nach ventrale Abfolge der einzelnen Expressionsdomänen: *pax7a* ist in einem schmalen Streifen im dorsalen Neuralrohr exprimiert (Abb. 7h). Daran schliessen sich die Expressionsdomänen von *iro3* und *pax6a* an (Abb. 7f+g), wobei *pax6a* in ca. einem Drittel des Neuralrohr exprimiert wird, *iro3*-Signal ist hingegen in der Ventrikularzone im oberen Drittel des Neuralrohrs, sowie in lateralen Bereichen nachweisbar. Die Expressionsdomänen von *dbx1a* und *dbx1b* beschränken sich auf schmale Streifen im mittleren (Abb. 7d), bzw. dorsalen Neuralrohr (Abb. 7e).

Im Gegensatz dazu zeigen die beiden *nkx*-Gene eine deutlich ventrale Expression: *nkx2.2* wird nur in einem schmalen Bereich im äußerst ventralen Neuralrohr exprimiert,

direkt neben und oberhalb der Bodenplattenzellen (Abb. 7b). Verglichen mit der Expressionsdomäne des Motorneuronen-Markers *isl1* liegt diese deutlich ventraler. Die Expression von *nkx6.1* hingegen nimmt ca. ein Drittel des ventralen Neuralrohrs (Abb. 7c) ein und beinhaltet neben der MN-Region offenbar auch ein oder mehrere Regionen, in denen Interneurone entstehen (Abb. 6f). Abb. 8 zeigt eine schematische Übersicht der Expressionsdomänen der einzelnen Gene im Neuralrohr. Aufgrund von technischen Probleme bei der Durchführung von Doppelfärbungen und trotz intensiver Versuche zur Behebung des Problems, gelang es bisher nicht, Doppelfärbungen an Embryonen vorzunehmen, die die Lage der einzelnen Expressionsdomänen der untersuchten Transkriptionsfaktoren zueinander zeigen.

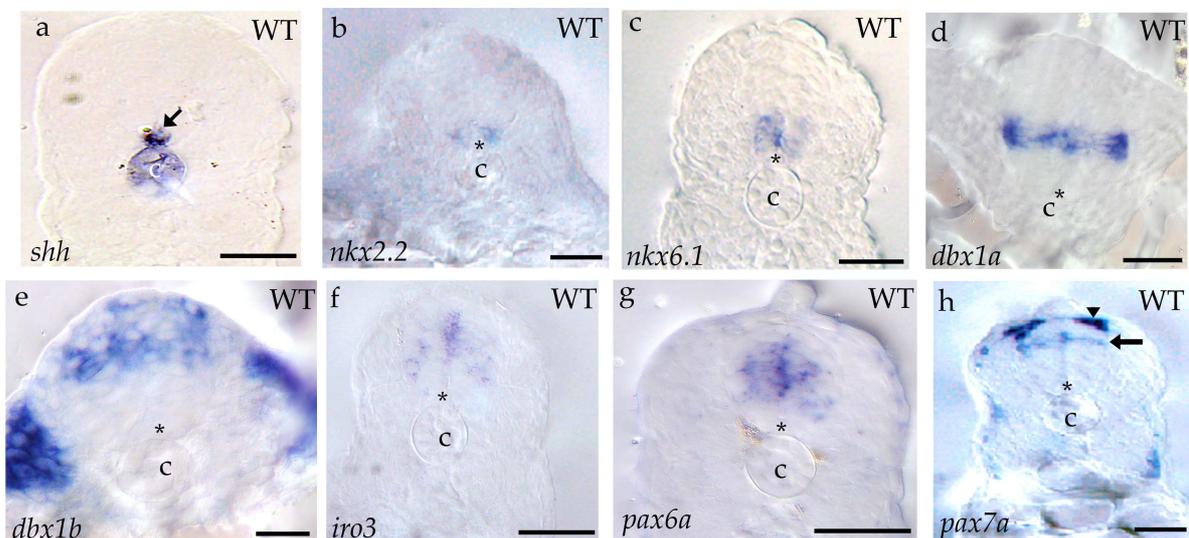


Abbildung 7: Expressionsmuster der getesteten Homöoboxgene im WT. Transversalschnitte durch das Neuralrohr in 18 Somiten (d, h, i, m), bzw. 22 hpf alten Embryonen (a-c, e-g, j-l, n-p). Das Sternchen markiert jeweils die Bodenplatte. c, Chorda. Maßstabsbalken = 50 μ m.

Die genaue Analyse der Schnitte der Einzelfärbungen läßt folgende Schlüsse als wahrscheinlich zu:

1. Die Expressionsdomänen von *iro3*, *pax6a* und *pax7a* überlappen (Abb. 7f-h).
2. Ob die Expressionsdomänen von *dbx1a* und *dbx1b* (Abb. 7d-e) überlappen, ist nicht genau festzustellen, beide überlappen aber mit den Domänen von *iro3* und *pax6a* (Abb. 7f+g).
3. Die Expressionsdomänen von *nkx2.2* und *pax6a* überlappen nicht (s. Abb. 7b+g).

4. Die Expressionsdomänen von *nkx6.1* und *pax6a* überlappen nicht (s. Abb. 7c+g).
5. Die Expressionsdomänen von *nkx6.1* und *irx3* überlappen nicht (Abb. 7c+f).
6. Die Expressionsdomäne von *nkx6.1* schließt die Domänen von *nkx2.2* und *olg2* ein (Abb. 7c,b und 5a).
7. Es gibt keine Zone, in der *nkx2.2* alleine exprimiert wird (Abb.).

Es muss allerdings betont werden, daß ohne gute Doppelfärbungen die genaue Analyse schwierig und teilweise eher spekulativ ist.

Abbildung 8 zeigt die o.g. Ergebnisse in einer schematischen Zeichnung:

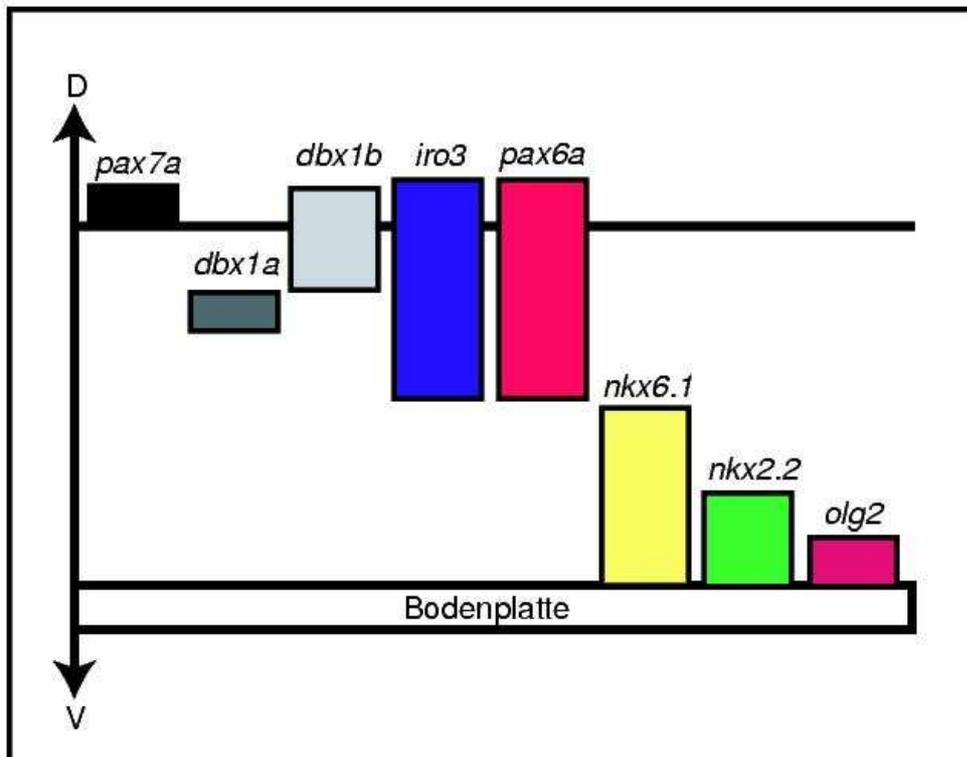


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Verteilung der Expressionen der getesteten Homöoboxgene im WT.

Nach der Analyse der Expressionsmuster der o.g. Marker und Transkriptionsfaktoren im Wildtyp, sollte getestet werden, ob und wie sich diese Expressionsmuster nach Überexpression von *sonic hedgehog* verändern würden.

3.4 Überexpression von *shh* im Neuralrohr des Zebrafisches mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems

3.4.1 Transaktivierbarkeit des *UAS:shh*-Effektorkonstruktes

Zur Überexpression von *shh* wurden die in unserem Labor von Nico Scheer etablierten Stämme *hsp70::Gal4* (mit den jeweils unterschiedlichen Insertionen 13 und 15), *UAS:shh* (Insertionen 8 und 36) und *UAS:shh-loxP* (Insertionen 17 und 29) verwendet (s. Scheer (2000) und Kapitel 1.8). Dabei zeigten Embryonen, die transgen für das Aktivator-konstrukt *hsp70::Gal4* waren, die beschriebene Expression von *Gal4* im gesamten Embryo (Scheer (2000)), die der endogenen Expression von *hsp70* im wesentlichen entspricht (Halloran et al. (2000)). Zur Überprüfung der Transaktivierbarkeit des Effektorgens *shh* in den zuvor noch nicht getesteten Stämmen (*UAS:ssh₈* und *UAS:shh-loxP_{17u.29}*) wurden die Nachkommen jeder Kreuzung ca. 4h nach dem Hitzeschock fixiert und whole-mount *in situ* Färbungen mit sowohl mit einer *Gal4*-, als auch mit einer *shh*-Probe vorgenommen. Abbildung 9a-f zeigt einige dieser Transaktivierbarkeitstests. Deutlich zu sehen ist, daß sowohl *Gal4* als auch *shh* über den gesamten Embryo hinweg verteilt exprimiert werden. Ebenfalls gut zu erkennen ist allerdings auch die unterschiedliche Expressionsstärke von *Gal4* (Abb. 9a-b) und die Stärke der Transaktivierung von *shh*, die auch zwischen Embryonen derselben Kreuzung stark schwanken konnten (Abb. 9d-f).



Abbildung 9: Transaktivierung von *shh* nach Hitzeschock in Nachkommen aus Kreuzungen zwischen *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor. Dargestellt sind Lateralansichten bei ca. 20 hpf, fixiert ca. 4h nach einem Hitzeschock von 30' bei 41°C. Anterior ist links, dorsal ist oben. (a-b) Aktivierung von *Gal4* nach Hitzeschock. (d-f) Transaktivierung von *shh* nach Hitzeschock. Deutlich zu sehen sind die unterschiedlichen Stärken der Transaktivierung im Vergleich zum Wildtyp (c). WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp. Maßstabsbalken = 100 µm.

Der Einfachheit halber werden in den folgenden Abschnitten transgene Tiere des *hsp70::Gal4*-Stamms als *hsp*-Aktivator und solche der *UAS:shh*-, sowie die *UAS:shh-loxP*-Stämme als *shh*-Effektor bezeichnet. Bei allen dargestellten Untersuchungen, bei denen Embryonen aus Kreuzungen zwischen Aktivator- und Effektorfischen verwendet wurden, wurden die wildtypisch aussehenden Embryonen als Wildtyp (WT) bezeichnet. Die Embryonen mit Effekten, die auf die Misexpression von *shh* zurückzuführen waren, werden nachfolgend als mutant bezeichnet.

Um sicher zu gehen, daß alle beobachteten phänotypischen Veränderungen tatsächlich auf die Misexpression von *shh* zurückzuführen waren, wurde bei der ersten Beobachtung dieser Veränderungen jeweils der Genotyp der wildtypischen, bzw. mutanten Embryonen mittels PCR bestimmt. Dabei konnten die Embryonen, in denen die beschriebenen Effekte auftraten, jeweils eindeutig als transgen sowohl für das Aktivator- als auch für das Effektorkonstrukt identifiziert werden.

3.4.2 Misexpression von *sonic hedgehog* führt zu starken Defekten bei der Entwicklung des somitischen Mesoderms und der Augen

Um die jeweils mutanten Embryonen in den Nachkommen einer Kreuzung aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor (typischerweise 1/4, da hauptsächlich mit heterozygoten Tieren gearbeitet wurde) sicher erkennen zu können, wurde der morphologische Phänotyp der Hitzeschock-induzierten *shh*-Misexpression in verschiedenen Stadien zunächst genauer untersucht.

Scheer (2000) konnte bereits zeigen, daß nach einem Hitzeschock bei 50% Epibolie eine Überexpression von *shh* zu einer Verkleinerung des Augenesikels und zu einer Störung, bzw. einem Verlust der Gehirnentrikel vor allem im Mesenzephalon führt. Außerdem vergrößerte sich in der Augenanlage dieser Embryonen der proximale (also dem optischen Trakt zugewandte Teil) auf Kosten des distalen Bereiches, was durch die Ausbreitung des proximalen Markers *pax2* klar gezeigt werden konnte (Scheer (2000)). Bei der Beobachtung durch ein Stereomikroskop ließ sich dieses phänotypische Merkmal oft sehr gut schon anhand der geringeren Größe der Augen und der oft fehlenden oder nur schlecht ausgebildeten Linse – die ja distales Schicksal repräsentiert – erkennen (Scheer (2000), eigene Beobachtungen). Diese Ergebnisse stimmten auch mit den beobachteten Effekten der ersten mRNA-Injektionen von *shh* überein (Ekker et al. (1995)).

Aufgrund der verschiedenen Stärken in der Transaktivierung (s. Kap. 3.4.1) des *shh*-Effektors oder weil der Hitzeschock später vorgenommen wurde, kam es aber manchmal zu weniger ausgeprägten phänotypischen Veränderungen in Gehirn und Auge. Es wurde deshalb noch nach weiteren Defekten in den mutanten Embryonen gesucht. Nach einem Hitzeschock bei ca. 60% Epibolie lassen sich in Embryonen mit *shh*-Misexpression gegen Ende der Somitogenese deutliche Veränderungen der myodermalen Strukturen des somitischen Mesoderms feststellen. In wildtypischen Embryonen dieses Alters sind die Myomere in der Lateralansicht gut zu erkennen durch ihr typisches Winkel- oder V-förmiges Aussehen (*chevron shape*; s. Abb. 10a). In den Mutanten konnte hingegen eine eher runde bis leicht gebogene Stabform beobachtet werden (Abb. 10b). Dabei sind die vertikalen Myosepten, die die einzelnen Myomere voneinander trennen weniger klar definiert als im Wildtyp. Da diese phänotypischen Merkmale in den Somiten auch für verschiedene Mutanten des Hh-Signalweges beschrieben wurde (van Eeden et al. (1996); Schauerte et al. (1998); Varga et al. (2001)), ist anzunehmen, daß der beobachtete Effekt tatsächlich auf die Misexpression von *shh* zurückzuführen ist. Diese phänotypischen Veränderungen in den Somiten traten allerdings nur dann ausschließlich in den Embryonen mit *shh*-Misexpression auf, wenn der Hitzeschock vor dem Beginn oder ca. im ersten Viertel der Somitogenese durchgeführt wurde. Bei späteren Hitzeschocks beein-

flussten offenbar diese selbst manchmal die Ausbildung der Somiten (siehe auch Roy et al. (1999)) und daher konnte dieser Phänotyp nicht als alleiniges Kriterium in allen Stadien zur Identifikation von mutanten Embryonen dienen.

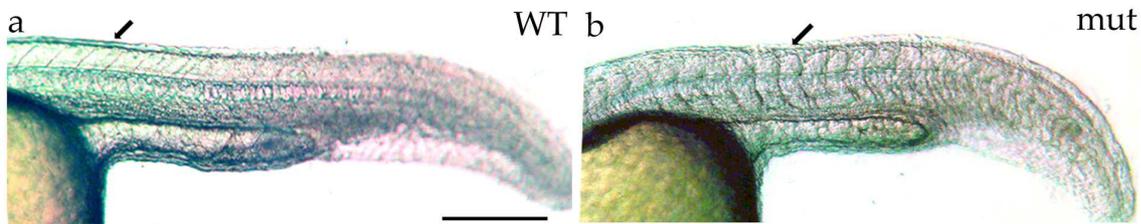


Abbildung 10: Misexpression von *shh* führt zu Störungen bei der Bildung der Myomere. Lateralansichten bei ca. 24 hpf, rostral ist links, anterior ist oben. HS: 30', 41°C, 60% Epibolie. Gut zu sehen ist der Unterschied zwischen den Myomeren im WT (a) und in den Mutanten (b; siehe Text). WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp. Maßstabsbalken = 250 μm .

Eine detailliertere Untersuchung des Augenphänotypus konnte diesen Effekt hingegen als gutes Erkennungsmerkmal für Mutanten vor allem für die älteren Entwicklungsstadien hindurch identifizieren. Nachkommen einer Kreuzung eines *hsp*-Aktivators und eines *shh*-Effektors, die im Stadium von 10 Somiten einem Hitzeschock unterzogen wurden, wiesen bei 48-50 Stunden nach Befruchtung bei oberflächlicher Betrachtung zunächst keine offensichtlichen Unterschiede im Phänotyp der Somiten oder Augen untereinander auf. Eine Färbung mit dem Antikörper zn-8, der die Axone der retinalen Ganglienzellen (RGZ) im Auge, sowie den Sehnerv (ON) markiert, zeigte jedoch einige deutliche Veränderungen des Auges in 1/4 der beobachteten Embryonen. Dabei war die Anzahl und Lage der RGZ im Auge der mutanten Embryonen im Vergleich zum Wildtyp deutlich gestört. In Lateralansicht lässt sich im Wildtyp die Schicht der Ganglienzellen als runde Scheibe unterhalb der Linse deutlich erkennen, ebenso wie die Bündelung der Axone im ON und dessen Austritt durch die Retina (Abb. 11a). Die mutanten Embryonen zeigten dagegen eine ungeordnete Anordnung der RGZ und Auffälligkeiten in der axonalen Bündelung (Abb. 11b).

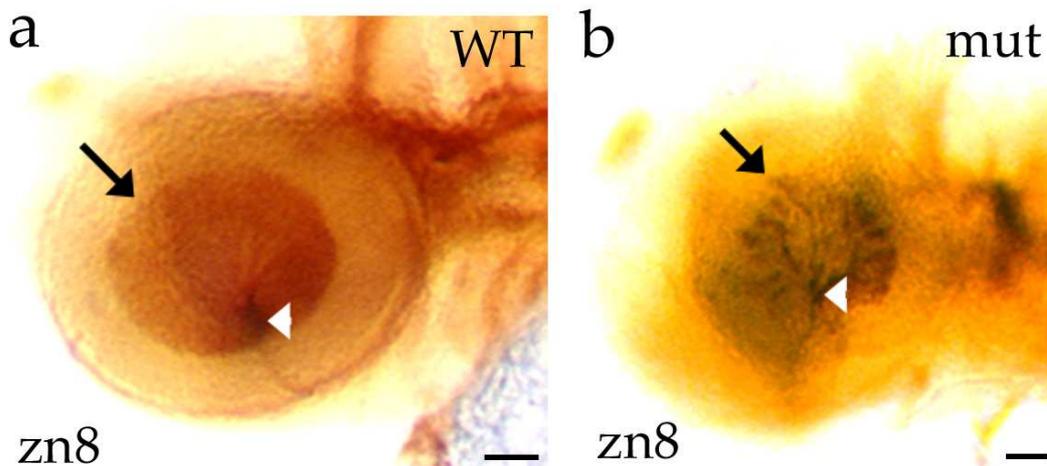


Abbildung 11: Transaktivierung von *shh* in Nachkommen aus Kreuzungen zwischen *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor führt zu phänotypischen Veränderungen in der Retina. Lateralansichten von *zn8*-gefärbten Retinalganglienzellen (RGZ) im WT (Pfeil in a) und in Mutanten (Pfeil in b). 48 hpf, rostral ist links, dorsal ist oben. Hitzeschock: 30', 41°C bei 10 Somiten. Die Pfeilköpfe zeigen die Austrittsstelle des ON aus der Retina. WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp. Maßstabsbalken = 50 µm.

Noch deutlicher wurde dieser Effekt bei der Betrachtung des Verlaufs des optischen Nerven in der Ventralansicht. Die kontralaterale Projektion des Nerven führt an der Basis des Diencephalons zur Bildung des optischen Chiasmas (Abb. 12a). In den mutanten Embryonen zeigte sich eine deutliche verminderte Stärke, bzw. in einigen Embryonen ein kompletter Verlust des Sehnervs (Abb. 12b+c).

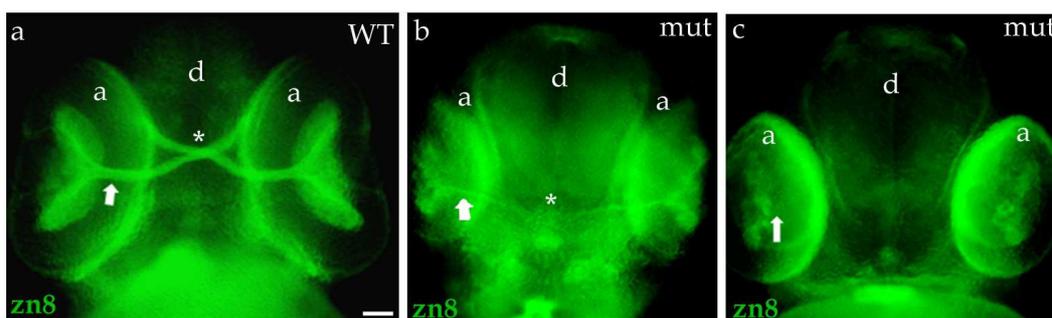


Abbildung 12: Bündelung und Projektion des ON sind gestört nach Misexpression von *shh*. Falschfarbendarstellungen von *zn8*-Färbungen im ON. Ventralansichten, 48 hpf, rostral ist oben. Hitzeschock (HS): 30', 41°C bei ca. 10 Somiten. Gut zu sehen ist die starke Reduktion, bzw. komplette Abwesenheit von ON (Pfeile in a-c) und Chiasma (Sternchen in a und b) in den Mutanten (b-c) ggü. dem WT (a). WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp. a, Auge; d, Diencephalon. Maßstabsbalken = 50 µm.

