

**Aus dem Theodor-Boveri-Institut,
Physiologische Chemie I und Entwicklungsbiochemie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Manfred Gessler

**Kultivierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen
sowie Bedeutung des Notch-Signalwegs für deren
Differenzierung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Martin Landmann
aus Bernau am Chiemsee

Würzburg, April 2013

Referent: Prof. Dr. Manfred Gessler

Koreferent: Prof. Dr. Albrecht Müller

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Notch-Signaltransduktionsweg.....	1
1.2	<i>Hairy</i> und <i>Enhancer-of-split</i> und die verwandten <i>Hes-</i> und <i>Hey</i> -Gene.....	3
1.3	Die Neuralentwicklung	5
1.3.1	Anatomisch-histologischer Ablauf.....	5
1.3.2	Der Einfluss des Notch-Signaltransduktionswegs	6
1.3.3	Experimentelle Modelle	9
1.4	Zielsetzung.....	10
2	Material	12
2.1	Mausstämme	12
2.2	Zellkultur	14
2.3	Immunfluoreszenz.....	14
2.4	PCR und qRT-PCR.....	15
2.4.1	Chemikalien.....	15
2.4.2	Oligonukleotide.....	15
2.4.3	RNA Präparation und cDNA Synthese	19
3	Methoden	20
3.1	Zellkultur	20
3.1.1	Herstellung von Neurosphären.....	20
3.1.2	Kultivierung und Differenzierung.....	20
3.2	Immunfluoreszenz.....	23
3.2.1	Tuj1, Gfap und Nestin.....	23
3.2.2	O4.....	24
3.3	PCR und qRT-PCR.....	25
3.3.1	PCR zur Genotypisierung.....	25
3.3.2	RNA Präparation	26
3.3.3	cDNA Synthese	27
3.3.4	qRT-PCR.....	27

4	Ergebnisse	29
4.1	Neurosphärenkulturen	29
4.1.1	<i>Hey 1</i> und <i>Hey 2</i> Knockout.....	29
4.1.2	Konditionaler <i>RBP-Jk</i> Knockout.....	31
4.1.3	Konditionale <i>Hey1</i> Überexpression	33
4.1.4	Genexpression in differenzierenden Neurosphärenzellen	35
4.2	Monolayerkulturen	39
4.2.1	Etablierung	39
4.2.2	Immunfluoreszenzfärbungen	42
5	Diskussion.....	43
5.1	<i>Hey 1</i> und <i>Hey 2</i> Knockout	43
5.2	Konditionaler <i>RBP-Jk</i> Knockout.....	44
5.3	Konditionale <i>Hey1</i> Überexpression.....	45
5.4	Genexpression in differenzierenden Neurosphärenzellen	46
5.4.1	Gene der <i>Hes</i> - und <i>Hey</i> -Familie sowie <i>Id4</i>	47
5.4.2	Proneurale Gene	47
5.4.3	Linien spezifische Markergene	48
5.5	Neurosphären- versus Monolayerkultur	49
6	Zusammenfassung	52
7	Literaturverzeichnis.....	54
8	Abkürzungsverzeichnis	61

1 Einleitung

Eine der spannendsten Fragen in der Grundlagenforschung ist die Frage, wie Leben entsteht und sich entwickelt. Gerade die Entwicklung eines komplexen Lebewesens aus nur einer befruchteten Eizelle erscheint besonders faszinierend. Stammzellen spielen eine zentrale Rolle während dieser Entwicklung. Stammzellen sind Körperzellen, die in der Lage sind, sich zu verschiedenen Zelltypen und Gewebearten zu differenzieren. Zunächst herrschen pluripotente embryonale Stammzellen vor, die sich in jeden Gewebetyp entwickeln können. Später in der Entwicklung und auch noch beim ausgewachsenen Lebewesen sind vor allem adulte Stammzellen zu finden. Diese adulten Stammzellen sind in der Regel multipotent, d.h. sie können nur noch bestimmte Gewebearten wie z.B. Herz oder Gehirn bilden. Die Ausreifung von Stammzellen zu den einzelnen Zelltypen wird auf Zellebene durch eine Vielzahl von genetischen und biochemischen Mechanismen gesteuert. Komplizierte Signalkaskaden sind dabei dafür verantwortlich, dass zum richtigen Zeitpunkt die für eine normale Entwicklung notwendigen Gene an- bzw. abgeschaltet werden. Eine entscheidende Rolle unter diesen regulierenden Signalkaskaden spielt der sogenannte Notch-Signaltransduktionsweg.

1.1 Der Notch-Signaltransduktionsweg

Der Notch-Signaltransduktionsweg ist hoch konserviert und in fast allen mehrzelligen Organismen zu finden. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und steuert Differenzierungsprozesse verschiedener Gewebearten sowohl im Embryo auch als im Adulten durch Regulieren der Genexpression (Artavanis-Tsakonas et al. 1999).

Das namensgebende Gen kodiert für ein Transmembranrezeptorprotein, das aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne besteht. In Säugern gibt es die vier verschiedenen Notch-Rezeptoren Notch1 bis Notch4.

Binden die Transmembranproteine Delta-like oder Jagged (Delta oder Serrate in *Drosophila*) als Ligand an den Notch-Rezeptor wird dessen intrazelluläre Domäne mittels Proteolyse abgespalten. Bei dieser Spaltung spielen vermutlich Präseniline,

Proteine, die bei der erblichen Form der Alzheimer-Krankheit mutiert sind, eine wichtige Rolle. Kürzlich wurde gezeigt, dass bei der ersten bekannten Alzheimer-Patientin (Auguste D.), die 1906 verstarb, eine Mutation im *Presenilin1*-Gen für die Erkrankung verantwortlich war (Muller et al. 2012). *Presenilin1* defiziente Mäuse zeigen schwere Fehlbildungen von Skelett und zentralem Nervensystem und versterben kurz nach der Geburt (Shen et al. 1997).

Die durch Präseniline und andere Proteasen abgespaltene intrazelluläre Notch-Domäne (NICD) gelangt in den Zellkern und bindet dort an das Protein RBP-Jk (auch bekannt als CBF1 oder su(H) in *Drosophila*). RBP-Jk interagiert ohne NICD mit einem Repressorkomplex und verhindert so die Transkription bestimmter Gene. Bindet nun NICD an RBP-Jk ändert sich die Zusammensetzung des Komplexes und die Transkription der Gene wird aktiviert (s. Abb. 1).