Damit einher gehen die Effekte auf die Expression des Markers *pax6a*, einem Marker für das distale Schicksal (Retina und Linse, (Krauss et al., 1993, Püschel 1992)). Die Überexpression von *shh* nach einem Hitzeschock bei ca.10 Somiten führt zu einem kompletten Verlust der Expression von *pax6a* im Augenprimordium (s. Abb. 13b) und damit dem Verlust des distalen Schicksals. Dieser Effekt auf die Expression von *pax6a* wurde für die Überexpression von *shh*-mRNA schon von Macdonald et al. (1995) beschrieben und konnte somit entsprechend bestätigt werden.

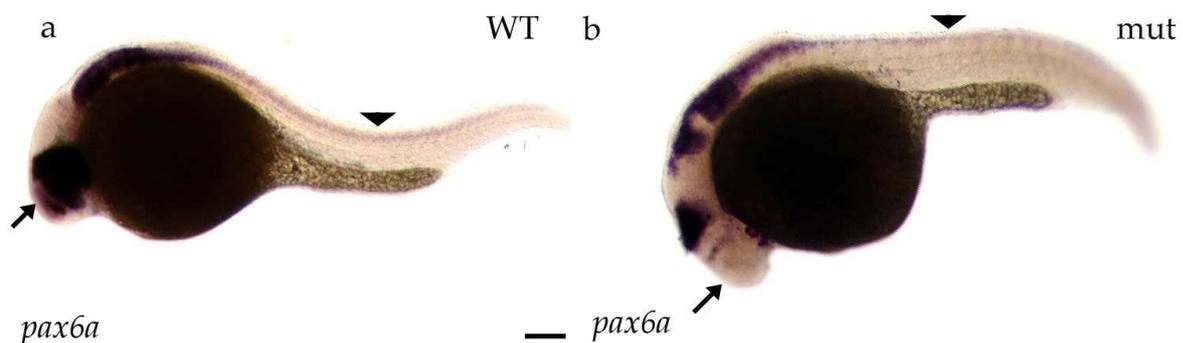


Abbildung 13: Misexpression von *shh* führt zum Verlust von *pax6a*-Expression in der Augenanlage. Lateralansichten, 24 hpf, dorsal ist oben, rostral ist vorne. Hitzeschock (HS): 30', 41°C bei ca. 10 Somiten. In den Mutanten ist die Expression von *pax6a* im Auge im Vergleich zum WT komplett unterdrückt (Pfeile in a und b). Deutlich wird außerdem die Reduktion von *pax6a* im Neuralrohr (Pfeilköpfe in a und b). WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp. Maßstabsbalken = 100 μ m.

3.4.3 Ektopische Expression von Shh führt zu deutlichen Veränderungen der Homöobox-Genexpression im Neuralrohr

Da die Kriterien zur Erkennung mutanter Embryonen nun genauer untersucht waren, konnten jetzt die Effekte von *shh*-Überexpression auf die Expression von Homöoboxgenen und neuronalen Markergenen analysiert werden.

Hitzeschocks an Embryonen aus einer Kreuzung aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor bei ca. 70% Epibolie führten bei 17-22h nach Befruchtung zu einer starken Verschiebung der Expressionsdomänen verschiedener Homöoboxgene. Die Misexpression von *shh* führte nicht nur zum kompletten Verlust der Augen-Expressionsdomäne des Markers *pax6a* (s. o.), sondern auch zu einer starken bis vollständigen Reduktion der Expression dieses Gens im Neuralrohr (Abb. 14o, s. auch Pfeilkopf in Abb. 13b). Der gleiche Effekt ließ sich auch für den Marker *pax7a* beobachten – auch hier verschwindet die dorsale Expressionsdomäne völlig (Pfeil in Abb. 14p). In Analogie zu dem von Jessell entwickelten Modell in Huhn und Maus (Kap. 1.4) ließ sich also eine Übereinstimmung darin feststellen, daß die Expression von *pax6a* und *pax7a* im Neuralrohr von *Danio rerio* von

größeren Mengen an Shh reprimiert werden kann, beide also auch im Zebrafisch zur Klasse I der HD-Proteine gehören. Für die Expression der Marker *dbx1a*, *dbx1b* und *iro3*, die im o.g. Modell ebenfalls zur Klasse I gehören, konnte hingegen keine Abhängigkeit von *shh* festgestellt werden (Abb. 14h, m und n).

Die Auswirkungen der Misexpression von *shh* auf die bekannten Zebrafisch-Homologe der Klasse II-Gene zeigten durchweg die erwarteten Resultate: In den mutanten Embryonen aus oben beschriebenen Kreuzungen war bei ca. 22 hpf die Expressionsdomäne von *nkx2.2* im Neuralrohr deutlich nach dorsal ausgeweitet (Abb. 14f). Gleiches galt ebenso für die Expression von *nkx6.1*, wobei die dorsale Extension dieser Expressionsdomäne noch stärker war (Abb. 14g; s. auch Kap. 3.6.1). Damit ist es wahrscheinlich, daß die Gene *nkx2.2*, *nkx6.1* sich im Neuralrohr des Zebrafisches wie die zugehörigen Homologe in Huhn und Maus konzentrationsabhängig von Shh verhalten und damit beide Gene auch in *Danio rerio* zu den Klasse II-Proteinen gehören.

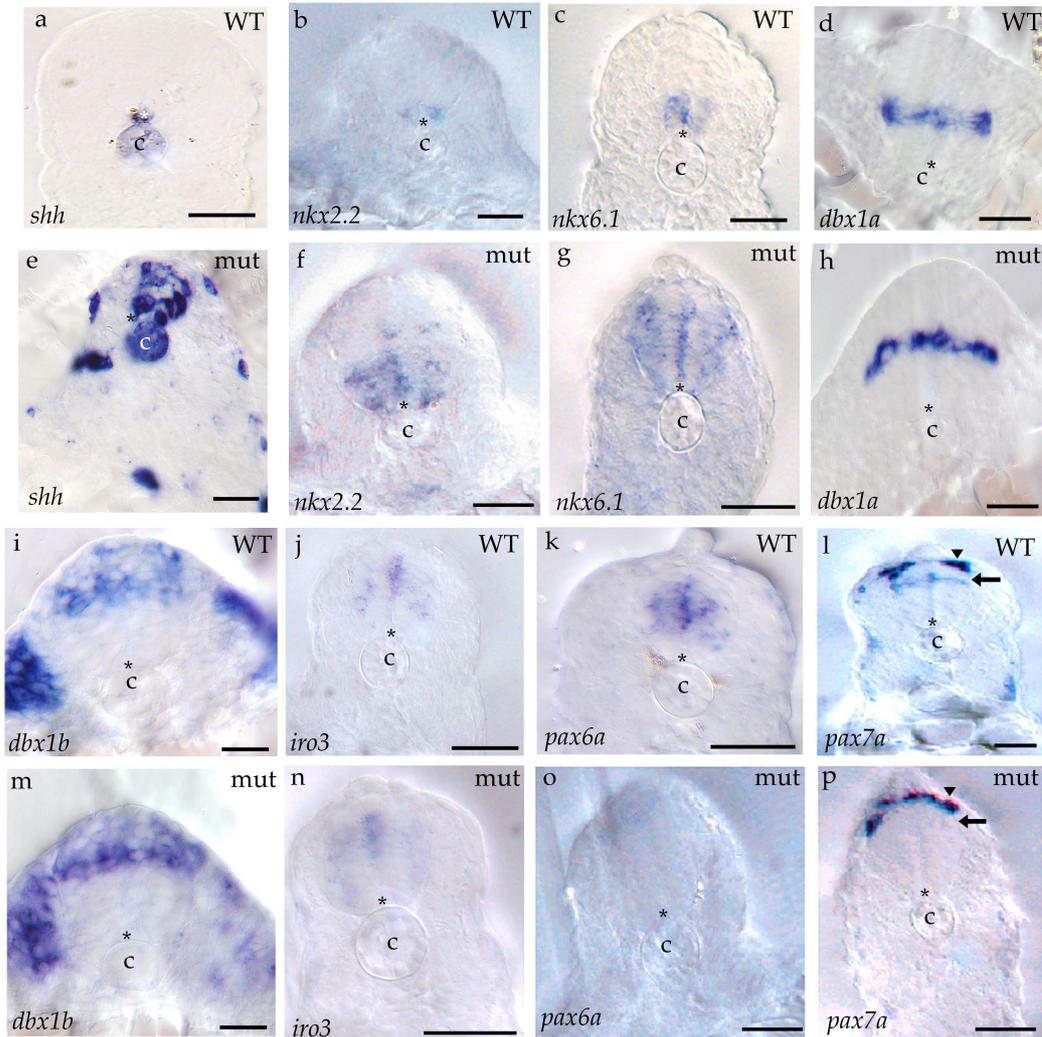


Abbildung 14: Expressionsmuster der getesteten Homöoboxgene in Hitzeschock-behandelten Embryonen einer Kreuzung aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor. Transversalschnitte durch das Neuralrohr in 18 Somiten (d, h, i, m), bzw. 22 hpf alten Embryonen (a-c, e-g, j-l, n-p). Das Sternchen markiert jeweils die Bodenplatte. c, Chorda. WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp nach Hitzeschock von 30', 41°C bei ca. 70% Epibolie. Maßstabsbalken = 50 μ m.

3.4.4 Misexpression von *shh* führt zu einer Zunahme von sekundären Motorneuronen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im ventralen Neuralrohr

Aufgrund der starken dorsalen Verschiebungen der verschiedenen Homöoboxgen-Expressionsdomänen war zu erwarten, daß auch die Analyse der verschiedenen neuronalen Marker eine deutliche Veränderung in deren Expressionsmuster zeigen würde. Interessanterweise war dies nicht generell der Fall. Für die Interneuronen-Marker *evx1*

(bei ca. 18 hpf) und *eng1b* (22 hpf) konnte keine Veränderung in Embryonen mit überexprimiertem *shh* festgestellt werden. Auch die Lokalisation der *pax2*-Expression (ein Marker für verschiedene IN) zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung (22 hpf; Daten nicht gezeigt), ebenso wie die Anzahl und Lage der *vsx2*-positiven Interneurone (Tab. 6). Dabei wurden die Nachkommen von Kreuzungen aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor entweder bei ca. 50-70% Epibolie oder bei ca. 10 Somiten einzelnen Hitzeschocks unterzogen oder zu beiden Zeitpunkten Hitzeschock-behandelt. Auch auf pMN, sMN und auf OLPs waren keine Effekte festzustellen, falls der Hitzeschock bei 50-70% Epibolie vorgenommen wurde. Dabei wurde die Anzahl und Lage der pMN bei ca. 3-5 Somiten für *isl1* und bei ca. 14 Somiten für *isl2* analysiert, die Verteilung der sMN bei 48 hpf durch den Antikörper zn8 und die Lage der OLP durch die Marker *sox10* (36-38 hpf) und *olg2* (22 hpf; Daten nicht gezeigt).

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die Konzentrationen an transaktiviertem Shh in den mutanten Embryonen evt. doch nicht ausreichend waren, wurde in Nachkommen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators und des *shh*-Effektors *shh*-mRNA im 1-2 Zellstadium injiziert (500 ng/ μ l) und wiederum bei 50-70% Epibolie ein Hitzeschock vorgenommen. Auch in diesen Embryonen konnte – trotz starker morphologischer Defekte – kein Effekt auf die Anzahl o.g. neuronalen Subtypen festgestellt werden. Zur Untersuchung der Frage, ob vielleicht kombinierte Überexpression von transaktiviertem *shh* und Überexpression von *twhh* (s. Kap. 1.3.4) zu Effekten auf die Anzahl von pMN, sMN oder OLPs führen könnten, wurde *twhh*-mRNA in Nachkommen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators und des *shh*-Effektors *shh*-mRNA im 1-2 Zellstadium injiziert (500 ng/ μ l). Danach wurden die injizierten Embryonen wieder bei 50-70% Epibolie einem Hitzeschock unterzogen. Dabei konnten ebenfalls keine Auswirkungen auf die Anzahl von pMN, sMN und OLPs im Neuralrohr festgestellt werden.

Eine andere Situation ergab sich, als zwei Hitzeschocks bei 50-70% Epibolie und bei ca. 10-14 Somiten durchgeführt wurden: Die Anzahl und Lage der *isl1/2*-positiven pMN veränderte sich zwar immer noch nicht, jedoch konnte eine deutliche Zunahme an OLPs und sMN festgestellt werden. Somit stellte sich der Zeitpunkt des Hitzeschocks als entscheidend für einen sichtbaren Effekt der *shh*-Überexpression heraus.

Ein bei 10-12 Somiten vorgenommener Hitzeschock führte zu einer leichten Verbreiterung der Domäne der zn8-markierten sekundären MN. Abbildung 15b zeigt diese in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15a).

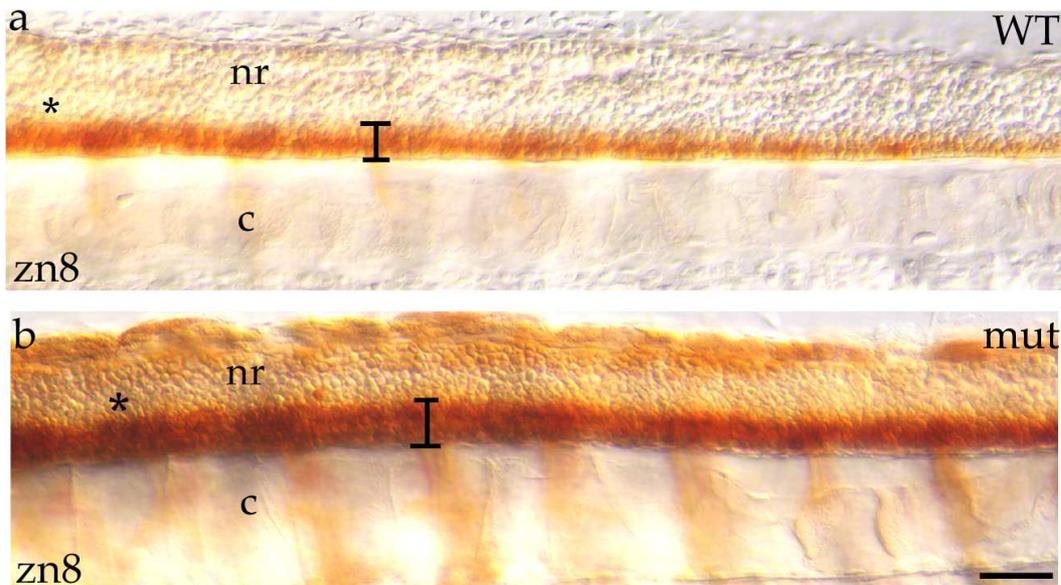


Abbildung 15: Zunahme von sMN in Embryonen nach Misexpression von *shh*. Lateralansichten von 48 hpf alten Embryonen, zn8-Antikörperfärbung. Rostral ist links, anterior ist oben. In mutanten Embryonen (b) ist die Region der sMN ggü. dem WT (a) deutlich verbreitert. Beide Embryonen sind Aufnahmen der gleichen optischen Schnittebene. Das Sternchen markiert das 16. Myomer von rostral aus gezählt. Hitzeschock von 30', 41°C bei ca. 10-12 Somiten. c, Chorda; nr, Neuralrohr. WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp. Maßstabsbalken = 50 μ m.

Wie beschrieben, hatte die Überexpression von *shh* durch einen einmaligen Hitzeschock bei 70 % Epibolie zunächst keine Auswirkungen auf die Expression von *olg2*, so daß die Nachkommen einer Kreuzung eines *hsp*-Aktivators und eines *shh*-Effektors einem Hitzeschock bei ca. 14 Somiten (ca. 16 hpf) unterzogen wurden. Diese Überexpression von *shh* führte dann bei 22 hpf zu einer starken dorsalen Expansion der *olg2*-Expressionsdomäne im Neuralrohr (Abb. 16b). Da *olg2* pMN und OLPs markiert (s. 3.1.2), die primären MN zum Zeitpunkt des Hitzeschocks aber schon postmitotisch sind (s. 1.2.2), ist es wahrscheinlich, daß die zusätzlichen *olg2*-positiven Zellen OLPs sind. Diese Annahme konnte bestätigt werden durch die Analyse des OLP-Markers *sox10*. Ein Hitzeschock bei ca. 16 Somiten führte in Embryonen 36 Stunden nach Befruchtung zu einer Zunahme an *sox10*-positiven Zellen im ventralen Neuralrohr (Abb. 16d).

Obwohl die Misexpression von *shh* nach einem frühen Hitzeschock bei 50-70% Epibolie also zu einer starken Veränderung der Expressionsdomänen verschiedener Homöoboxgene im Neuralrohr führte, hatte dies nicht die – wie die in Huhn und Maus erzielten Ergebnisse vermuten ließen – Veränderung von Anzahl und Lage neuronaler Subtypen im ventralen Neuralrohr zur Folge. Erst Überexpression von *sonic hedgehog* nach Hitze-

schocks zur Mitte der Somitogenese (10-16 Somiten) führten zu einem Effekt, allerdings auch nicht auf alle neuronalen Subtypen, sondern nur auf sekundäre Motoneurone und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.

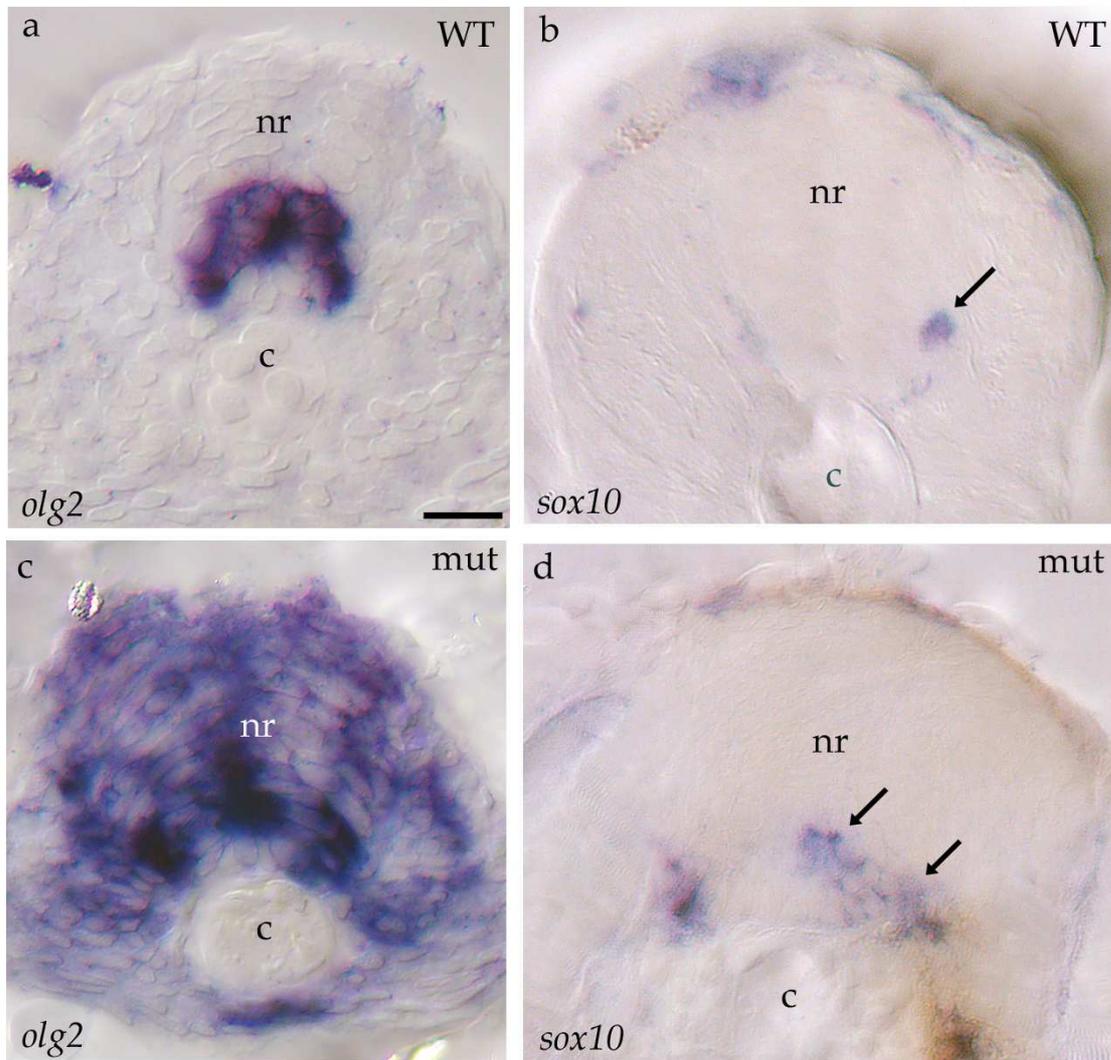


Abbildung 16: Effekte der Misexpression von *sonic hedgehog* auf OLPs. Transversalschnitte, dorsal ist oben. (a) Wildtypische Expression von *olg2* im Neuralrohr bei ca. 22 hpf. (b) Wildtypische Expression von *sox10* im Neuralrohr bei ca. 36 hpf (Pfeil). Überexpression von *shh* führt zu einer deutlichen ektopischen Expression von *olg2* (c) und zu einer vermehrten Anzahl von *sox10*-positiven Zellen im ventralen Neuralrohr (Pfeile in d). c, Chorda; nr, Neuralrohr. WT und mut bezeichnet den jeweiligen wildtypischen, bzw. mutanten Phänotyp nach Hitzeschock (s. Text) von Nachkommen aus Kreuzungen aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor. Maßstabsbalken = 50 μ m.

3.5 Verlust von HH-Signal

3.5.1 Ausfall des Hedgehog-Signalweges führt zum Verlust verschiedener neuraler Subtypen im ventralen Neuralrohr

Obwohl die Misexpression von Sonic Hedgehog zu einer deutlichen Veränderung in den Expressionsmustern der getesteten -Transkriptionsfaktoren führte (Kap. 3.4.3), waren die Auswirkungen auf die einzelnen neuralen Subtypen – gemessen an der starken Verschiebung der Expressionsdomänen der Homöoboxgene doch eher gering. Dabei war vor allem auffällig, daß Lage und Anzahl der verschiedenen Interneurone gar nicht beeinflusst werden konnte. Um zu überprüfen, ob diese Interneurone überhaupt abhängig von Hh-Signalen sind, wurde der komplette Hedgehog-Signalweg durch Inkubation der Embryonen in Cyclopamin (s. 1.3.3 und 2.8) bis zum Stadium der Färbung blockiert. Dabei konnte eine starke Reduktion der *vsx2*-positiven IN festgestellt werden (Tab.6). Gleiches gilt für die pMN und Oligodendrozytenvorläuferzellen, markiert durch *olg2* (Abb. 17b). Dabei konnten die von Lewis and Eisen (2001) und Park et al. (2002) beschriebenen Abhängigkeiten für *isl1* und *olg2* vom Hedgehog-Signalweg bestätigt werden.



Abbildung 17: Verlust von Hh-Signal führt zum vollständigen Verlust von *olg2*-positiven Zellen. Lateralansichten, rostral ist links, dorsal ist oben. Inkubation von Embryonen in Cyclopamin erfolgte wie in Kap. 2.8 beschrieben. Maßstabsbalken = 50 μm .

3.6 *nkx6.1* als downstream target von Shh

Wie bereits gezeigt, konnte die Anzahl sekundärer Motorneurone und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen durch gezielte Misexpression von *sonic hedgehog* verändert werden (Kap.3.4.4). Der Ausfall des HH-Signals führte hingegen zu einem kompletten Verlust dieser Zelltypen (3.5.1). Experimente in Maus und Huhn haben die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Nkx6.1 für die Spezifikation der Motorneurone in diesen Organismen gezeigt (1.5). Da es gelungen war, ein Zebrafisch-Ortholog von *nkx6.1* zu klonieren (Kap. 2.14) und dieses in der Region exprimiert wird, in der die MN liegen, sollte die Funktion dieses Faktors daher auch im Zebrafisch getestet werden.

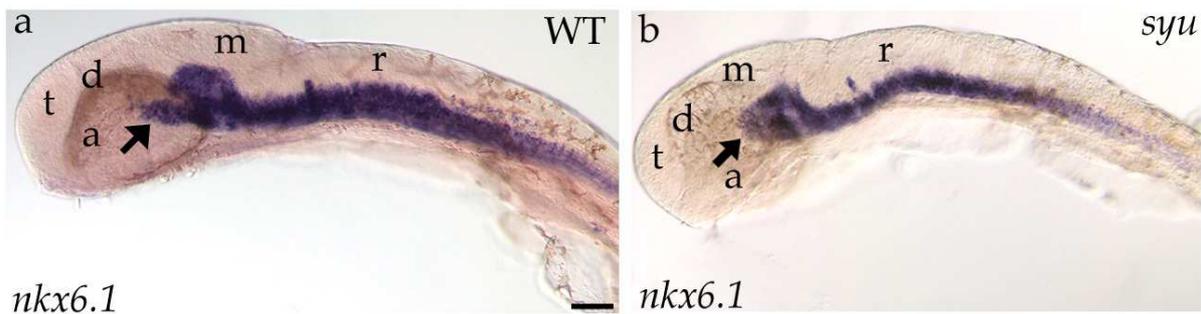


Abbildung 18: Shh ist notwendig für die Expression von *nkx6.1*. In *syu*-Mutanten (b) fehlt die rostrale Expressionsdomäne von *nkx6.1* (s. Pfeile) im Vergleich zum WT (a). Lateralansichten, ca. 26 hpf, rostral ist links, dorsal ist oben. a, Auge, d, Dienzephalon; m, Mesenzephalon; r, Rhombenzephalon; t, Telenzephalon. Maßstabsbalken = 100 μ m.

3.6.1 Die Expression von *nkx6.1* ist abhängig vom Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweg

Um zu überprüfen, ob *shh* notwendig für die Expression von *nkx6.1* im Wildtyp ist, wurde die Expression von *nkx6.1* in der *shh*-Mutante *syu* (s. Kap. 1.3.4, Tab. 1) untersucht. Dabei unterschied sich das Expressionsmuster von *nkx6.1* bei 26 hpf kaum vom Wildtyp, mit der einzigen Ausnahme, daß die im WT vorhandene, ganz rostrale Domäne in den *syu*-Mutanten fehlte (Vgl. Pfeile in Abb. 18a+b).

Zur Überprüfung, ob die noch vorhandene *nkx6.1*-Expression in *syu*-Mutanten eventuell auf die Expression der vorhandenen, teils redundanten *shh*-Paraloge des Zebrafisches (s. Kap. 1.3.4) zurückzuführen ist, wurden die Embryonen zur Unterdrückung des Hhedgehog-Signalweges mit Cyclopamin behandelt (s. Kap. 1.3.3 und 2.8). Alle behandelten Embryonen zeigten eine komplette Reduktion der *nkx6.1*-Expression (Abb. 19b).

Zur Untersuchung einer direkten Abhängigkeit von *sonic hedgehog*, wurden *hsp*-Aktivatorfische mit *shh*-Effektorfischen gekreuzt und einem Hitzeschock unterzogen (s. 2.7).

Nach einem Hitzeschock bei 70% Epibolie ließ sich bei ca. 22 hpf eine deutliche Expansion der *nkx6.1*-Expressionsdomäne in das dorsale Neuralrohr feststellen (Abb. 14g). Für die Expression von *nkx6.1* ist Shh also sowohl ausreichend wie notwendig.

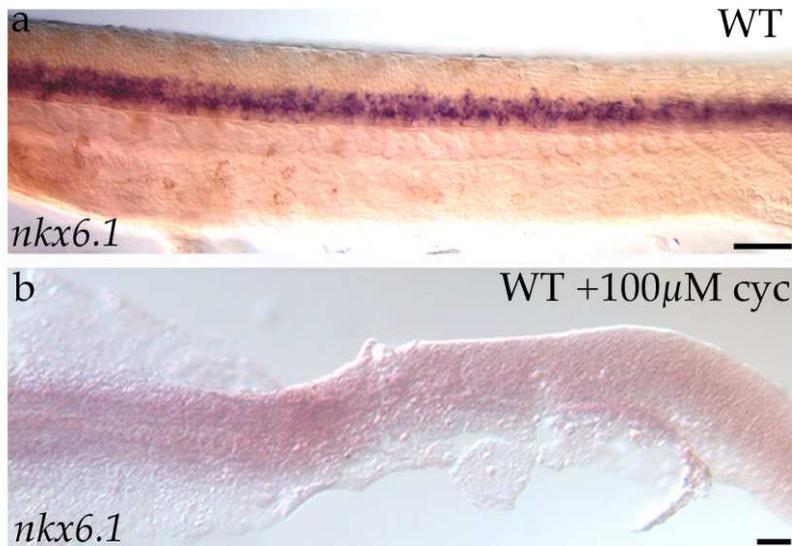


Abbildung 19: Die Expression von *nkx6.1* ist abhängig von Hh-Signalen. Verlust von Hh-Signal führt zur vollständigen Unterdrückung der *nkx6.1*-Expression. Lateralansichten, ca. 22 hpf, rostral ist links, dorsal ist oben. Inkubation von Embryonen in Cyclopamin erfolgte wie in Kap. 2.8 beschrieben. Maßstabsbalken = (a), 50 µm; (b), 100 µm.

3.6.2 Ein Morpholino-vermittelter Translationsblock führt zu Verlust von Nkx6.1-Protein

Zur genaueren Untersuchung der Funktion von *nkx6.1* während der Neurulation, wurde zunächst versucht, einen Funktionsausfall (*knock down*) des Gens durch Injektion eines Morpholinos (MO) herbeizuführen. Das von der Firma *Gene Tools* hergestellte Morpholino (MO-*nkx6.1*; s. 2.11) umfasst 14 bp beginnend am Translationsstart (s. Anhang 5.2, Markierung in Rot). Um zunächst die Funktionalität des MO zu untersuchen, wurde in Kooperation mit Sarah Cheesman aus der Gruppe von Judith Eisen in Eugene (Oregon) eine Antikörperfärbung bei 24hpf vorgenommen. Hierzu wurde ein gegen das Maus-homolog von Nkx6.1 hergestellter Antikörper verwendet. Injektionen von ca. 8-12 ng zeigten im Vergleich zum Wildtyp nur eine schwache Reduktion der Proteinmengen, bei 20-30 ng ist hingegen fast kein Protein mehr zu detektieren. Injektionen von 40-60 ng führten zu schweren Missbildungen und frühem Tod der Embryonen, so daß für die weiteren Experimente jeweils Konzentrationen von 20-30 ng verwendet wurden.

3.6.3 Der Verlust von Nkx6.1-Funktion führt zur Reduktion von sekundären Motorneuronen und *vsx2*-positiven Interneuronen

Um die Effekte von Nkx6.1-Funktion auf die Spezifikation der neuronalen Subtypen zu untersuchen, wurde zunächst die Anzahl und Lage der *isl1*-positiven Zellen in der Neuralplatte und im Neuralrohr untersucht. Die MO-injizierten Embryonen zeigten keinerlei Effekt in bezug auf die Lage und Anzahl der *isl1*-positiven Zellen in der medialen Region der Neuralplatte, ebensowenig veränderte sich die Anzahl und Position dieser Zellen im Neuralrohr bei 24 hpf (Tab. 6). Die primären Motorneurone sind also durch den Funktionsausfall von Nkx6.1 nicht betroffen.

Hingegen führte die Injektion von MO-*nkx6.1* zu einer starken Reduktion der Anzahl der Axone der sMN, wie die Färbung mit zn8-Antikörper deutlich zeigt (Abb. 20b).

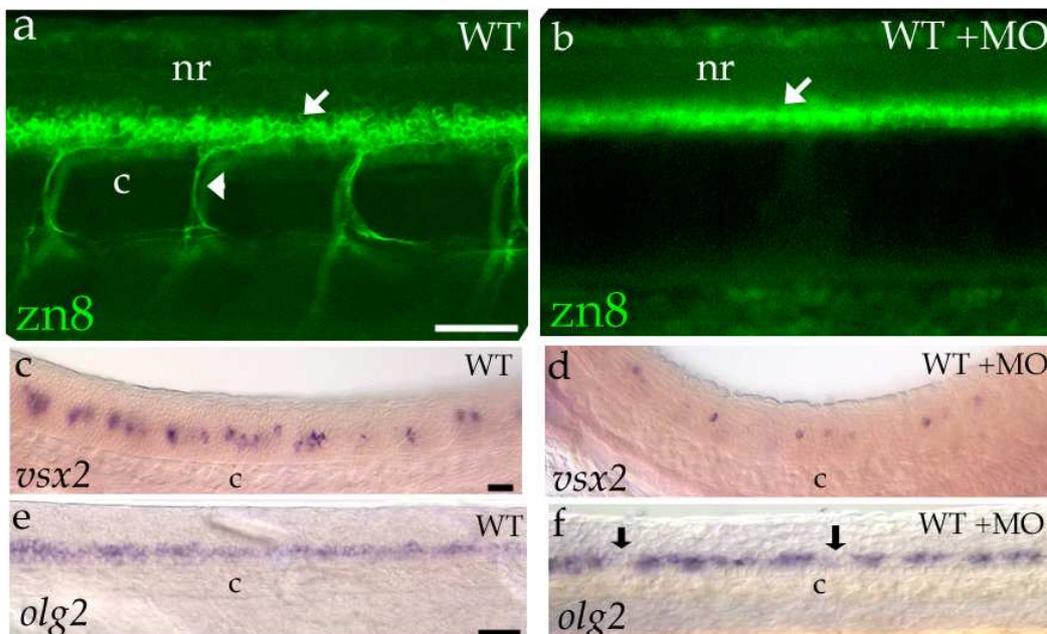


Abbildung 20: *Knock down* der Nkx6.1-Funktion führt zu einer starken Reduktion der Anzahl von sMN (Pfeile in a + b) und ihrer Axone (Pfeilkopf in (a) zeigt den WT), zur Reduktion von *vsx2*-positiven IN (c-d) und zu Lücken in der Reihe der *olg2*-positiven Zellen (e-f). Lateralansichten von 48 hpf alten, (a-b), bzw. 24 hpf (c-f) alten Embryonen. Rostral ist links, dorsal ist oben. c, Chorda; MO, Morpholino (20-30 ng, s. Text); nr, Neuralrohr. Maßstabsbalken = 50 μ m.

Da die wildtypische Expressionsdomäne von *nkx6.1* die Region der *vsx2*-positiven IN zumindest teilweise mit einschließt (Kap. 3.2.2), wurden diese Interneurone bei den injizierten Embryonen ebenfalls untersucht und eine signifikante Reduktion festgestellt (Abb. 20d und Tab. 6). Zudem zeigen einige Embryonen eine leichte Verringerung der

Anzahl an *olig2*-positiven Zellen (Abb. 20f). Keinerlei Veränderung konnte für die Anzahl und Lage anderer Interneurone (*pax2*-, *eng1b*- u. *evx1*-positiv) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.4 Ausfall von Nkx6.1-Funktion hat keine Auswirkungen auf andere HD-Proteine

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, konnte in Huhn und Maus gezeigt werden, daß das Gegenstück zu Nkx6.1 (Klasse II) das zu Klasse I gehörende Protein Dbx1 ist. Es lag daher nahe, die Auswirkungen des Nkx6.1- *knock down* auf das entsprechende Zebrafisch-Homolog *dbx1a* (s. Tab. 5), wie auch auf das zugehörige Paralog *dbx1b* zu überprüfen. Für keines dieser beiden Markergene konnte ein Effekt nach MO-Injektion nachgewiesen werden. Dies gilt ebenso für die Expression anderer Gene dieser Klassen, wie *nkx2.2*, *pax6a*, und *pax7a* (Daten nicht gezeigt).

3.6.5 Überexpression von *nkx6.1* zeigt keinerlei Effekte auf die neurale Musterbildung

Da der Funktionsausfall von *nkx6.1* zu einer deutlichen Veränderung der Anzahl und Qualität einiger neuronaler Subtypen führte (s. 3.6.2), wurde auch die Frage untersucht, welche Effekte die Überexpression von *nkx6.1* verursachen könnte. Hierzu wurde im 1-2 Zellstadium *nkx6.1*-mRNA injiziert (s. 2.10.15) und die Effekte bei 4 Somiten, 14-16 Somiten, 22 hpf und bei 48 hpf untersucht. Weder bei der Anzahl und Lage der pMN (untersucht mit *isl1* und *isl2*) noch der sMN konnte ein Effekt festgestellt werden. Gleiches gilt für die *vsx2*-positiven Interneurone (Tab. 6).

	Anzahl Neurone <i>isl1/2</i>	n	Anzahl Neurone <i>vsx2</i>	n
WT	31±4	6	96±4	8
WT + MO_ <i>nkx6.1</i>	28±3	4	46±15	4
WT + <i>nkx6.1</i> -mRNA	23±6 ²	6	90±9	8
WT + 75µM Cyclopamin	-		33±12	7
<i>hsp::Gal4</i> x <i>UAS:shh</i>	-		101±10	5

Tabelle 6: Effekte des Funktionsausfalls und der Überexpression von *nkx6.1* und *shh* auf primäre MN⁵ und IN⁶.

n = Anzahl der untersuchten Embryonen

4 Diskussion

In Abschnitt 3 wurden die Untersuchungen zur Funktion von *sonic hedgehog* während der Musterbildung im Neuralrohr von *Danio rerio* beschrieben. Dabei wurde das GAL4/*UAS*-System zur gezielten Misexpression dieses Genes verwendet. Obwohl zur Verwendung dieses Systems im Zebrafisch schon einige Arbeiten vorliegen (Scheer and Campos-Ortega (1999); Scheer (2000); Lawson et al. (2001); Scheer et al. (2001, 2002)), soll in der anschließenden Diskussion zuerst auf die Erfahrungen mit dieser Methode in dieser Arbeit eingegangen werden. Desweiteren wurden neue Erkenntnisse über die Funktionen von *shh* bei der Augentwicklung gewonnen. Der Hauptteil der Arbeit befasste sich mit der Funktion von *shh* während der Entwicklung des ventralen Neuralrohrs im Zebrafisch. Viele, nach den Ergebnissen aus Versuchen in Maus und Huhn erwartete Effekte nach *shh*-Misexpression auf die neurale Musterbildung, konnten nicht festgestellt werden. Jedoch wurden verschiedene, bisher im Zebrafisch nicht bekannte Funktionen dieses Gens in der Neurogenese festgestellt. In diesem Zusammenhang konnte der Transkriptionsfaktor *nkx6.1* kloniert und als ein wichtiges Zielgen von Shh bei der Spezifikation von sMN und IN identifiziert werden.

4.1 Das GAL4/*UAS*-System zur gezielten Misexpression von *shh*

In der vorliegenden Arbeit wurde das von Scheer and Campos-Ortega (1999) im Zebrafisch etablierte GAL4/*UAS*-System (Kap. 1.8) zur Misexpression von *shh* im Neuralrohr genutzt. Dabei konnten die Vorteile des Systems gerade im Hinblick auf die kontrollierte zeitliche Misexpression des Effektorgens genutzt werden. Die Verwendung des *hsp70::Gal4*-Aktivatorbausteines erlaubte eine gezielte Erhöhung der Shh-Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung (Kap. 3.4). Dies wäre alleine durch Injektionen von mRNA nicht möglich gewesen. Am Beispiel der Effekte der Überexpression von *shh* auf die Entwicklung von sMN und OLPs wird dies besonders deutlich: Hitzeschocks bei ca. 50% Epibolie führten zu keiner Veränderung in der Lage und Anzahl dieser neuronalen Subtypen, ebensowenig wie die zusätzliche Injektion von *shh*-mRNA, während hingegen Überexpression von *shh* bei ca. 10 Somiten einen deutlichen Effekt zeigte (Kap. 3.4.4).

Die verwendeten, noch nicht von Scheer (2000) beschriebenen transgenen Stämme, konnten dabei als geeignete *UAS*-Effektoren identifiziert werden, deren Transaktivierungsmuster im wesentlichen dem Expressionsmuster des Aktivators entsprach. Dabei ergaben sich jedoch die auch von Scheer (2000) schon beschriebenen starken Schwankungen der Expressionsniveaus von Aktivator- und Effektorbaustein (Kap. 3.4.1). Diese

Schwankungen der Expressionsstärken vor allem des Effektorgens müssen bei der Analyse der hervorgerufenen Effekte stets bedacht werden. Wenn – wie im vorliegenden Fall – die Funktion eines Morphogens untersucht werden soll, die ja schon gemäß Definition konzentrationsabhängig ist, ist dieser Punkt um so stärker zu berücksichtigen. Da aber die Transaktivierung von *shh* in Nachkommen aus Kreuzungen einzelner transgener Individuen von Aktivator- und Effektorstamm jeweils gründlich untersucht wurde und – falls möglich – dieselben Individuen jeweils wieder miteinander gekreuzt wurden, ist es wahrscheinlich, daß die beschriebenen Effekte auf vergleichbaren Konzentrationen von ektopisch transaktiviertem *shh* beruhen. Ohne eine jeweils parallel vorgenommene, quantitative Bestimmung der Menge an Shh in Embryonen mit *shh*-Transaktivierung, kann dies jedoch nicht abschließend beantwortet werden. Ein Nachteil der verwendeten Effektor-Stämme war, daß die Konzentrationen an transaktiviertem Shh nicht durch unterschiedliche Hitzeschockbedingungen moduliert werden konnten. Schon ein um 5-6 Minuten kürzerer Hitzeschock bei 41°C führte zu einer kaum noch nachweisbaren Transaktivierung von *shh*. Dieser Effekt wurde auch in Scheer (2000) als fehlende Transaktivierung von *shh* nach Hitzeschock bei einer Temperatur von 40°C (bei gleicher Dauer von 30') beschrieben.

Die Frage, ob die doch recht drastischen Hitzeschock-Bedingungen (30', 41°C) oder eine starke Expression von GAL4 nicht selbst zu Veränderungen geführt haben, verdient ebenfalls Beachtung. Die zu Beginn der Untersuchungen jeweils mittels PCR vorgenommenen Analysen des Genotyps der Nachkommen aus Kreuzungen von Aktivator und Effektor (Kap. 3.4.1) haben gezeigt, daß die beobachteten phänotypischen Veränderungen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Misexpression von *shh* zurückzuführen waren. Diejenigen Embryonen, in denen die beschriebenen Effekte festgestellt wurden, waren stets transgen für sowohl das Aktivator- als auch für das Effektorkonstrukt. Dabei zeigten die Embryonen, die entweder für das eine, das andere oder aber für keines der beiden Konstrukte transgen war, i.a. keine erkennbaren Unterschiede zum Wildtyp. Ausnahme von dieser Beobachtung sind allerdings die in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Veränderungen des somitischen Mesoderms v.a. nach Hitzeschocks zur Mitte der Somitogenese. In einem einzigen Fall konnten auch die bei Scheer (2000) beschriebenen toxischen Effekte von GAL4 beobachtet werden: Ein doppelter Hitzeschock bei 70% Epibolie und bei ca. 10 Somiten führte bei ca. 18 Somiten zu massiver Apoptose (nachgewiesen durch TUNEL-Färbung; Daten nicht gezeigt) in ca. 50% der Nachkommen aus einer Kreuzung zwischen *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor. Eine *in situ*-Färbung mit einer *Gal4*-Sonde zeigte sehr starke Transaktivierung von *Gal4* in diesen Embryonen.

4.2 Shh und Somitogenese

Diejenigen Embryonen aus Kreuzungen eines *hsp*-Aktivators und eines *shh*-Effektors, bei denen eine Misexpression von *shh* vorlag, wiesen eine deutlich sichtbare Störung in der Ausbildung der Somiten auf. Besonders deutlich wurde dies bei der morphologischen Betrachtung der Myomere in diesen Embryonen.

Da die in Kap. 3.4.2 beschriebenen phänotypischen Veränderungen der Myomere nur als ein Merkmal zur sicheren sichtbaren Identifikation mutanter Embryonen dienen sollte, wurden die Auswirkungen von misexprimiertem *shh* auf diesen Aspekt der Entwicklung nicht weiter untersucht. Dass die beschriebenen Veränderungen ihre Ursache aber in der Störung des Shh-Signalweges haben, scheint wahrscheinlich, nicht nur wegen der vorgenommenen PCR-Identifikation der mutanten Embryonen als jeweils transgen für Aktivator- und Effektor-konstrukt. Mutanten des Shh-Signalweges (s. Tab 1) zeigen vergleichbare Veränderungen der Myotome. Die Mutationen in *syu*, *yot*, *you* und *con* zeigen U-förmige Myomere und einen Verlust des horizontalen Myoseptums (van Eeden et al. (1996)). Gleiches gilt auch für Mutanten, die zwar nicht direkt zum Hh-Signalweg gehören, bei denen aber die Menge an Hh-Proteinen gestört ist durch eine fehlende Chorda, wie *floating head (flh)* und *no tail (ntl)*; van Eeden et al. (1996)). Welche Auswirkungen die Überexpression von *shh* auf die Somitogenese im Zebrafisch genau hat, wäre Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.3 Die Funktion von *shh* bei der Augenentwicklung im Zebrafisch

Die Misexpression von *shh* bei ca. 10 Somiten führte bei 48-50 hpf zu einer starken Störung der Anordnung und der Anzahl der RGZ im Auge (Kap. 3.4.2), sowie zu einem dünneren oder teilweise ganz fehlenden ON (Abb. 11+12). Auch hier scheint es sehr wahrscheinlich, daß diese phänotypischen Veränderungen tatsächlich auf der Misexpression von *shh* beruhen. Mutationen in möglichen (*dtr*, *con* und *uml*) und bekannten (*yot*) Komponenten des Hh-Signalweges (Tab. 1) zeigen vergleichbare Veränderungen v.a. in der Projektion des Sehnervs, wie die in Kap. 3.4.2 beschriebenen (Karlstrom et al. (1996)).

Einer der Gründe für diese Veränderungen könnte dabei in der Einflussnahme von *shh* auf die Regionen der Augenanlage zu finden sein. Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, daß zu einem späteren Zeitpunkt durch die Misexpression von Shh die Entwicklung bestimmter Zelltypen in der Retina gestört sein könnte. Interessanterweise wurde genau dieser letzte Effekt auch bei *syu*-Mutanten beobachtet (Neumann and Nüsslein-Volhard (2000)). Wenn also sowohl der Ausfall, als auch die Überexpression von *shh* ähnliche Effekte zeigen, worauf beruht dann der in dieser Arbeit beschriebene

Effekt?

Der Ausfall von ventralem Mittelliniengewebe im ZNS von *cyclops(cyc)*-Mutanten des Zebrafisches führt zu einem kompletten Verlust von Hedgehog-Signal (in Form von Shh und Twhh) in diesen Embryonen. Dies führt dazu, daß in *cyc*-Mutanten die Expression des Markers für das proximale Schicksal, *pax2*, fast komplett reduziert ist (Macdonald et al. (1995)), s. auch Kap. 3.4.2). Dagegen ist *pax6a*, der Marker für das distale Schicksal, in *cyc*-Mutanten ektopisch in den Regionen exprimiert, die sonst *pax2* exprimieren. In Übereinstimmung mit der Expression dieser Marker, differenzieren sich in *cyc*-Mutanten Zellen in der Position des optischen Traktes (ventro-nasales Vorderhirn, also einer Region proximalen Schicksals im WT) in retinales Gewebe, das im WT dem distalen Schicksal entspricht (Macdonald et al. (1995)). Die in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Effekte der Misexpression von *shh* auf die Expression dieser beiden Marker zeigen genau den gegenteiligen Effekt: Die Expressionsdomäne von *pax2* ist stark ausgeweitet (s. auch Ekker et al. (1995); Scheer (2000)), die Domäne von *pax6a* ist hingegen fast komplett reduziert (Abb. 13b). Es scheint also sehr wahrscheinlich, daß die Störung in der Differenzierung der RGZ auf diese Veränderungen zurückzuführen sind. Die Misexpression von *shh* scheint zu einer Reduktion der Zellen, die sich in Richtung eines distalen Schicksals entwickeln können, zu führen. Die Tatsache, daß trotz teilweise kompletter Reduktion der *pax6a*-Expression im Auge noch RGZ vorhanden sind, ist wahrscheinlich auf den Zeitpunkt des Hitzeschocks zurückzuführen. Macdonald et al. (1995) konnten zeigen, daß *pax6a* ab dem Ende der Gastrulation im Augenprimordium exprimiert wird. Die Misexpression von *shh* durch Hitzeschocks geschah in den beobachteten Embryonen aber erst bei ca. 10 Somiten. Es scheint daher möglich, daß einige Zellen sich bereits in Richtung des distalen Schicksals entwickelt haben könnten, bevor die Expression von *pax6a* unterdrückt wurde.

Das Vorhandensein von RGZ in den mutanten Embryonen könnte aber auch noch anders erklärt werden: Neumann and Nüsslein-Volhard (2000) konnten zeigen, daß in sich differenzierenden RGZ der Retina des Zebrafisches *shh* exprimiert wird. Dabei verläuft die Differenzierung der RGZ erstaunlich ähnlich zur Differenzierung der Retina in *Drosophila*. Auch im Zebrafisch differenzieren sich die neuronalen RGZ, ausgehend von einer kleinen Gruppe von ventro-nasal lokalisierten Zellen (28-30 hpf), in einer Welle nach dorsal und lateral. Dabei ist *shh*, ebenfalls ähnlich wie in *Drosophila*, für die Ausbreitung der Welle wichtig. Ausgehend von den ersten sich differenzierenden RGZ kann *shh* dabei seine eigene Expression in den benachbarten Zellen induzieren, was zur weiteren Differenzierung von RGZ und zur Ausbreitung der Welle führt. In *syu*-Mutanten ist die Ausbreitung der Welle, sowie Anzahl und Organisation der RGZ gestört, ein Merkmal, das in einem dünneren ON resultiert. Darüberhinaus scheint die Induktion der er-

sten RGZ nicht abhängig von Hh-Signalen zu sein, da in Cyclopamin-behandelten Embryonen trotzdem einige erste RGZ entstehen (alles in Neumann and Nüsslein-Volhard (2000)).

Daher könnte der in Kap. 3.4.2 beschriebene Effekt auf die RGZ auch auf der Störung der Ausbreitung der Differenzierungswelle in der Retina beruhen. Färbungen an Embryonen einer Kreuzung aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor zeigten nach einem Hitzeschock bei ca. 10 Somiten noch bei ca. 36 hpf ektopische Färbung von *shh* im gesamten Kopfbereich. Die vergleichbaren Auswirkungen von Überexpression und Ausfall von *shh* auf die Entwicklung des Sehnervs, können also ähnliche oder unterschiedliche Ursachen haben.

Die genaue Erforschung der Ursachen der gezeigten phänotypischen Veränderungen würde eine detaillierte Untersuchung erfordern. Dabei zeigt sich auch hier der Nutzen des GAL4/UAS-Systems sehr deutlich, da bei einer solchen Untersuchung die Möglichkeit gezielter Misexpression von *shh* zu unterschiedlichen Zeitpunkten von großem Nutzen ist.

4.4 Die Funktion von *shh* während der Musterbildung im ventralen Neuralrohr des Zebrafisches

4.4.1 Neuronale Markergene

Zur Analyse der Musterbildung im Neuralrohr von *Danio rerio*, war es zunächst nötig, geeignete Marker zu finden, um die einzelnen Subtypen voneinander unterscheiden zu können. Dabei konnten bereits klonierte Zebrafisch-Gene, die Sequenzähnlichkeiten zu den Markern im Huhn und in der Maus aufwiesen, verwendet werden, wie z.B. Marker einzelner Motorneurone (s. Kap. 1.4.1 und Tab. 4). Die Region der MN bestätigte sich dabei als in ihrer Bildung von *shh* beeinflussbar (s. Kap. 3.4.4 und 4.4.4). Auch für einige OLPs waren bereits Marker vorhanden (Kap. 3.1.2). Leider konnten keine zusätzlichen Marker für OLPs oder differenzierte Oligodendrozyten gefunden werden (Kap. 3.1.2 und 4.4.3). Gerade für eine genauere Untersuchung des Zeitpunktes der Entwicklung von Oligodendrozyten im Zebrafisch wären diese Marker von Nutzen gewesen. Trotzdem konnten durch die Analyse der Expression von *olg2* und *sox10* im WT und in Embryonen mit veränderter Hh-Signalstärke einige neue Erkenntnisse über die Entstehung von OLPs im Zebrafisch gewonnen werden (Kap. 3.4.4). Auch für den Marker *sim1* in Maus und Huhn konnte kein Homolog im Zebrafisch gefunden werden, so daß nicht analysiert werden konnte, ob ventral zur Region der MN und OLPs noch Interneurone existieren (s. auch Kap. 4.4.3).

Die Analyse der Expression der Marker *evx1*, *eng1b*, *vsx1* und *vsx2* ergab die in Kap. 3.1.1 beschriebene wahrscheinliche dorso-ventrale Anordnung. Wegen der in Kap. 3.3 bereits erwähnten aufgetretenen Probleme bei Doppel-*in situ* Färbungen fehlte allerdings das geeignete Mittel zur Überprüfung dieser Hypothese. Trotz dieser Schwierigkeiten stellte sich z.B. das Gen *vsx2* als guter Marker für eine Region von ventralen IN heraus, die mit der in Maus und Huhn entdeckten vergleichbar zu sein scheint (s. Kap. 4.4.3).

Die in Huhn und Maus beschriebenen Domänen werden durch einen jeweils unterschiedlichen Code an Transkriptionsfaktoren definiert; von diesen sind alle bis auf Olg2 (bHLH) Homöodomänen-Proteine. Die Expression dieser Faktoren ist dabei abhängig von der Konzentration an sekretiertem Shh (Kap. 1.4.2). Ob also die beschriebenen Marker in Analogie zu Maus und Huhn tatsächlich verschiedene Domänen von Vorläuferzellen markieren, kann erst durch die Analyse ihrer Expression bei Misexpression von *shh* geklärt werden und durch die Untersuchung, ob es vergleichbare Expression von Transkriptionsfaktoren auch im Neuralrohr des Zebrafisches gibt.

4.4.2 Die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren im Neuralrohr von *Danio rerio* wird von Sonic Hedgehog beeinflusst

Im Neuralrohr des Zebrafisches werden in unterschiedlichen Regionen verschiedene Transkriptionsfaktoren aus der Klasse der Homöodomänen- und bHLH-Proteine exprimiert (Kap. 3.3). Es konnte gezeigt werden, daß die Expression einige dieser Faktoren von Sonic Hedgehog positiv oder negativ reguliert wird. Dabei ergaben sich starke Hinweise darauf, daß dieser Einfluß von der Konzentration an Shh abhängig sein könnte. Für einige andere Transkriptionsfaktoren konnte jedoch kein Einfluß von Shh auf die jeweilige Expression festgestellt werden.

In Maus und Huhn sind die verschiedenen Faktoren, die durch ihre jeweilige Kombination die unterschiedlichen Domänen von Vorläuferzellen definieren, hinlänglich bekannt (Kap. 1.4.2). Die in Kapitel 3.3 beschriebenen mRNA-Expressionsdomänen untersuchter Orthologe des Zebrafisches ergeben zunächst folgendes Bild der Situation im WT:

Alle untersuchten Gene sind mindestens von Mitte der Somitogenese an im Neuralrohr exprimiert (Dabei wurde der besseren Übersicht halber in Kap. 3.3 nur die Expression gegen Ende der Somitogenese gezeigt). Im Modell von Jessell markiert die ventrale Grenze der Expressionsdomäne von *pax7a* die dorsale Grenze des ventralen Neuralrohrs (Kap. 2). In Abb. 8 wird die Anordnung der untersuchten Transkriptionsfaktoren in Analogie zu diesem Modell mit Bezug zu *pax7a* schematisch dargestellt. Da-

zu muß aber angemerkt werden, daß diese Anordnung zunächst rein willkürlich ist und nur der Vergleichbarkeit der Schemata in beiden Abbildungen dient. Auch sind in Abb. 8 Expressionsdomänen von mRNAs gezeigt. Da es sich aber immer um nicht-sekretierte Proteine handelt und diese zellautonom als transkriptionelle Repressoren wirken (unter Einbeziehung des Co-Repressors Groucho, Muhr et al. (2001)), sind die mRNA-Expressionsdomänen mit denen der bei Jessell und anderen beschriebenen Proteindomänen vergleichbar.

Es fällt auf, daß die D/V-Anordnung der aus Maus und Huhn bekannten Klasse II-Faktoren *nkx2.2*, *nkx6.1* und *olig2*, im Zebrafisch ebenso zu beobachten ist. Die größte Expressionsdomäne weist dabei *nkx6.1* auf und schließt die Domänen von *olig2* und *nkx2.2* mit ein (Kap. 3.3). Allerdings liegt die dorsale Grenze von *olig2* dabei ventral zur dorsalen Grenze von *nkx6.1*, so daß sich eine Region zu ergeben scheint, in der ausschließlich *nkx6.1* exprimiert wird. Auffällig ist ebenfalls, daß es keine Zone gibt, in der *nkx2.2* alleine exprimiert wird. Aufgrund der beschriebenen Expressionsmuster von *nkx2.2* und *olig2* während der Entwicklung, scheint dies auch zu früheren Stadien nicht der Fall zu sein (Barth and Wilson (1995); Park et al. (2002)). Damit könnte vielleicht auch erklärt werden, warum kein Marker gefunden werden konnte, der dem V_3 -Marker *sim1* entspricht. Da diese Region sich in Huhn und Maus dadurch auszeichnet, daß sie alleine durch die Expression von Nkx2.2 definiert wird (es wird zwar auch Nkx6.1 exprimiert, jedoch führt der Verlust dieses Proteins nicht zum Verlust oder zur Veränderung dieser Domäne (Briscoe et al. (1999))), ist es möglich, daß V_3 -IN im *Danio rerio* nicht existieren.

Für die Expressionen der Sequenz-Homologen der Klasse I konnten ebenfalls Übereinstimmungen zu Huhn und Maus gefunden werden. Diese liegen in der Überlappung der Expressionsdomänen von *dbx1b*, *irx3* und *pax6a*. Allerdings gibt es auch bedeutsame Unterschiede. Es konnte nicht genau festgestellt werden, wo sich die ventralen Grenzen der Expressionsdomänen von *irx3* und *pax6* befinden. Es ist also nicht klar, ob eine Region existiert, in der entweder nur *irx3* oder nur *pax6a* exprimiert wird. Weiterhin scheint die Domäne der *dbx1a*-Expression schmaler und ventraler lokalisiert zu sein als die Expressionsdomäne von *dbx1b*. Es kann allerdings nur noch einmal betont werden, daß nur gute Doppelfärbungen verschiedener Kombinationen der genannten Gene diese vorläufige Beschreibung der Expressionsdomänen zueinander wirklich bestätigen können.

Es existieren also im Neuralrohr des Zebrafisches zum untersuchten Zeitpunkt Regionen, in den unterschiedliche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren ausgeprägt werden. Die Expressionsmuster der einzelnen Gene ähneln dabei teilweise denen der Klasse I- und Klasse II-Proteine. Aber sind diese Expressionsdomänen abhängig von Shh? Die Analyse der Expression der einzelnen Gene nach Überexpression von *shh* mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems (Kap. 3.4.3) lieferte unterschiedliche Ergebnisse:

Für die Gene *nkx2.2*, *nkx6.1* und *olig2* konnte eine Abhängigkeit der Expressionen dieser Gene im Neuralrohr von der Konzentration an Shh nachgewiesen werden. Damit konnte diese Abhängigkeit von der Stärke des Hh-Signals im Neuralrohr für *olig2* und *nkx2.2* (Barth and Wilson (1995); Park et al. (2002)) bestätigt und für *nkx6.1* zum ersten Mal gezeigt werden. Gerade für das während dieser Arbeit neu klonierte Gen *nkx6.1* (Kap. 2.14) ergeben sich dadurch, zusätzlich zu den gezeigten Sequenzhomologien (5.4), weitere Hinweise auf eine auch funktionelle Übereinstimmung mit den orthologen Genen aus Huhn, Maus, u.a. (s. aber auch Kap. 4.4.4 und 4.4.4). Die untersuchten mutanten Embryonen zeigten für alle drei Gene eine starke dorsale Expansion der einzelnen Expressionsdomänen (Abb. 14 und 16). Dabei ist die dorsale Expression für *olig2* und *nkx6.1* jeweils am stärksten verschoben, die dorsale Grenze der Expression von *nkx2.2* ist in den Embryonen mit *shh*-Misexpression immerhin noch bis ca. zur Hälfte des Neuralrohrs ausgeweitet.

Aus dieser Beobachtung lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Die Hitzeschockbedingungen und die verwendeten Stämme des GAL4/UAS-Systems führen in den untersuchten Nachkommen aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor zu einer Konzentrationsänderung von Shh im Neuralrohr, die ausreichend ist, um auch die Expressionsdomäne des ventralsten Markers außerhalb der Bodenplatte, *nkx2.2*, dorsal zu verschieben.
2. Die Expression von *olig2* und *nkx6.1* wird wahrscheinlich bereits durch niedrigere Konzentrationen an Shh beeinflusst. Dies wird deutlich aus der stärker dorsalen ektopischen Expression dieser beiden Gene in mutanten Nachkommen aus *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor. Eine so starke dorsale Expansion der Expressionsdomäne konnte für *nkx2.2* nie beobachtet werden. Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, konnte für die Expression dieser Marker im Huhn festgestellt werden, daß zur Etablierung der einzelnen Expressionsdomänen *in vitro* eine jeweilige Steigerung der Shh-Proteinkonzentration um das 2-3fache nötig ist (Ericson et al. (1997a,b)). Natürlich erlaubt die verwendete Methode zur Überexpression von *shh* in dieser Arbeit keine Aussagen über die quantitativen Relationen der zur Etablierung der o.g. Expressionsdomänen notwendigen Shh-Konzentrationen (s. auch Kap. 4.1). Dazu sind weitere Untersuchungen nötig. Denkbar wären dabei Untersuchungen an *syu*-Mutanten, in denen die Konzentration an Hedgehog-Protein verringert ist. Zusätzlich könnte versucht werden, *UAS:shh*-Integrationen in den *syu*-Hintergrund einzukreuzen. Auch weitere Versuche der Modulation der Transaktivierungsstärke von *shh* in *shh*-Effektorfischen könnten, auch durch Verwendung anderer Aktivatorstämme, vorgenommen werden.

3. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist anzunehmen, daß die drei genannten Gene auch im Zebrafisch zur Klasse II im Sinne des o.g. Modells gehören.

Die Expression der Gene *pax6a* und *pax7a* war nach Misexpression von *shh* im Neuralrohr vollständig unterdrückt. Dies zeigt eine negative Regulation der Expression dieser Gene durch Shh. Wegen der beschriebenen Probleme, die Konzentration von fehlexprimiertem Shh zu modulieren (Kap. 4.1), konnte nicht überprüft werden, ob die Expression der beiden Gene durch verschiedene Shh-Konzentrationen unterschiedlich beeinflusst wird. Trotzdem konnte gezeigt werden, daß beide genannten Gene im Zebrafisch zur Klasse I gehören.

Im Gegensatz zu *pax6a* und *pax7a*, konnte für die drei anderen untersuchten Gene keine Abhängigkeit ihrer Expression von *shh* festgestellt werden. Transaktivierung von *shh* in *shh*-Effektoren veränderte die Lage der Expressionsdomänen von *dbx1a*, *dbx1b* und *irx3* nicht (Abb. 14). Dabei scheint es nicht wahrscheinlich, daß der Grund für diesen fehlenden Effekt in einer zu geringen Konzentration an transaktiviertem Shh zu finden ist. Die o.g. Effekte auf die Expression des Gens *nkx2.2* lassen den Schluß zu, daß die Konzentrationen ausreichend sein müßten. Eine Möglichkeit könnte darin zu finden sein, daß im Neuralrohr des Zebrafisches gar keine Orthologen zu den drei erwähnten Genen exprimiert werden, deren Expressionsmuster vom Shh-Signal beeinflussbar wäre. Dies ist zwar nicht auszuschließen, erscheint aber wegen der bereits erwähnten Übereinstimmung für die anderen Gene (s.o.) als nicht sehr wahrscheinlich. Es ist eher anzunehmen, daß es im Zebrafisch noch weitere Homologe der oben erwähnten Gene geben muß (s. aber auch Kap. 4.4.3). Bei einer Datenbanksuche konnten weitere Paraloge der Gene *iro3* und *dbx1a*. bzw. *dbx1b* gefunden werden, die aber wegen der niedrigeren Sequenzhomologie zunächst nicht mit in diese Arbeit einbezogen wurden. Zur weiteren Analyse müsste die Expression dieser Gene ebenfalls auf ihre Expression im WT und in Embryonen mit *shh*-Misexpression hin untersucht werden. Natürlich gilt generell, daß die untersuchten Zebrafisch-Gene nicht die einzigen Shh-abhängigen Homologen zu den in Maus und in Huhn gefundenen Genen sein müssen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind im Zebrafisch allein vier weitere Paraloge des Gens *pax7a* bekannt (Seo et al. (1998)), sowie ein Paralog für *pax6a* (Nornes et al. (1998)).

Die vorhandenen Ergebnisse lassen keine Aussage darüber zu, welche der einzelnen Transkriptionsfaktoren aus Klasse I und Klasse II evt. als Interaktionspartner (s. 1.4.2) zusammengehören könnten. Die Tatsache, daß z.B. die Expressionsdomänen von *nkx2.2* und *pax6a* zwar beide durch Misexpression von *shh* verändert werden, erlaubt noch nicht, den Schluß zu ziehen, beide könnten miteinander agieren, wie dies beim Huhn gezeigt wurde (Briscoe et al. (2000)). Zur Beantwortung dieser Fragen wären gezielte Über-

expressionen der einzelnen Transkriptionsfaktoren und eine Analyse möglicher Auswirkungen auf die Expressionsdomänen der anderen Faktoren notwendig. Für *nkx6.1* ist auch nicht klar, ob es einen Interaktionspartner aus Klasse I gibt. Die scharfe dorsale Begrenzung der Expressionsdomäne läßt die Existenz eines solchen zwar vermuten, da aber keines der untersuchten *dbx*-Gene ein Klasse I-Protein zu kodieren scheint, steht noch nichtmal ein möglicher Kandidat zur Verfügung. Hingegen scheint es wahrscheinlich, daß die Funktion von Pax7a im Zebrafisch ähnlich zu der Funktion von Pax7 im Huhn sein könnte. Ericson et al. (1996, 1997a) und Pierani et al. (1999) haben bereits vorgeschlagen, daß die Expression von *pax7* in den ventralen Zellen des Neuralrohrs direkt von Hh unterdrückt wird und das Ausschalten von *pax7a* einen kritischen Schritt in der Induktion der ventralen Zelltypen darstellt. Die direkte Notwendigkeit von Hh-Signal zu einer solchen Abschaltung der *pax7*-Genexpression konnte durch (Wijgerde et al. (2002)) nach Analyse von *smo*^{-/-}-Mäusen bestätigt werden.

Können aus den gezeigte Untersuchungen am Zebrafisch neue Erkenntnisse über die Etablierung der Transkriptionsfaktor-Expressionsdomänen gewonnen werden? Trotz der erwähnten Probleme, eine Aussage über die Konzentrationen von misexprimiertem Shh treffen zu können (s.o.), machen doch gerade die Ergebnisse bei der Verschiebung der Expressionsdomänen der *nkx*-Gene eine konzentrationsabhängige Wirkung von Shh wahrscheinlich. Die bisher vorgenommenen Analysen in Huhn und Maus stützen zwar die Annahme einer großen Reichweite von sekretiertem Hh-Signal im Neuralrohr (Briscoe et al. (2001); Wijgerde et al. (2002)), die Konzentrationsabhängigkeit konnte bisher aber nur *in vitro* gezeigt werden (Ericson et al. (1997b)). Die vorliegenden Ergebnisse aus den Untersuchungen im Zebrafisch *in vivo* können daher als eine wichtige Bestätigung der Annahme gewertet werden, daß die Wirkung von Shh im Neuralrohr von Vertebraten konzentrationsabhängig ist.

4.4.3 Die Bedeutung von Shh für die Spezifikation neuraler Subtypen im Neuralrohr von *Danio rerio*

Interneurone In der Analyse der Lage und Anzahl verschiedener Klassen von Interneuronen in Embryonen mit misexprimiertem *shh* konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Verschiedene Gründe für dieses Ergebnis sind denkbar, die Ergebnisse zeigen jedoch auch die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen.

Die in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit machten die Annahme wahrscheinlich, daß auch im Zebrafisch ein bestimmter Code an Transkriptionsfaktoren für die Etablierung von Vorläuferzellen-Domänen sorgen könnte, in denen dann die unterschiedlichen neuronalen Subtypen entstehen. Daher war es umso erstaunlicher, daß

auch starke Misexpressionen von *shh* (Kap. 3.4.4) sich nicht viel deutlicher auf die Lage und Anzahl der neuronalen Subtypen auswirkten. Die absolute Notwendigkeit eines Hh-Signals für die Spezifikation der einzelnen neuralen Subtypen im ventralen Neuralrohr konnte mehrfach *in vivo* und *in vitro* durch *gain-of-function* und *loss-of-function* Analysen von Shh ((Roelink et al., 1994; Chiang et al., 1996, Marti E 1995;)), durch Expression einer konstitutiv-aktiven Variante von Smo (Hynes et al. (2000)), einer dominant-negativen Variante von Ptc (dnPtc, Briscoe et al. (2001)) oder durch Doppelmutanten in *smo* und *gli3* (Wijgerde et al. (2002)) nachgewiesen werden. Trotzdem konnte weder die Misexpression von *shh* nach einem Hitzeschock zur Mitte der Gastrulation (70% Epilolie), noch nach einem Hitzeschock in der Mitte der Somitogenese (ca. 10 Somiten) die Anzahl und Lage der verschiedenen Interneurone signifikant beeinflussen (Kap. 3.4.4).

Welche Ursachen könnten diesem Effekt zugrunde liegen? Wie bereits im vorangehenden Kapitel dargestellt, ist die Möglichkeit einer zu niedrigen Konzentration an misexprimiertem Shh eher auszuschließen. Zwar konnte in mutanten Embryonen bisher keine ektopische Expression des Bodenplattenmarkers *axial* (Strähle et al. (1996); Odenthal et al. (2000)) festgestellt werden, aber die dorsale ektopische Expression von *nkx2.2* deutet aus den oben angeführten Gründen auf eine ausreichende Konzentration von Shh in diesen Embryonen hin. Ein anderer Grund könnte in der Vermutung zu suchen sein, daß die ausgewählten Marker nicht geeignet sind, die neuronalen Subtypen der einzelnen Domänen zu repräsentieren. Dagegen spricht, daß der Funktionsausfall des Hh-Signals durch Cyclopamin eine deutliche Reduktion der *vsx2*-positiven IN hervorruft (Kap. 3.6.3). Trotzdem konnte auch für diesen IN-Marker keine Veränderung in der Expression nach Misexpression von *shh* festgestellt werden (Tab. 6). Auch konnte bereits gezeigt werden, daß z.B. die Entwicklung von pMN auch im Zebrafisch abhängig ist von einem Hh-Signal während der Neurogenese (Lewis and Eisen (2001); Varga et al. (2001); Beattie et al. (1997)). Zusammen mit der bereits erwähnten zwingenden Notwendigkeit eines Hedgehog-Signals zur Ausbildung von ventralen neuronalen Identitäten in der Maus (Wijgerde et al. (2002)), spricht dies gegen die Möglichkeit, die neurale Musterbildung im Zebrafisch sei gänzlich unabhängig von Hh-Signalen.

Bei weiterer Betrachtung scheinen daher zwei Möglichkeiten am wahrscheinlichsten: Zum einen könnte zwar die Spezifikation von MN und *vsx2*-positiven IN von Hh-Signalen abhängig sein, die Spezifikation der anderen IN aber nicht. Zum anderen könnte eine Erklärung im Zeitpunkt der Festlegung der verschiedenen IN zu finden sein (s.u.). Für das Argument einer Hh-unabhängigen Spezifikation von V_0 - und V_1 -IN spricht, daß in *shh*^{-/-}-Mäusen immer noch eine große Anzahl an *Evx1*-positiven V_0 -IN und *En1*-positiven V_1 -IN vorhanden ist. Dabei konnte gezeigt werden, daß ein Retinolsäure (RA)-Signalweg sowohl die Expression von *Dbx1* als auch von *Dbx2* indu-

zieren kann und damit für die Herstellung der V_0 - und V_1 -Identitäten verantwortlich ist (Pierani et al. (1999)). Dabei ist für die Spezifikation von V_0 -IN die Protein-Kombination $Pax7^{aus}$, $Dbx1^{an}$ entscheidend, für die Spezifikation von V_1 -IN gilt hingegen $Pax7^{aus}$, $Dbx1^{aus}$ $Dbx2^{an}$ (Pierani et al. (2001)). $Pax6$ ist dabei nur für die Etablierung eines Teils der V_1 -IN notwendig, da auch in $pax6^{-/-}$ -Mäusen noch V_1 -IN nachgewiesen werden können (Burrill et al. (1997); Ericson et al. (1997b); Pierani et al. (1999)). Auch in $smo^{-/-}$ -Mutanten konnten noch V_0 -IN (Wijgerde et al. (2002)), in Hühnerembryonen mit ekto-
pisch exprimiertem dnPtc zusätzlich noch V_1 -IN nachgewiesen werden (Briscoe et al. (2001)). In $smu^{-/-}$ -Mutanten im Zebrafisch fehlen zwar sMN und pMN im posterioren Rumpfbereich, im anterioren Rumpfbereich konnten hingegen noch pMN nachgewiesen werden (Varga et al. (2001)). Wijgerde et al. (2002) konnten zeigen, daß Hh-Signal für die ventrale Begrenzung der V_0 - und V_1 -Domänen verantwortlich ist. Andere Studien haben gezeigt, daß die Positionierung dieser Domänen auch von dorsal sekretierten BMP-Signalen abhängt (Pierani et al. (1999); Liem Jr et al. (2000); Patten and Placzek (2000)). Wechselwirkungen zwischen RA- und Hh-Signalweg konnten am Beispiel der Entwicklung der Gliedmaßenknospen im Zebrafisch gezeigt werden (Hoffman et al. (2002)). Daher besteht die Möglichkeit, daß die Bildung von $evx1$ -positiven, sowie von $en1$ -positiven IN im Zebrafisch nicht von Hh-Signalen abhängt. Zur Klärung dieser Frage wäre eine einfache Untersuchung dieser Zelltypen in Cyclopamin-behandelten Embryonen, oder in smu -Mutanten (s. Tab. 1) sinnvoll.

Trotz der verschiedenen experimentellen Ansätze zur Misexpression von *shh* (Kap. 3.4.4), konnte eine Abhängigkeit der verschiedenen untersuchten Interneurone von Shh-Expression nur für die $vsx2$ -positiven IN festgestellt werden. Dabei zeigte der Ausfall des Hh-Signalweges eine deutliche Reduktion in der Anzahl dieser IN (Abb.). Als entscheidend für die Etablierung dieser IN konnte dabei der Transkriptionsfaktor *nkx6.1* identifiziert werden (Kap. 3.6.4). Auch der Funktionsausfall dieses Transkriptionsfaktors führte zu einer starken Reduktion der $vsx2$ -positiven Zellen. Damit ist es wahrscheinlich, daß auch im Zebrafisch eine Region von V_2 -IN existiert und das diese IN können durch ein *chx10*-Homolog des Zebrafisches, *vsx2*, identifiziert werden können. Zur Etablierung dieser Region scheint dabei das Klasse II-Protein *Nkx6.1* notwendig zu sein (s. auch Kap. 4.4.4). Warum allerdings auch in diesem Fall keine Veränderung der Lage oder Größe dieser Region nach *shh*-Misexpression festgestellt werden konnte, bleibt unklar. Bisher gibt es auch in anderen Organismen keine Hinweise darauf, daß die V_2 -Region noch von anderen Signalen als von Hh abhängig ist. Auch läßt gerade die die eindeutig gezeigte Regulation des Transkriptionsfaktors *nkx6.1* durch Shh (Kap. 3.4.3 und 3.6.1) deutliche Auswirkungen der Veränderung der Shh-Konzentration erwarten. Die einzig plausibel erscheinende Erklärung dieses Effektes liegt möglicherweise ebenfalls in der Wahl des

Zeitpunktes des Hitzeschocks begründet.

Die oben angesprochene andere Ursache für die Schwierigkeiten, Veränderungen in der Expression der einzelnen IN-Marker hervorzurufen, könnte im Zeitpunkt des Hitzeschocks – und damit der Transaktivierung von ektopischem *shh* – liegen. Wie wichtig die Frage ist, wieviel Shh zu welchem Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung vorliegt, kann am Beispiel der in 3.4.4 beschriebenen Effekte deutlich gemacht werden. Ektopische Expression von *shh* bei ca. 80% Epibolie, bedingt durch einen Hitzeschock-induzierte Transaktivierung bei ca. 50% Epibolie, konnten zu keinem Zeitpunkt einen Effekt auf die Anzahl und Lage primärer oder sekundärer MN hervorrufen. Hingegen führten Hitzeschocks bei 10-12 Somiten zu einer dorsalen Ausweitung der Region der zn8-immunoreaktiven sMN (Abb. 15ps axps ax

). Die Bedeutung der Shh-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung von MN, konnte für die Neuralentwicklung des Huhns bereits von Ericson et al. (1996) gezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, daß Shh zu Beginn der Neurogenese wichtig ist für die Spezifikation ventraler neuraler Vorläuferzellen in der naiven Neuralplatte. Zu einem späteren Zeitpunkt, der weit in die S-Phase der letzten Mitosen dieser Vorläuferzellen hineinreicht, sorgt Shh-Signal für die Differenzierung in postmitotische MN. Eine Unterdrückung des Hh-Signals zu diesem Zeitpunkt führt zu einer Differenzierung dieser Zellen zu IN auf Kosten von MN. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme einer solchen Notwendigkeit eines zweifachen Signals auch in der Entwicklung der MN des Zebrafisch. Dabei muß allerdings die Besonderheit des Zebrafisches beachtet werden, daß zwei unterschiedliche Klassen von MN zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung entstehen (Kap. 1.2.2).

Primäre Motorneurone Wie erwähnt, hat die Erhöhung der Shh-Konzentration bei ca. 80% Epibolie keinen Effekt auf die MN, insbesondere auf die pMN. Unter Einbeziehung des gerade beschriebenen Modell ist anzunehmen, daß dies auf einen zu späten Hitzeschock zurückzuführen ist. Zum Zeitpunkt, an dem die ersten pMN postmitotisch werden, also gegen Ende der Gastrulation (ca. 15. Zellzyklus, Myers et al. (1986); Kimmel et al. (1994); s. auch Kap. 1.2.2), sollte die Konzentration an Shh hoch genug sein, um mehr MN zu generieren. Sollte aber die Shh-Konzentration zu Beginn der Neurogenese nicht hoch genug gewesen sein, um mehr ventrale Vorläuferzellen zu spezifizieren als im WT, könnte dies eine Erklärung dafür sein, daß kein Effekt auf die pMN festgestellt werden konnte. Die Induktion der Neuralplatte ist abhängig vom Kontakt des Ektoderms mit dem darunterliegenden Mesoderm (Kap. 1.2.1). Beim Zebrafisch-Embryo beginnt diese Anordnung der Keimblätter zueinander im sog. *germ ring*-Stadium, ca. 20-25 Minuten nach dem 50% Epibolie-Stadium (Kimmel et al. (1995)). Dabei beenden schon zu

diesem Zeitpunkt viele Zellen den 14. Zellzyklus (Kimmel et al. (1995)). Die ersten post-mitotischen Zellen erscheinen bei ca. 90% Epibolie, das sind ca. 3h später (bei 28,5°C, Kimmel et al. (1995)). Obwohl die Untersuchungen von Scheer et al. (2002) und eigene Erfahrungen vermuten lassen, daß diese Zeit ausreichen sollte, um ausreichend transaktiviertes *shh* zur Verfügung zu stellen, könnte der Hitzeschock dennoch nicht früh genug vorgenommen worden sein. Erste Analysen der Anzahl von *isl1*-positiven Zellen in Embryonen aus einer Kreuzung von *hsp*-Aktivator und *shh*-Effektor nach Hitzeschocks bei ca. 30% Epibolie könnten tatsächlich eine mögliche Zunahme an pMN zeigen. Aus Zeitgründen konnten diese Ergebnisse aber nicht mehr in diese Arbeit aufgenommen werden.

Oligodendrozyten-Vorläuferzellen In dieser Arbeit konnte auch für den Zebrafisch ein direkter Einfluß von *shh* auf die Spezifikation von Oligodendrozyten-Vorläufern nachgewiesen werden. Als ein wichtiger neuer Aspekt ergab sich dabei, daß diese Spezifikation dieser OLPs mit dem der Spezifikation der sMN zusammenfällt.

Im Zusammenhang mit den o.g. Betrachtungen zum Einfluß von Shh auf die Entwicklung pMN und der Frage nach dem Zeitpunkt dieser Einflußnahme, sind auch die auf Misexpression von *shh* zurückzuführenden Veränderungen im Expressionsmuster von *olig2* (Kap. 3.4.4) interessant. Die späte Misexpression von *shh* (Hitzeschock bei ca. 10 Somiten) hat eine Zunahme von *olig2*-positiven Zellen bei ca. 22 hpf zur Folge (Abb. 16). Wie in Kap. 3.4.4 bereits erläutert, sind diese Zellen wahrscheinlich OLPs. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß *olig2* sowohl für die Differenzierung von MN als auch von OLPs wichtig ist (Novitch et al. (2001); Sun et al. (2001); Zhou et al. (2001); Park et al. (2002); Takebayashi et al. (2002)). Dabei sind die beiden Funktionen zeitlich voneinander getrennt. Diese zeitliche Trennung ist wiederum Teil einer komplizierten zeitlichen und räumlichen Änderung der Expressionsmuster von Nkx2.2 und seinem Klasse I-Gegenspieler Pax6 (Zhou et al. (2001); Rowitch et al. (2002)): Zum früheren Zeitpunkt der Entwicklung überlappen die Expressionsdomänen von Olig2 und Nkx2.2 nicht und die Expressionsdomäne von Olig2 liegt innerhalb der Domäne von Nkx6.1. Dabei wird die Expression von Olig2 durch Nkx6.1 positiv reguliert (Novitch et al. (2001)). Olig2 ist zusammen mit Neurogenin1, dessen Expression es positiv reguliert, in dieser Konstellation für die Entwicklung von MN verantwortlich (Zhou et al. (2001)). Später sorgt eine leichte dorsale Verschiebung der ventralen Grenze der Pax6-Expression für eine dorsale Erweiterung der Expression von Nkx2.2 – mit der Folge, daß Olig2 und Nkx2.2 nun teilweise überlappen. Diese Koexpression führt zu einer Repression von Neurogenin und zur Spezifizierung von OLPs (Zhou et al. (2001)). Ein genauer Vergleich der Oligodrogenese in Huhn und Maus hat ergeben, daß OLPs sowohl aus der Region der MN als

auch der V3-IN stammen. Dabei weisen spätestens bei der weiteren Differenzierung alle OLPs sowohl *Olg2*-, als auch *Nkx2.2*-Expression auf, da diese kombinierte Expression notwendig für die Expression bestimmter PLP-Proteine ist (Fu et al. (2002)).

Nach Auswertung der Ergebnisse scheint es nicht wahrscheinlich, daß die Spezifikation von OLPs im Zebrafisch bereits in der frühen Neurogenese geschieht. Die Überexpression von *shh* bei 50% Epibolie hat auf die Anzahl der *isl1*-positiven pMN keinen Einfluß, auch nicht auf die Expression von *olg2*. Zu einem späteren Zeitpunkt führt die Überexpression von *shh* (bei ca. 10 Somiten) zur Expression von zusätzlichen *olg2*-positiven Zellen. Da *olg2* im Zebrafisch nur pMN und OLPs markiert (Park et al. (2002)), ist es sehr wahrscheinlich, daß die zusätzliche *olg2*-Expression zusätzliche OLPs markiert. Die Vermutung wird gestützt durch die Zunahme an *sox10*-positiven Zellen (Abb.), einem weiteren Marker für OLP. In anderen Vertebraten entstehen die ersten, nachweisbaren OLP im Neuralrohr erst nach der Entwicklung und Spezifizierung eines großen Teils der MN (Spassky et al. (2000)). Hingegen entstehen einige OLPs im ZNS der Maus fast zeitgleich mit anderen Neuronen (Spassky et al. (2000)). Die beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, daß die Spezifikation einiger OLP im Neuralrohr von *Danio rerio* eher vergleichbar mit dem letztgenannten Modell ist, denn sie scheint zum gleichen Zeitraum der Neurogenese wie die Spezifizierung von sMN bei ca. 14h nach Befruchtung zu erfolgen. Damit ist eine direkte positive Regulation der OLP-Differenzierung in Abhängigkeit von Shh auch im Zebrafisch sehr wahrscheinlich und konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden.

Die Vermutung, daß die Expression von *olg2* auch im Zebrafisch durch *Nkx6.1* reguliert werden könnte, wird gestützt von der leichten Reduktion der *olg2*-positiven Zellen in Embryonen, in denen ein MO-vermittelter Funktionsausfall von *Nkx6.1* vorlag (Kap. 3.6.4). Dagegen spricht, daß nach Überexpression von *nkx6.1* durch mRNA-Injektionen kein Effekt auf die *olg2*-Expression festgestellt werden konnte, wobei die Gründe hier wahrscheinlich eher technischer Natur und in der Degradation oder Nicht-Funktionalität der eingesetzten mRNA zu suchen sind (s. auch 4.4.4).

Die Tatsache, daß sowohl *nkx2.2* als auch *olg2* im Neuralrohr stets zusammen exprimiert zu sein scheinen ((Barth and Wilson, 1995; Park et al., 2002, diese Arbeit)) und es daher möglicherweise zu keinem Zeitpunkt eine Region gibt, in der nur *nkx2.2*-Expression vorhanden ist, könnte auch als Hinweis darauf gedeutet werden, daß V₃-IN im Zebrafisch möglicherweise gar nicht existieren.

Untersuchungen mit einem Morpholino-vermitteltem Translationsblock von *nkx2.2*, die bereits begonnen haben, werden die Prozesse bei der OLP-Spezifikation im Zebrafisch sicher weiter erhellen.

4.4.4 Die Spezifikation sekundärer Motorneurone und die Funktionen des Transkriptionsfaktors Nkx6.1 in diesem Prozeß

Der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 im Zebrafisch Die verschiedenen Ergebnisse bei der Untersuchung des Transkriptionsfaktors *nkx6.1* konnten zeigen, daß dieser mit Hinblick auf Sequenz und Funktion ein echtes Ortholog des Zebrafisch zu anderen bekannten Genen dieser Klasse aus anderen Organismen ist. Die Expression von *nkx6.1* ist abhängig vom Hedgehog-Signalweg. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß die Expression dieses Faktors für die Spezifikation von sMN und V₂-IN notwendig ist. Damit scheint es sehr wahrscheinlich, daß die Interpretation eines Shh-Signals zur Ausbildung von sMN und bestimmten IN auch im Zebrafisch die Expression mindestens eines Homöobox-Proteins erfordert.

Die Frage, wie die Entwicklung der MN im Zebrafisch gesteuert wird, ist bereits Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen (s. auch Kap. 1.2.2). Dabei stand bereits früh die Abhängigkeit dieser Zelltypen von einem Hh-Signal, ausgehend von der Mittellinie fest (Krauss et al. (1993); Chandrasekhar et al. (1998); Bingham et al. (2001); Chen et al. (2001); Lewis and Eisen (2001); Varga et al. (2001)). Da der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 in Maus, Huhn und anderen Organismen als eine entscheidende Komponente bei der Spezifikation von MN und V₂-IN identifiziert worden war (s. Kap. 1.5), wurde versucht, ein entsprechendes Zebrafisch-Homolog zu klonieren. Die Proteinsequenz des klonierten Gens zeigt dabei deutliche Ähnlichkeiten zu den Sequenzen anderer Nkx6.1-Proteine (Kap. 2.14 und 5.4). Die Homöodomäne ist dabei mit 82% Ähnlichkeit besonders stark konserviert. Allerdings gaben die – im Vergleich zu den bisher bekannten Proteinen – fehlenden ca. 40 Aminosäuren im ersten Drittel der Proteinsequenz (Anhang 5.3) zunächst zu denken. Vergleiche mit anderen Proteinen aus der Nkx-Klasse, wie Nkx2.1 und Nkx2.2, sowie mit Nkx6.2, konnten jedoch zeigen, daß die größten Ähnlichkeiten der vorhergesagten Proteinsequenz mit den Proteinen aus der Nkx6.1-Familie bestand. Insbesondere die Aminosäuren-Abfolge des amino-terminale Endes unterscheidet sich in dieser Familie deutlich von den Sequenzen der Proteine der anderen Familien. Ein Abgleich mit der Sequenz des von Sarah Cheesman (aus der Arbeitsgruppe von Judith Eisen in Eugene, Oregon) unabhängig ebenfalls klonierten *nkx6.1*-Klons ergab eine völlige Übereinstimmung der Sequenzen beider Klone. Damit scheint es sehr wahrscheinlich, daß die fehlenden Aminosäuren nicht auf Klonierungsfehlern beruhen, sondern in dem gefundenen Nkx6.1-Protein von *Danio rerio* einfach nicht vorhanden zu sein scheinen - im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Vertebraten-Proteinen. Solange jedoch keine Daten über die genomische Sequenz dieses Gens vorliegen, kann ein möglicher Fehler in der Klonierung nicht völlig ausgeschlossen werden. Weitere Bestätigung,

daß das klonierte Gen tatsächlich zur Familie der *nkx6.1*-Gene gehört liefern auch die funktionellen Daten(s.u.).

Zur Beurteilung der Analyse der Funktionen von *nkx6.1* während der neuralen Musterbildung soll zu Beginn auf die Tatsache eingegangen werden, daß durch Überexpression durch mRNA-Injektionen keinerlei Effekt zu erzielen waren. Die Möglichkeit, daß die Probleme hierbei in der Herstellung der mRNA selber lagen, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da beispielsweise Degradation von mRNA ein häufiges Problem bei dieser Art von experimentellem Ansatz ist (C. Takke, pers. Mitteilung; C. König, pers. Mitteilung; S. Hans, pers. Mitteilung; eigene Erfahrungen). Desweiteren kann natürlich die Ursache evt. doch in einem Fehler im genannten cDNA-Klon zu suchen sein. Zu geringe Konzentrationen an injizierter mRNA können ebenfalls ein Problem sein. Da allerdings mit den verwendeten Konzentrationen von 500 ng/ μ l schon in den meisten injizierten Embryonen starke morphologische Deformationen erkennbar waren, konnte diese Konzentration nicht erhöht werden. Generell scheint eine Überexpression von Genen der *nkx*-Familie mittels mRNA im Zebrafisch jedoch oft nicht zu den gewünschten oder erwarteten Effekten zu führen (K. Rohr; pers. Mitteilung).

Untersuchungen zur Abhängigkeit der Genexpression von *nkx6.1* im Zebrafisch vom Hh-Signalweg und die Analyse der Effekte des Funktionsausfalls von Nkx6.1-Protein zeigten allerdings eine ganze Reihe positiver Resultate:

Der Expressionsverlust von *nkx6.1* in Cyclopamin-behandelten Embryonen konnte zeigen, daß Hh-Signale für die Expression dieses Gens notwendig sind (Kap. 3.6.3). Gleichzeitig zeigt die stark ektopische Expression in Embryonen mit misexprimiertem *shh* an, daß Shh selbst ausreichend für die Expression von *nkx6.1* ist. Damit scheint klar, daß *nkx6.1* im Zebrafisch ein direktes Zielgen des Hh-Signalweges ist. Zwar fehlt in *syu*-Mutanten nur ein sehr kleiner Anteil der Expressionsdomäne, während der überwiegende Teil der Expression wildtypisch ist (Abb. 18), aber dies ist eine weitere Bestätigung dafür, daß *nkx6.1* direkt von *sonic hedgehog* aktiviert werden kann. Andererseits zeigt dies auch – unter Berücksichtigung der Resultate der Cyclopamin-Behandlung –, daß *nkx6.1* wahrscheinlich auch noch von anderen Mitgliedern der *hh*-Familie beeinflusst wird. Dabei ist *twhh*, das in der Bodenplatte und im ZNS exprimiert wird (Ekker et al. (1995)) durch die Expression dieses Gens in der Bodenplatte der aussichtsreichste Kandidat. Wie in Kap. 4.4.2 bereits ausgeführt, konnte für Nkx6.1 die Zugehörigkeit zur Klasse II der Homöodömänen-Proteine festgestellt werden. Leider konnte kein entsprechender Interaktionspartner der Klasse I gefunden werden, wobei die Ursachen wahrscheinlich darin zu suchen sind, daß nicht die richtigen homologen Markergene untersucht wurden (4.4.2).

Nkx6.1 und die Spezifikation von sMN und *vsx2*-positiver IN Um den Ausfall der Funktion von Nkx6.1 zu erreichen, wurde ein Antisense-Morpholino (MO-*nkx6.1*) konzipiert und in Embryonen im 1-2 Zell-Stadium injiziert. Die in Kap. 3.6.4 beschriebenen phänotypischen Veränderungen entsprechen dabei in vielen Fällen denen, die von Sander et al. (2000) für die *nkx6.1*^{-/-}-Mutante in der Maus beschrieben worden sind: In Mo-*nkx6.1* injizierten Embryonen wird die Anzahl der *vsx2*-positiven IN drastisch reduziert (Tab. 6), jedoch sind immer noch IN dieses Typs im Neuralrohr zu finden. Dies stimmt mit den Ergebnissen für Maus-Mutante überein. In den injizierten Embryonen ist zudem die Anzahl der sMN reduziert, vor allem aber findet axonale Projektion aus dieser Region nicht mehr statt (Abb. 20b). Dabei sind auch hier noch recht viele zn8-immunoreaktive sMN zu finden. Auch diese Veränderungen stimmen mit den bei Sander et al. (2000) beschriebenen genau überein. Unter Beachtung der in Kapitel 4.4.4 dargelegten Resultate ist es daher wahrscheinlich, wie schon in Kapitel 4.4.3 für die V₂-Region beschrieben, daß auch im Zebrafisch eine Domäne existiert, in der Motorneurone abhängig von Shh-Signal entstehen und das für die Etablierung dieser Domäne der Homöobox-Transkriptionsfaktor Nkx6.1 von entscheidender Bedeutung ist. Aus diesem Grund kann vielleicht auch die Arbeit von Vallstedt et al. (2001) Antworten auf die Frage geben, warum trotz Verlust der Funktion von Nkx6.1 noch immer *vsx2*-positive IN und MN vorhanden sind. In dieser Arbeit stellen die Autoren die Analyse eines zweiten Gens der *nkx6*-Familie, *nkx6.2* vor. Nkx6.2 wird ebenfalls in ventralen Vorläuferzellen exprimiert allerdings im Wildtyp in den Zellen der Regionen V₁ und V₀(s. auch Komuro et al. (1993); Lee et al. (2001)). In *nkx6.1*^{-/-}-Mutante der Maus wird Nkx6.2 hingegen auch in der Region der MN und in V₂ exprimiert. Dies wird begründet mit der Annahme, daß Nkx6.1 im Wildtyp die ventrale Expression von Nkx6.2 reprimiert. Beim Ausfall von Nkx6.1 übernimmt Nkx6.2 jedoch teilweise dessen Funktionen und sorgt damit für die Rettung eines Teils der Nkx6.1-abhängigen neuronalen Subtypen. Die Überprüfung der Doppelmутanten zeigte daher auch eine fast vollständige Reduktion an MN und V₂-IN im Neuralrohr dieser Tiere (Vallstedt et al. (2001)). Die Annahme, daß im Zebrafisch noch ein weiteres Mitglied der *nkx6*-Familie existiert, erscheint daher als nicht unwahrscheinlich. Datenbanksuchen haben zwar bisher kein Ergebnis gebracht, aber die fortschreitende Sequenzierung des Zebrafisch-Genoms läßt weiterhin auf eine mögliche Entdeckung eines solchen Paralogs hoffen.

4.5 Offene Fragen und Ausblicke

In der vorliegenden Arbeit konnten einige neue Funktionen von *shh* während der Musterbildung im Neuralrohr im Zebrafisch aufgedeckt werden. Die Abhängigkeit von V₂-

IN von Shh und dem nachgeschalteten Faktor Nkx6.1 war bisher unbekannt. Auch das Verständnis von *shh*-abhängiger Spezifikation von sMN und OLPs konnte erweitert werden. Es konnten allerdings auch nicht alle Erwartungen erfüllt werden. Dazu gehören die fehlenden Auswirkungen von *shh*-Misexpression auf einige der untersuchten Transkriptionsfaktoren, auf eine Reihe von IN und auf die pMN. Hier müssen noch eine ganze Reihe von Untersuchungen folgen, um ein Bild der Musterbildung im ventralen Neuralrohr von *Danio rerio* zu bekommen, das zunächst zumindest vergleichbar mit den Kenntnisständen über Maus und Huhn wäre.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich natürlich auch neue Fragen, auf einige soll im folgenden kurz eingegangen werden.

4.5.1 Sind alle neuronalen Identitäten im ventralen Neuralrohr des Zebrafisch abhängig von Shh-Signal ?

Die in dieser Arbeit untersuchten Auswirkungen der Misexpression von *shh* haben, wie in Kap. 4.4.3 erläutert, keine Veränderungen auf Lage und Anzahl der Mehrzahl der untersuchten Interneurone ergeben. In weiteren Versuchen müsste daher geklärt werden, ob diese Zelltypen überhaupt abhängig von Hh-Signalen abhängig sind. Dies könnte durch weitere Experimente mit Unterdrückung des Signalwegs durch Cyclopamin geschehen. Dabei könnten auch die oben mehrfach angesprochenen Erkenntnisse über den richtigen Zeitpunkt von Hh-Signalen genutzt werden. Anstatt Embryonen von Beginn der Entwicklung an in Cyclopamin zu inkubieren, könnte dieser Zeitpunkt auch variiert werden. Dadurch könnte nicht nur eine generelle Abhängigkeit von Hh-Signalen sondern auch der Zeitpunkt, zu dem diese wichtig sind, überprüft werden. Auch Misexpression von *shh* in Cyclopamin-behandelten Embryonen mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems sind denkbar. Zur Untersuchung der Bedeutung der Konzentrationen von Hedgehog-Signalen könnte ebenfalls auf Cyclopamin zurückgegriffen werden, vielversprechend wäre auch die Verwendung des in unserer Arbeitsgruppe klonierten *hedgehog interacting proteins* (Kap. 1), einem Kompetitor von Patched, mit der die freie Hh-Signalkonzentration moduliert werden könnte. Auch weitere Experimente unter Verwendung von Morpholinos sind denkbar und haben mit Bezug auf *nkx2.2* bereits begonnen.

4.5.2 Wie redundant sind die Funktionen einzelner Hedgehog-Paraloge während der neuralen Musterbildung ?

In vielen Arbeiten haben sich bereits Hinweise auf die mögliche funktionelle Redundanz v.a. von *shh* und *twhh* ergeben. Eine weitere Analyse der Funktionen dieser Gene *in vi-*

vo ist daher erforderlich. Eine Möglichkeit hierzu ist die Verwendung eines *UAS::twhh*-Aktivators. Ein solches Konstrukt wurde bereits hergestellt, in Zebrafisch-Embryonen injiziert und die Suche nach transgenen Insertionen bereits begonnen (Dr. Takamiya, pers. Mitteilung).

4.5.3 Unterscheiden sich primäre und sekundäre Motorneurone des Zebrafisch auch durch die Expression verschiedener Gene, die für ihre Entwicklung nötig sind?

Die Arbeiten von Park et al. (2002) haben gezeigt, daß *olg2* nur in pMN und OLPs exprimiert wird und daß es zur Spezifikation dieser Zellen notwendig ist. In Kapitel 4.4.4 wurde dargelegt, warum *nkx6.1* wahrscheinlich wichtig für die Entwicklung sMN sein könnte. Zudem wurden in 4.4.3 kurz mögliche Effekte auf die Regulation von *olg2*-Expression durch *Nkx6.1* im Zebrafisch beschrieben. Diese Ergebnisse wirft u.a. folgende Fragen auf:

- Sind die in anderen Vertebraten kombinierten Funktionen von *Olg2* und *Nkx6.1* bei der Entwicklung von MN im Zebrafisch entkoppelt? Ist *Olg2* verantwortlich für die Spezifikation von pMN, *Nkx6.1* hingegen für die Spezifikation von sMN?

Zur Beantwortung dieser Frage müßte zunächst geklärt sein, ob die beiden Funktionen wirklich immer getrennt sind. Beide Gene werden ab ca. 85% Epibolie exprimiert ((Park et al., 2002, diese Arbeit)). Zu diesem Zeitraum steht zwar die Differenzierung von ersten postmitotischen Neuronen kurz bevor, im Falle von *Olg2* reicht dies aber noch, um eine essentielle Funktion in der Entwicklung von pMN wahrzunehmen. Gegen eine Funktion von *Nkx6.1* spricht, daß durch den Morpholino-vermittelten Funktionsausfall kein Effekt auf die pMN erzeugt wurde. Allerdings konnte in den Morpholino-injizierten Embryonen ein leichter Effekt auf die Anzahl der *olg2*-positiven Zellen bei ca. 22 hpf beobachtet werden. Wenn dies aber eine Reduktion der Anzahl der pMN bedeuten würde, dann müßte dieser Effekt auch mit anderen Markern sichtbar sein. Zum einen sind pMN bei 22 hpf längst postmitotisch, exprimieren also auch andere Marker als *olg2* (z.B. *isl1* oder *isl2*). Zum anderen gibt es nur drei bis vier pMN pro spinalem Hemisegment (Eisen et al. (1986); Myers et al. (1986); Eisen et al. (1990); Appel et al. (1995)), ein Verlust dieser Neurone sollte schnell erkennbar sein. Es ist daher wahrscheinlich, daß der Effekt von MO-*nkx6.1*-Injektion auf *olg2*-positive Zellen darauf beruht, daß sich aus der Region der sMN auch OLPs entwickeln (s. auch Kap. 4.4.3). Wenn durch den Verlust von *Nkx6.1*-Funktion die Anzahl von Vorläuferzellen sowohl für sMN und OLP zu einem Teil reduziert wird, wird sich dieses wahrscheinlich auch in der Anzahl der *olg2*-positiven OLP niederschlagen.

Es ist also nicht undenkbar, daß die oben erwähnte Entkoppelung der beiden Genfunktionen von *olg2* und *nkx6.1* während der Entwicklung der MN tatsächlich existiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese, müßte zunächst der Beginn der Expression von *nkx6.1* noch genauer bestimmt werden, vielleicht mit Hilfe von RT-PCR. Auch die Überexpression von *nkx6.1*, entweder durch (funktionell wirksame) mRNA oder mit Hilfe eines *UAS:nkx6.1*-Effektorkonstruktes müßte analysiert werden. Dabei wäre ein bekannter Klasse I-Gegenspieler von Nkx6.1 als Positivkontrolle für die Wirksamkeit der Überexpression natürlich nützlich. Sehr wichtig wäre v.a. die Suche nach mögliche Paralogen zu *nkx6.1*, die die Funktionen dieses Gens während der Entwicklung der pMN übernommen haben könnten (Kap. 4.4.4)

Könnte diese Hypothese bestätigt werden, so wäre dies der erste Beweis dafür, daß pMN und sMN sich nicht einfach nur darin unterscheiden, daß sie zu unterschiedlichen Zeiten differenzieren – ansonsten aber gleichwertig zueinander und zu den MN anderer Vertebraten sind –, sondern daß die zeitliche Trennung auch mit einer Aufspaltung des Expressionsmusters der für die MN-Spezifikation notwendigen Faktoren einherginge.

Sonic Hedgehog ist ein Protein mit vielfältiger Bedeutung für die Entwicklung verschiedenster Organismen. Dabei scheinen einige Funktionen dieses Proteins zwischen den Arten sehr stark konserviert zu sein. Die hier vorgestellten Ergebnisse machen deutlich, daß Sonic Hedgehog auch im Zebrafisch Funktionen in der Musterbildung übernimmt, die nicht nur im Vergleich zu anderen Vertebraten (Bsp.: Musterbildung im ventralen Neuralrohr), sondern auch zu Invertebraten wie *Drosophila* (Bsp.: Zelldifferenzierung in der Retina) stark konserviert zu sein scheinen.

Literatur

- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., Hooper, J. E., 1996. The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86, 221–232.
- Alcedo, J., Zou, Y., Noll, M., 2000. Posttranscriptional regulation of smoothed is part of a self-correcting mechanism in the Hedgehog signaling system. *Mol Cell* 6, 457–465.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Appel, B., Korzh, V., Glasgow, E., Thor, S., Edlund, T., Dawid, I. B., Eisen, J. S., 1995. Motoneuron fate specification revealed by patterned LIM homeobox gene expression in embryonic zebrafish. *Development* 121, 4117–4125.
- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T. M., Sockanathan, S., 1999. Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 23, 659–674.
- Bansal, R., Pfeiffer, S. E., 1992. Novel stage in the oligodendrocyte lineage defined by reactivity of progenitors with R-mAb prior to O1 anti-galactocerebroside. *J Neurosci Res* 32, 309–316.
- Bansal, R., Warrington, A. E., Gard, A. L., Ranscht, B., Pfeiffer, S. E., 1989. Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J Neurosci Res* 24, 548–557.
- Barabino, S. M., Spada, F., Cotelli, F., Boncinelli, E., 1997. Inactivation of the zebrafish homologue of Chx10 by antisense oligonucleotides causes eye malformations similar to the ocular retardation phenotype. *Mech Dev* 63, 133–143.
- Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., Wilson, S. W., 1999. Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* 126, 4977–4987.
- Barth, K. A., Wilson, S. W., 1995. Expression of zebrafish nk2.2 is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. *Development* 121, 1755–1768.

- Bauer, H., Lele, Z., Rauch, G. J., Geisler, R., Hammerschmidt, M., 2001. The type I serine/threonine kinase receptor Alk8/Lost-a-fin is required for Bmp2b/7 signal transduction during dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 128, 849–858.
- Bayer, T. A., Campos-Ortega, J. A., 1992. A transgene containing lacZ is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. *Development* 115, 421–426.
- Beattie, C. E., Hatta, K., Halpern, M. E., Liu, H., Eisen, J. S., Kimmel, C. B., 1997. Temporal separation in the specification of primary and secondary motoneurons in zebrafish. *Dev Biol* 187, 171–182.
- Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., Traverso, G., Siegel-Bartelt, J., Frumkin, A., Mitchell, H. F., Donis-Keller, H., Helms, C., Hing, A. V., Heng, H. H., Koop, B., Martindale, D., Rommens, J. M., Tsui, L. C., Scherer, S. W., 1996. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14, 353–356.
- Bernhardt, R. R., Chitnis, A. B., Lindamer, L., Kuwada, J. Y., 1990. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 302, 603–616.
- Bernhardt, R. R., Nguyen, N., Kuwada, J. Y., 1992. Growth cone guidance by floor plate cells in the spinal cord of zebrafish embryos. *Neuron* 8, 869–882.
- Bingham, S., Nasevicius, A., Ekker, S. C., Chandrasekhar, A., 2001. *Sonic hedgehog* and *tiggy-winkle hedgehog* cooperatively induce zebrafish branchiomotor neurons. *Genesis* 30, 170–174.
- Birnboim, H. C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513–1523.
- Borday, V., Thaeron, C., Avaron, F., Brulfert, A., Casane, D., Laurenti, P., Geraudie, J., 2001. *evx1* transcription in bony fin rays segment boundaries leads to a reiterated pattern during zebrafish fin development and regeneration. *Dev Dyn* 220, 91–98.
- Borycki, A. G., Mendham, L., Emerson Jr, C. P., 1998. Control of somite patterning by Sonic hedgehog and its downstream signal response genes. *Development* 125, 777–790.
- Brand, A. H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.

- Brand, M., Heisenberg, C. P., Warga, R. M., Pelegri, F., Karlstrom, R. O., Beuchle, D., Picker, A., Jiang, Y. J., Furutani-Seiki, M., van Eeden, F. J., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., Nüsslein-Volhard, C., 1996. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development* 123, 129–142.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M., Struhl, G., 2001. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7, 1279–1291.
- Briscoe, J., Ericson, J., 2001. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11, 43–49.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., Ericson, J., 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435–445.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L., Ericson, J., 1999. Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398, 622–627.
- Bumcrot, D. A., McMahon, A. P., 1995. Somite differentiation. Sonic signals somites. *Curr Biol* 5, 612–614.
- Burrill, J. D., Moran, L., Goulding, M. D., Saueressig, H., 1997. PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+ interneurons that require PAX6 for their development. *Development* 124, 4493–4503.
- Caldovic, L., Agalliu, D., Hackett, P. B., 1999. Position-independent expression of transgenes in zebrafish. *Transgenic Res* 8, 321–334.
- Caldovic, L., Hackett Jr, P. B., 1995. Development of position-independent expression vectors and their transfer into transgenic fish. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4, 51–61.
- Carnow, T. B., Carson, J. H., Brostoff, S. W., Hogan, E. L., 1984. Myelin basic protein gene expression in quaking, jimpy, and myelin synthesis-deficient mice. *Dev Biol* 106, 38–44.
- Chandrasekhar, A., Warren Jr, J. T., Takahashi, K., Schauerte, H. E., van Eeden, F. J., Haffter, P., Kuwada, J. Y., 1998. Role of *sonic hedgehog* in branchiomotor neuron induction in zebrafish. *Mech Dev* 76, 101–115.

- Chen, W., Burgess, S., Hopkins, N., 2001. Analysis of the zebrafish *smoothened* mutant reveals conserved and divergent functions of hedgehog activity. *Development* 128, 2385–2396.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., Beachy, P. A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., Kintner, C., 1995. Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* 375, 761–766.
- Concordet, J. P., Lewis, K. E., Moore, J. W., Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Scott, M. P., Ingham, P. W., 1996. Spatial regulation of a zebrafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase A in neural tube and somite patterning. *Development* 122, 2835–2846.
- Cornell, R. A., Eisen, J. S., 2000. Delta signaling mediates segregation of neural crest and spinal sensory neurons from zebrafish lateral neural plate. *Development* 127, 2873–2882.
- Culp, P., Nüsslein-Volhard, C., Hopkins, N., 1991. High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7953–7957.
- Currie, P. D., Ingham, P. W., 1996. Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature* 382, 452–455.
- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., Cohen, S. M., 2000. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521–531.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., Boggs, C., 1996. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37–46.
- Dutton, K., Dutton, J. R., Pauliny, A., Kelsh, R. N., 2001a. A morpholino phenocopy of the colourless mutant. *Genesis* 30, 188–189.

- Dutton, K. A., Pauliny, A., Lopes, S. S., Elworthy, S., Carney, T. J., Rauch, J., Geisler, R., Haffter, P., Kelsh, R. N., 2001b. Zebrafish colourless encodes *sox10* and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* 128, 4113–4125.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., McMahon, A. P., 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417–1430.
- Eisen, J. S., Myers, P. Z., Westerfield, M., 1986. Pathway selection by growth cones of identified motoneurons in live zebra fish embryos. *Nature* 320, 269–271.
- Eisen, J. S., Pike, S. H., Romancier, B., 1990. An identified motoneuron with variable fates in embryonic zebrafish. *J Neurosci* 10, 34–43.
- Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T., Beachy, P. A., 1995. Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol* 5, 944–955.
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., Jessell, T. M., 1997a. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 451–466.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., Jessell, T. M., 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661–673.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M., Briscoe, J., 1997b. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90, 169–180.
- Fashena, D., Westerfield, M., 1999. Secondary motoneuron axons localize DM-GRASP on their fasciculated segments. *J. Comp. Neurology* 406, 415–424.
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., Ptashne, M., 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332, 853–856.
- Fjose, A., Izpisua-Belmonte, J. C., Fromental-Ramain, C., Duboule, D., 1994. Expression of the zebrafish gene *hlx-1* in the prechordal plate and during CNS development. *Development* 120, 71–81.

- Fu, H., Qi, Y., Tan, M., Cai, J., Takebayashi, H., Nakafuku, M., Richardson, W., Qiu, M., 2002. Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129, 681–693.
- Gailani, M. R., Stahle-Backdahl, M., Leffell, D. J., Glynn, M., Zaphiropoulos, P. G., Pressman, C., Uden, A. B., Dean, M., Brash, D. E., Bale, A. E., Toftgard, R., 1996. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet* 14, 78–81.
- Gilbert, S. F., 1997. *Developmental Biology*, Fifth Ed. , 566–569.
- Gill, G., Ptashne, M., 1987. Mutants of GAL4 protein altered in an activation function. *Cell* 51, 121–126.
- Giniger, E., Varnum, S. M., Ptashne, M., 1985. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767–774.
- Goetz, J. A., Suber, L. M., Zeng, X., Robbins, D. J., 2002. Sonic Hedgehog as a mediator of long-range signaling. *Bioessays* 24, 157–165.
- Goodrich, L. V., Jung, D., Higgins, K. M., Scott, M. P., 1999. Overexpression of *ptc1* inhibits induction of Shh target genes and prevents normal patterning in the neural tube. *Dev Biol* 211, 323–334.
- Gorlin, R., 1997. Advances in cardiology: the complementary roles of concept and technology. *J Interv Card Electrophysiol* 1, 317–326.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Thomson, C., Vouyiouklis, D., Nave, K. A., 1998. Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech* 41, 344–358.
- Guarente, L., Yocum, R. R., Gifford, P., 1982. A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7410–7414.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., Nüsslein-Volhard, C., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1–36.

- Hahn, H., Christiansen, J., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Chidambaram, A., Gerrard, B., Vorechovsky, I., Bale, A. E., Toftgard, R., Dean, M., Wainwright, B., 1996. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* 271, 12125–12128.
- Halloran, M. C., Sato-Maeda, M., Warren, J. T., Su, F., Lele, Z., Krone, P. H., Kuwada, J. Y., Shoji, W., 2000. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* 127, 1953–1960.
- Halpern, M. E., Hatta, K., Amacher, S. L., Talbot, W. S., Yan, Y.-L., Thisse, B., Thisse, C., Postlethwait, J. H., Kimmel, C. B., 1997. Genetic interactions in zebrafish midline development. *Dev Biol* 187, 154–170.
- Hammerschmidt, M., Brook, A., McMahon, A. P., 1997. The world according to *hedgehog*. *Trends Genet* 13, 14–21.
- Hammerschmidt, M., McMahon, A. P., 1998. The effect of pertussis toxin on zebrafish development: a possible role for inhibitory G-proteins in hedgehog signaling. *Dev Biol* 194, 166–171.
- Hanahan, D., 1985. Techniques for transformation in *Escherichia coli*. *DNA Cloning, a practical approach I*, 109–135.
- Hans, S., 2001. Eine Charakterisierung cis-regulatorischer Elemente des Zebrafisch deltaD Gens. Ph.D. thesis, Universität zu Köln.
- Hartley, K. O., Nutt, S. L., Amaya, E., 2002. Targeted gene expression in transgenic *Xenopus* using the binary Gal4-UAS system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1377–1382.
- Harvey, R. P., Melton, D. A., 1988. Microinjection of synthetic Xhox-1A homeobox mRNA disrupts somite formation in developing *Xenopus* embryos. *Cell* 53, 687–697.
- Hatta, K., Bremiller, R., Westerfield, M., Kimmel, C. B., 1991. Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development* 112, 821–832.
- Heemskerk, J., DiNardo, S., 1994. *Drosophila* hedgehog acts as a morphogen in cellular patterning. *Cell* 76, 449–460.
- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., Eguchi, G., 1997. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev Biol* 192, 289–299.

- Hoffman, L., Miles, J., Avaron, F., Laforest, L., Akimenko, M. A., 2002. Exogenous retinoic acid induces a stage-specific, transient and progressive extension of Sonic hedgehog expression across the pectoral fin bud of zebrafish. *Int J Dev Biol* 46, 949–956.
- Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W., Ellis, H. M., 1983. Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2, 453–463.
- Hynes, M., Poulsen, K., Tessier-Lavigne, M., Rosenthal, A., 1995. Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell* 80, 95–101.
- Hynes, M., Ye, W., Wang, K., Stone, D., Murone, M., Sauvage, F., Rosenthal, A., 2000. The seven-transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat Neurosci* 3, 41–46.
- Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P., Roelink, H., 1998. The teratogenic *Veratrum* alkaloid cyclopamine inhibits Sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553–3562.
- Incardona, J. P., Gruenberg, J., Roelink, H., 2002. Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr Biol* 12, 983–995.
- Ingham, P. W., 2001. Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science* 294, 1879–1881.
- Innis, M. A., Gelfhard, D. H., Snineky, J. J., White, T. J., 1990. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. .
- Inoue, A., Takahashi, M., Hatta, K., Hotta, Y., Okamoto, H., 1994. Developmental regulation of islet-1 mRNA expression during neuronal differentiation in embryonic zebrafish. *Dev Dyn* 199, 1–11.
- Jensen, J., Serup, P., Karlsen, C., Nielsen, T. F., 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, 18749–18758.
- Kakidani, H., Ptashne, M., 1988. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* 52, 161–167.
- Karlstrom, R. O., Talbot, W. S., Schier, A. F., 1999. Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target *gli2* affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev* 13, 388–393.

- Karlstrom, R. O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A. D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S. U., Muller, B. K., Richter, S., van Eeden, F. J., Nüsslein-Volhard, C., Bonhoeffer, F., 1996. Zebrafish mutations affecting retino-tectal axon pathfinding. *Development* 123, 427–438.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253–310.
- Kimmel, C. B., Warga, R. M., Kane, D. A., 1994. Cell cycles and clonal strings during formation of the zebrafish central nervous system. *Development* 120, 265–276.
- Kimmel, C. B., Westerfield, M., 1991. Cell-cell interactions in early development in 'Primary neurons of the zebrafish', Wiley-Liss, New York. Primary neurons of the zebrafish, 566–569.
- Kimonis, V. E., Goldstein, A. M., Pastakia, B., Yang, M. L., Kase, R., DiGiovanna, J. J., Bale, A. E., Bale, S. J., 1997. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 69, 299–308.
- Kintner, C., 1988. Effects of altered expression of the neural cell adhesion molecule, N-CAM, on early neural development in *Xenopus* embryos. *Neuron* 1, 545–555.
- Komuro, I., Schalling, M., Jahn, L., Bodmer, R., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Izumo, S., 1993. Gtx: a novel murine homeobox-containing gene, expressed specifically in glial 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.
- Krauss, S., Concordet, J. P., Ingham, P. W., 1993. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431–1444.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V., Fjose, A., 1991. Expression pattern of zebrafish *pax* genes suggests a role in early brain regionalization. *Nature* 353, 267–270.
- Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A., Weinstein, B. M., 2001. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128, 3675–3683.
- Le Douarin, N. M., Halpern, M. E., 2000. Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* 10, 23–30.

- Lee, S. H., Davison, J. A., Vidal, S. M., Belouchi, A., 2001. Cloning, expression and chromosomal location of NKX6B TO 10Q26, a region frequently deleted in brain tumors. *Mamm Genome* 12, 157–162.
- Lewis, K. E., Concordet, J. P., Ingham, P. W., 1999. Characterisation of a second patched gene in the zebrafish *Danio rerio* and the differential response of *patched* genes to Hedgehog signalling. *Dev Biol* 208, 14–29.
- Lewis, K. E., Eisen, J. S., 2001. Hedgehog signaling is required for primary motoneuron induction in zebrafish. *Development* 128, 3485–3495.
- Liem Jr, K. F., Jessell, T. M., Briscoe, J., 2000. Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127, 4855–4866.
- Lin, S., Long, W., Chen, J., Hopkins, N., 1992. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4519–4523.
- Lin, S., Yang, S., Hopkins, N., 1994. lacZ expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev Biol* 161, 77–83.
- Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., Wilson, S. W., 1995. Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121, 3267–3278.
- Mangold, O., 1933. Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der neurula von Urodelen. *Naturwissenschaften* 21, 761–766.
- Marcelle, C., Ahlgren, S., Bronner-Fraser, M., 1999. In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by Sonic Hedgehog. *Dev Biol* 214, 277–287.
- Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., Tabin, C. J., 1996. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384, 176–179.
- Marigo, V., Tabin, C. J., 1996. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9346–9351.
- Marti, E., Bovolenta, P., 2002. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 25, 89–96.

- 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, 2537–2547.
- Martin, V., Carrillo, G., Torroja, C., Guerrero, I., 2001. The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol* 11, 601–607.
- Mohler, J., Vani, K., 1992. Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115, 957–971.
- Muhr, J., Andersson, E., Persson, M., Jessell, T. M., Ericson, J., 2001. Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 104, 861–873.
- Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., Nüsslein-Volhard, C., 1994. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol* 4, 189–202.
- Mullis, K. B., 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48, 579–582.
- Murone, M., Rosenthal, A., de Sauvage, F. J., 1999. Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol* 9, 76–84.
- Myers, P. Z., Eisen, J. S., Westerfield, M., 1986. Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J Neurosci* 6, 2278–2289.
- Neumann, C. J., Nüsslein-Volhard, C., 2000. Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289, 2137–2139.
- Nguyen, V. H., Trout, J., Connors, S. A., Andermann, P., Weinberg, E., Mullins, M. C., 2000. Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal cord are established by a BMP signaling pathway. *Development* 127, 1209–1220.
- Nieuwkoop, P. D., 1973. The organisation center of the amphibian embryo: Its origin, spatial organisation and morphogenetic action. *Adv Morphogen* 10, 1–39.
- Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J. P., Krauss, S., Johansen, T., 1998. Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev* 77, 185–196.

- Novakovic, B., Goldstein, A. M., Wexler, L. H., Tucker, M. A., 1994. Increased risk of neuroectodermal tumors and stomach cancer in relatives of patients with Ewing's sarcoma family of tumors. *J Natl Cancer Inst* 86, 1702–1706.
- Novitch, B. G., Chen, A. I., Jessell, T. M., 2001. Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* 31, 773–789.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801.
- Odenthal, J., van Eeden, F. J., Haffter, P., Ingham, P. W., Nüsslein-Volhard, C., 2000. Two distinct cell populations in the floor plate of the zebrafish are induced by different pathways. *Dev Biol* 219, 350–363.
- Ono, K., Bansal, R., Payne, J., Rutishauser, U., Miller, R. H., 1995. Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. *Development* 121, 1743–1754.
- Ono, K., Fujisawa, H., Hirano, S., Norita, M., Tsumori, T., Yasui, Y., 1997. Early development of the oligodendrocyte in the embryonic chick metencephalon. *J Neurosci Res* 48, 212–225.
- Ornitz, D. M., Moreadith, R. W., Leder, P., 1991. Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 698–702.
- Papan, C., Campos-Ortega, J. A., 1994. On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. *Roux's Arch Dev Biol* 203, 178–186.
- Park, H., Mehta, A., Richardson, J., Appel, B., 2002. *olig2* Is Required for Zebrafish Primary Motor Neuron and Oligodendrocyte Development. *Dev Biol* 248, 356.
- Passini, M. A., Kurtzman, A. L., Canger, A. K., Asch, W. S., Wray, G. A., Raymond, P. A., Schechter, N., 1998. Cloning of zebrafish *vsx1*: expression of a paired-like homeobox gene during CNS development. *Dev Genet* 23, 128–141.
- Passini, M. A., Levine, E. M., Canger, A. K., Raymond, P. A., Schechter, N., 1997. *Vsx-1* and *Vsx-2*: differential expression of two paired-like homeobox genes during zebrafish and goldfish retinogenesis. *J Comp Neurol* 388, 495–505.

- Patil, J. G., Wong, V., Khoo, H. W., 1994. Assessment of pMTL construct for detection in vivo of luciferase expression and fate of the transgene in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Zoolog Sci* 11, 63–68.
- Patten, I., Placzek, M., 2000. The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci* 57, 1695–1708.
- Peringa, J., Fung, K. M., Muragaki, Y., Trojanowski, J. Q., 1995. The cellular and molecular biology of medulloblastoma. *Curr Opin Neurol* 8, 437–440.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., Jessell, T. M., 1999. A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97, 903–915.
- Pierani, A., Moran-Rivard, L., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Goulding, M., Jessell, T. M., 2001. Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein *Dbx1*. *Neuron* 29, 367–384.
- Pike, S. H., Melancon, E. F., Eisen, J. S., 1992. Pathfinding by zebrafish motoneurons in the absence of normal pioneer axons. *Development* 114, 825–831.
- Placzek, M., 1995. The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr Opin Genet Dev* 5, 499–506.
- Placzek, M., Dodd, J., Jessell, T. M., 2000. Discussion point. The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobiol* 10, 15–22.
- Placzek, M., Jessell, T. M., Dodd, J., 1993. Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development* 117, 205–218.
- Placzek, M., Yamada, T., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T., Dodd, J., 1991. Control of dorsoventral pattern in vertebrate neural development: induction and polarizing properties of the floor plate. *Development Suppl* 2, 105–122.
- Qiu, M., Shimamura, K., Sussel, L., Chen, S., Rubenstein, J. L., 1998. Control of antero-posterior and dorsoventral domains of *Nkx-6.1* gene expression relative to other *Nkx* genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev* 72, 77–88.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., et al., 1994. Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761–775.

- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S. W., Tsui, L. C., Muenke, M., 1996. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14, 357–360.
- Rorke, L. B., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Zimmerman, R. A., Sutton, L. N., Biegel, J. A., Goldwein, J. W., Packer, R. J., 1997. Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Brain Pathol* 7, 765–784.
- Rowitch, D. H., Lu, Q. R., Kessar, N., Richardson, W. D., 2002. An 'oligarchy' rules neural development. *Trends Neurosci* 25, 417–422.
- Roy, M. N., Prince, V. E., Ho, R. K., 1999. Heat shock produces periodic somitic disturbances in the zebrafish embryo. *Mech Dev* 85, 27–34.
- Rudnick, A., Ling, T. Y., Odagiri, H., Rutter, W. J., German, M. S., 1994. Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12203–12207.
- Sander, M., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., Berber, E., German, M., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L., 2000. Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev* 14, 2134–2139.
- Schauerte, H. E., van Eeden, F. J., Fricke, C., Odenthal, J., Strähle, U., Haffter, P., 1998. Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* 125, 2983–2993.
- Scheer, N., 2000. Die GAL4/UAS-Methode zur gezielten Genexpression: eine kritische Betrachtung ihrer funktionellen Anwendung beim Zebrafisch, *Danio rerio*. Ph.D. thesis, Universität zu Köln.
- Scheer, N., Campos-Ortega, J. A., 1999. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev* 80, 153–158.
- Scheer, N., Groth, A., Hans, S., Campos-Ortega, J. A., 2001. An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development* 128, 1099–1107.
- Scheer, N., Riedl, I., Warren, J. T., Kuwada, J. Y., Campos-Ortega, J. A., 2002. A quantitative analysis of the kinetics of Gal4 activator and effector gene expression in the zebrafish. *Mech Dev* 112, 9–14.
- Schmitz, B., 1991. Morphologische Untersuchungen zur Gastrulation und Neurulation des Zebrafisches, *Brachydanio rerio*. Ph.D. thesis, Universität zu Köln.

- Schmitz, B., Papan, C., Campos-Ortega, J. A., 1993. Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Roux's Arch Dev Biol* 202, 250–259.
- Seo, H. C., Nilsen, F., Fjose, A., 1999. Three structurally and functionally conserved Hlx genes in zebrafish. *Biochim Biophys Acta* 1489, 323–335.
- Seo, H. C., Saetre, B. O., Havik, B., Ellingsen, S., Fjose, A., 1998. The zebrafish Pax3 and Pax7 homologues are highly conserved, encode multiple isoforms and show dynamic segment-like expression in the developing brain. *Mech Dev* 70, 49–63.
- Serluca, F. C., Fishman, M. C., 2001. Pre-pattern in the pronephric kidney field of zebrafish. *Development* 128, 2233–2241.
- Sommer, I., Schachner, M., 1981. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83, 311–327.
- Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B., Thomas, J. L., 1998. Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* 18, 8331–8343.
- Spassky, N., Olivier, C., Perez-Villegas, E., Goujet-Zalc, C., Martinez, S., Thomas, J., Zalc, B., 2000. Single or multiple oligodendroglial lineages: a controversy. *Glia* 29, 143–148.
- Spemann, H., 1918. Neue Arbeiten über organisatoren in der tierischen Entwicklung. *Naturwissenschaften* 15, 946–651.
- Spemann, H., Mangold, H., 1924. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1924. *Foundations of Experimental Embryology* 45, 144–184.
- Stark, D. R., 2002. Hedgehog signalling: pulling apart patched and smoothed. *Curr Biol* 12, R437–9.
- Strähle, U., Blader, P., Ingham, P. W., 1996. Expression of axial and sonic hedgehog in wildtype and midline defective zebrafish embryos. *Int J Dev Biol* 40, 929–940.
- Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A. M., Ingham, P. W., 2001. Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol* 11, 608–613.

- Stuart, G. W., McMurray, J. V., Westerfield, M., 1988. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103, 403–412.
- Stuart, G. W., Vielkind, J. R., McMurray, J. V., Westerfield, M., 1990. Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development* 109, 577–584.
- Sulston, J. E., Horvitz, H. R., 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110–156.
- Sulston, J. E., Horvitz, H. R., 1981. Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 82, 41–55.
- Sun, T., Echelard, Y., Lu, R., Yuk, D. I., Kaing, S., Stiles, C. D., Rowitch, D. H., 2001. Olig bHLH proteins interact with homeodomain proteins to regulate cell fate acquisition in progenitors of the ventral neural tube. *Curr Biol* 11, 1413–1420.
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D. J., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Rubenstein, J. L., German, M. S., 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125, 2213–2221.
- Taipale, J., Chen, J. K., Cooper, M. K., Wang, B., Mann, R. K., Milenkovic, L., Scott, M. P., Beachy, P. A., 2000. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406, 1005–1009.
- Tajbakhsh, S., Cossu, G., 1997. Establishing myogenic identity during somitogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 7, 634–641.
- Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Yoshida, S., Chisaka, O., Ikenaka, K., Nabeshima, Y., 2002. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 12, 1157–1163.
- Tan, J. T., Korzh, V., Gong, Z., 1999. Expression of a zebrafish iroquois homeobox gene, Ziro3, in the midline axial structures and central nervous system. *Mech Dev* 87, 165–168.
- Tanabe, Y., Roelink, H., Jessell, T. M., 1995. Induction of motor neurons by Sonic hedgehog is independent of floor plate differentiation. *Curr Biol* 5, 651–658.

- Tanabe, Y., William, C., Jessell, T. M., 1998. Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 95, 67–80.
- Thaeron, C., Avaron, F., Casane, D., Borday, V., Thisse, B., Thisse, C., Boulekbache, H., Laurenti, P., 2000. Zebrafish *evx1* is dynamically expressed during embryogenesis in subsets of interneurons, posterior gut and urogenital system. *Mech Dev* 99, 167–172.
- Timmer, J. R., Wang, C., Niswander, L., 2002. BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development* 129, 2459–2472.
- Tokumoto, M., Gong, Z., Tsubokawa, T., Hew, C. L., Uyemura, K., Hotta, Y., Okamoto, H., 1995. Molecular heterogeneity among primary motoneurons and within myotomes revealed by the differential mRNA expression of novel islet-1 homologs in embryonic zebrafish. *Dev Biol* 171, 578–589.
- Trevarrow, B., Marks, D. L., Kimmel, C. B., 1990. Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* 4, 669–679.
- Turner, D. L., Weintraub, H., 1994. Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8, 1434–1447.
- Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., Jessell, T. M., Ericson, J., 2001. Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to *Nkx6* genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron* 31, 743–755.
- van den Heuvel, M., Ingham, P. W., 1996. *smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for *hedgehog* signalling. *Nature* 382, 547–551.
- van Eeden, F. J., Granato, M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hamerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., Warga, R. M., Allende, M. L., Weinberg, E. S., Nüsslein-Volhard, C., 1996. Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 153–164.
- van Straaten, H. W., Hekking, J. W., Wiertz-Hoessels, E. J., Thors, F., Drukker, J., 1988. Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)* 177, 317–324.

- Varga, Z. M., Amores, A., Lewis, K. E., Yan, Y. L., Postlethwait, J. H., Eisen, J. S., Westerfield, M., 2001. Zebrafish *smoothened* functions in ventral neural tube specification and axon tract formation. *Development* 128, 3497–3509.
- Wen, H. J., Wang, Y., Chen, S. H., Hu, C. H., 2002. Expression pattern of the single-minded gene in zebrafish embryos. *Mech Dev* 110, 231–235.
- Westerfield, M., 1995. *The Zebrafish Book*, Third Ed. University of Oregon Press, Eugene, OR.
- Westerfield, M., McMurray, J. V., Eisen, J. S., 1986. Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish. *J. Neuroscience* 6, 2267–2277.
- Wijgerde, M., McMahon, J. A., Rule, M., McMahon, A. P., 2002. A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev* 16, 2849–2864.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C. W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein Jr, E. H., de Sauvage, F. J., 1998. Activating *Smoothened* mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90–92.
- Yamada, T., Pfaff, S. L., Edlund, T., Jessell, T. M., 1993. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* 73, 673–686.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., Jessell, T. M., 1991. Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635–647.
- Yamamura, T., Konola, J. T., Wekerle, H., Lees, M. B., 1991. Monoclonal antibodies against myelin proteolipid protein: identification and characterization of two major determinants. *J Neurochem* 57, 1671–1680.
- Zhou, Q., Choi, G., Anderson, D. J., 2001. The bHLH transcription factor *Olig2* promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with *Nkx2.2*. *Neuron* 31, 791–807.

5 Anhang

5.1 Sequenz EST fd24e09.y1

```

1 CTCCCAGATC TTCATGTGAA CTACCCAGAA AGACTCTCTT TTTATTTATA
51 GATTTCAAAA AACTCTTTT T GAAAGGACGA CGCTCTGTG TAT CATGCAA
101 GATCTAAAAG AACAGAATGG ATATTGGCCA GAGGAGATGA GTATGAAGCT
151 CCAGTACAAC TGATTGGGAT TTTTTTAGAG AAATTACTTT TTTGGCTCCA
201 TATCGCAAGG TGTCTTTTGT TTATTTTTTCG TTTCTCCTCT TCATTTAGTA
251 TTCTGCGTTT GTTTTCACGT TTTCCGGGT CACTGTCCTG CTTCTTGCGC
301 GATATTTAGT TAAAGTTGTA GTTTGTGTCT TGGTTATGTT AGCGGTGGGG
351 CAAATGGACG GGTCTCGCCA AAGCGCTTTC CTAICTAATA CCCACCTTT
401 AGCTGCTTTA CACAGTATGA CCGAGATGAA GACGCCGCTT TACCCAGCCT
451 ACCCGTTATC TTCCACTGGA CCAGCATCC CCACTTCACC GACAGCTACC
501 TCTCCGAATC CAGGTGGGAT CCCGGTCTCG TCC

```

Die Lage der Primer EST_fw und EST_rev ist durch Rot, bzw. Grün markiert.

5.2 cDNA-Sequenz *nkx6.1*

```

1 CTAAAAGAAC AGAATGGATA TTGGCCAGAG GAGATGAGTA TGAAGCTCCA
51 GTACAACTGA TTGGGATTTT TTTAGAGAAA TTACTTTTTT GGCTCCATAT
101 CGCAAGGTGT CTTTTGTTTA TTTTTCGTTT CTCCTCTTCA TTTAGTATTC
151 TGCGTTTGTT TTCACGTTTT CCCGGGTCAC TGTCTGCTT CTTGCGCGAT
201 ATTTAGTTAA AGTTGTAGTT TGTGTCTTGG TTATGTTAGC GGTGGGGCAA
251 ATGGACGGGT CTCGCCAAAG CGCTTTCCTA CTCAATACCC CACCTTTAGC
301 TGCTTTACAC AGTATGACCG AGATGAAGAC GCCGCTTTAC CCAGCCTACC
351 CGTTATCTTC CACTGGACCA GCATCCTCCA CTTACCCGAC AGCTACCTCT
401 CCGAATCCAG GTGGGATCCC GGTCTCGTCC CCGGGGATCA AAACCTCCAG
451 TGGACTTTCA GCTCTCGCAT CAGCCCAGCA GTGCGCGATC GCCACACCTC
501 ACGGAATAAA CGACATCCTC AGCCGACCCT CGGTGGCTTG TTCTCCCGCA
551 GGAATCTTGT CTGGACTGCC CCGTTTCAGC AGCCTGAGTC CCCACCGCC
601 TCCAGGGCTT TATTTAGCC CTAGTGCCGC GGGCTGTAGC GGTGGCTCGC
651 TATCCCAAAC CCCTGACAGA GCTTCCCGGC AGAACCCCGA TATTCTGGCC
701 TGGAGTTATG CAAAGCCCAC ACTGGAGAGA TGCCAGATTT GCGTGCTCAC
751 CACATCAAAA CTCAGTCTG CTCGACAAAG ATGGGAAAAG GAAACACACG
801 CGACCGACGT TTTCCGGGCA GCAAAATTTG CACIGGAAAA AACATTTGAG
851 CAAACGAAAT ATTTAGCCGG CCCTGAAAGA GCCCGACTAG CCTACTCTTT
901 AGGAATGACA GAGAGTCAAG TCAAGGTGTG GTTTCAAAAAC CGAAGAACAA
951 AATGGAGAAA ACGGCAGCG GCTGAAATGG CCTCGGCGAA GAAAAACAA
1001 GATTCAGAAA CCGAGAGGCT GAAAGGAGCT TCGGAAAATG AAGACGACGA
1051 CGACGACTAC AATAAACCTT TAGACCCAAA CTCGGACGAT GAAAAAATTA
1101 CACAGTTACT GAAAAACAC AAACCGAACA CAGCTCTTAT CATTACGCG
1151 TCGGAAAACG AGAGCTCGTA AAAAGGAAAC GGGAAATGGG TTGTCAGATT
1201 CTTCAAGAAG TGTCAAATTT AATATAGGCT ACTTTTCCCC CACCAAGTTT
1251 GAGCTCTGGT TTGAGAGGAA GGATGCAGAT CAGAGGAATA TGCACTATTG
1301 GTGGAACCTGA ACGTACATCA GTGTCTGCTA TAGACACGTT TCAACATAAA

```

1351 GACAACGGTA CTTTTTGTGA AATTAACAGC GTGAGTTGTA T

Die Lagen von Translationsstart und -stop sind in Gelb, die der Homöobox in Grün und die des Morpholinos in Rot markiert.

5.3 Aminosäuren-Sequenz von Nkx6.1

```
1 MLAVGQMDGS XQSAFLLNTP PLAALHSMTE MKTPLYPAYP LSSTGPASST
51 SPTATSPNPG GIPVSSPGIK TSSGLSALAS AQQCAIATPH GINDILSRPS
101 VAXSPAGILS GLPRFSSLSP PPPPGLYFSP SAAGCSGGSL SQTPDRASRQ
151 NPDILAWSYA KPTLERCQIC VLTTSKLSSA RQRWEKETHA T DVFRAANFA
201 LEKTFEQTKY LAGPEXARLA YSLGMTESQV KVWFQNRRTK WRXRHAAB MA
251 SAKKKQDSET ERLKGASENE DDDDDYNKPL DPNSDDEKIT QLLKKHKPNT
301 ALIIHASENE SS*
```

Die Lage der Homöodomäne ist durch Grün markiert.

5.4 Alignment von Nkx6.1-Proteinen

```

1 50
Maus_Nkx6.1 MLAVGAMEGP RQSAFLLSSP PLAALHSMAE MKTPLYPAAY PPLPTGPPSS
Rat_Nkx6.1 MLAVGAMEGP RQSAFLLSSP PLAALHSMAE MKTPLYPAAY PPLPTGPPSS
Mesau_Nkx6.1 MLAVGAMEGP RQSAFLLSSP PLAALHSMAE MKTPLYPATY PPLPTGPP.S
Homo_Nkx6.1 MLAVGAMEGT RQSAFLLSSP PLAALHSMAE MKTPLYPAAY PPLPAGPPSS
Danio_Nkx6.1 MLAVGQMDGS CQSAFLLNTP PLAALHSMTE MKTPLYPA.Y PLSSTGPASS

51 100
Maus_Nkx6.1 SSSSSSSSSP SPPLGSHNPG GLKPPAAGGL SSLGSPQQQL SAATPHGIND
Rat_Nkx6.1 SSSSSSSSSP SPPLGAHNPG GLKPPAAGGL SSLGSPQQQL SAATPHGIND
Mesau_Nkx6.1 SSSSSSSSSP SPPLGAHNPG GLKPPAAGGL SSLSSPPQQQL SAATPHGIND
Homo_Nkx6.1 SSSSSSSSSP SPPLGTHNPG GLKPPATGGL SSLGSPQQQL SAATPHGINN
Danio_Nkx6.1 TSPTATSPNP G.GIPVSSP.GTK..TSSGL SALAS.AQQC AIATPHGIND

101 150
Maus_Nkx6.1 ILSRPSMPVA SGAALPSASP SGSSSSSSSS ASATSASAAA AAAAAAAAAA
Rat_Nkx6.1 ILSRPSMPVA SGAALPSASP SGSSSSSSSS ASATSASAAA AAAAAAAAAA
Mesau_Nkx6.1 ILSRPSMPVA SGAALPSASP SGSSSSSSSS ASATSASAAA AAAAAAAAAA
Homo_Nkx6.1 ILSRPSMPVA SGAALPSASP SGSSSSSSSS ASASSAS.AA AAAAAAAAAA
Danio_Nkx6.1 ILSRPSV... ..

151 200
Maus_Nkx6.1 ASSPAGLLAG LPRFSSLSP PPPPGLYFSP SAAVAAVGR YPKPLAELPG
Rat_Nkx6.1 ASSPAGLLAG LPRFSSLSP PPPPGLYFSP SAAVAAVGR YPKPLAELPG
Mesau_Nkx6.1 ASSPAGLLAG LPRFSSLSP PPPPGLYFSP SAAVAAVGR YPKPLAELPG
Homo_Nkx6.1 ASSPAGLLAG LPRFSSLSP PPPPGLYFSP SAAVAAVGR YPKPLAELPG
Danio_Nkx6.1 AXSPAGILSG LPRFSSL.S.P PPPPGLYFSP SAAGCSG... ..GSLSQTPD

201 250
Maus_Nkx6.1 RTPIFWPGVM ...QSPPWRD ARLAC..TPH QGSILLDKDG KRKHTRPTFS
Rat_Nkx6.1 RTPIFWPGVM ...QSPPWRD ARLAC..TPH QGSILLDKDG KRKHTRPTFS
Mesau_Nkx6.1 RAPIFWPGVM ...QSPPWRD ARLAC..TPH QGSILLDKDG KRKHTRPTFS
Homo_Nkx6.1 RTPIFWPGVM ...QSPPWRD ARLAC..TPH QGSILLDKDG KRKHTRPTFS
Danio_Nkx6.1 RASRQNPDIL AWSYAKPTLE RCQICVLTTT KLSSARQRWE KETHATDVFR

251 300
Maus_Nkx6.1 GQQIFALEKT FEQTKYLAGP ERARLAYS LG MTESQVKVWF QNRRTKWRKK
Rat_Nkx6.1 GQQIFALEKT FEQTKYLAGP ERARLAYS LG MTESQVKVWF QNRRTKWRKK
Mesau_Nkx6.1 GQQIFALEKT FEQTKYLAGP ERARLAYS LG MTESQVKVWF QNRRTKWRKK
Homo_Nkx6.1 GQQIFALEKT FEQTKYLAGP ERARLAYS LG MTESQVKVWF QNRRTKWRKK
Danio_Nkx6.1 AAN.FALEKT FEQTKYLAGP EXARLAYS LG MTESQVKVWF QNRRTKWRXR

301 350
Maus_Nkx6.1 HAAEMATAKK KQDSETERLK GTSENEEDDD DYNKPLDPNS DDEKITQLLK
Rat_Nkx6.1 HAAEMATAKK KQDSETERLK GTSENEEDDD DYNKPLDPNS DDEKITQLLK
Mesau_Nkx6.1 HAAEMATAKK KQDSETERLK GTSENEEEDD DYNKPLDPNS DDEKITQLLK
Homo_Nkx6.1 HAAEMATAKK KQDSETERLK GASENEEEDD DYNKPLDPNS DDEKITQLLK
Danio_Nkx6.1 HAAEMASAKK KQDSETERLK GASENEEDDD DYNKPLDPNS DDEKITQLLK

351 373
Maus_Nkx6.1 KHKSS...GG SLLHASEAE GSS
Rat_Nkx6.1 KHKSS...GG SLLHASEAE GSS
Mesau_Nkx6.1 KHKSS...SG GLLHASEAE GSS
Homo_Nkx6.1 KHKSSSGGG GLLHASEPE SSS
Danio_Nkx6.1 KHKPNT.... ALI IHASENE SS*

```

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Auswirkungen der Misexpression des Gens *sonic hedgehog* (*shh*) auf die Entwicklung des Zebrafisches *Danio rerio* untersucht. Zu diesem Zweck wurde das im Zebrafisch etablierte GAL4/UAS-System mit stabilen transgenen Zebrafischen verwendet. Nachkommen aus Kreuzungen von Tieren transgen für das Aktivator-Konstrukt *hsp70::Gal4* und dem Effektor-Konstrukt *UAS::shh* wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung einem Hitzeschock unterzogen und die Auswirkungen dieser transaktivierten Misexpression von *shh* insbesondere auf die Musterbildung im ventralen Neuralrohr hin untersucht.

Die Misexpression von *shh* zu einem Zeitpunkt zu Mitte der Somitogenese führt zu einer Zunahme von sekundären Motoneuronen (sMN) und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OLP) im ventralen Neuralrohr. Damit konnte der Zeitpunkt der OLP-Spezifikation genauer eingegrenzt werden. Zur Untersuchung, wie das Shh-Signal zur Spezifikation einzelner neuronaler Identitäten, wie Interneuronen (IN) und Motoneuronen führt, wurden die Expressionsmuster verschiedener Transkriptionsfaktoren im ventralen Neuralrohr untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß – analog zum vorgestellten Modell in anderen Vertebraten – auch im Zebrafisch das Shh-Signal durch die räumlich und zeitlich gesteuerte Expression einiger dieser Transkriptionsfaktoren interpretiert wird. Dabei werden diese Faktoren von Shh selbst in ihrer Expression positiv (Klasse II) oder negativ (Klasse I) reguliert. In diesem Zusammenhang konnte ein neues Gen kloniert werden, *nkx6.1*. Der Homöobox-Transkriptionsfaktor *nkx6.1* gehört zur Klasse II und ist notwendig für die Spezifikation von sMN und bestimmter V₂-IN. Damit konnte auch die Existenz dieser IN im Zebrafisch nachgewiesen werden.

Weitere Funktionen von *shh* konnten für die Differenzierung der retinalen Ganglienzellen im Auge und der Entwicklung der Myotome nachgewiesen werden.

7 Abstract

Sonic Hedgehog (Shh) has been proposed to be a key regulator in the specification of ventral cell fates during the development of the neural tube. Using the GAL4/UAS system I tried to gain further insight into the functions of this gene in the zebrafish *Danio rerio*. Individual fishes from stable transgenic lines carrying the activator construct *hsp70::Gal4* and the effector construct *UAS:shh* were crossed and the offspring was heat-shocked at different stages of neural development.

Following transactivation, misexpression of *shh* during mid-somitogenesis lead to an increased number of secondary motoneurons (sMN) and oligodendrocyte precursors (OLP) in the ventral neural tube. A more exact identification of the timepoint of OLP specification in the zebrafish could therefore be achieved. To understand, how Shh-signal leads to the specification of different neuronal identities in the ventral neural tube, I analysed the expression patterns of different transcription factors in the ventral neural tube. I could show that in the zebrafish, Shh-Signal is interpreted by different spacial and temporal expression of some members of these transcription factors, where Shh itself is the regulator of these expression pattern. This corresponds to the model proposed for other vertebrates. One of these factors, *nkx6.1*, is a homeobox transcription factor an is positively regulated by Shh (class II gene). I was able to clone the zebrafish gene and show that it is necessary for the specification of sMN and certain V₂-Interneurons (IN). These experiments could also show the existence of this kind of IN in the zebrafish.

Further analysis of the phenotypical changes following misexpression of *shh*, could show its functions during retinal ganglion cell development in the eye and for the development of the myotomes.

8 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega betreut worden.

9 Lebenslauf

Name: Andre Quinkertz

Geboren: 03.02.1972 Goch

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

1978-1982 Christus-König Grundschule Kleve

1982-1991 Freiherr-vom-Stein Gymnasium Kleve

Zivildienst:

1991-1992 Landesanstalt für Ökologie, Landwirtschaft und Forstplanung (LÖLF),
Aussenstelle Kleve

Studium:

1992-1994 Grundstudium der Biologie an der Universität zu Köln

1994 Vordiplom

1994-1997 Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln

1997 Diplomprüfung in den Fächern:
Entwicklungsbiologie, Biochemie und organische Chemie

1997-1998 Diplomarbeit am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter Betreuung von Prof. Dr. Campos-Ortega,
Titel: Suche nach zeitlich und räumlich regulierten Genen im Zebrafisch *Danio rerio*

Promotion:

1998-2003 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

Berufliche Tätigkeiten:

1994-1997 Verkäufer im Music Store, Köln

- 1997-1998 Studentische Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
- 1998-1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
- 1999-2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

Köln, Dezember 2002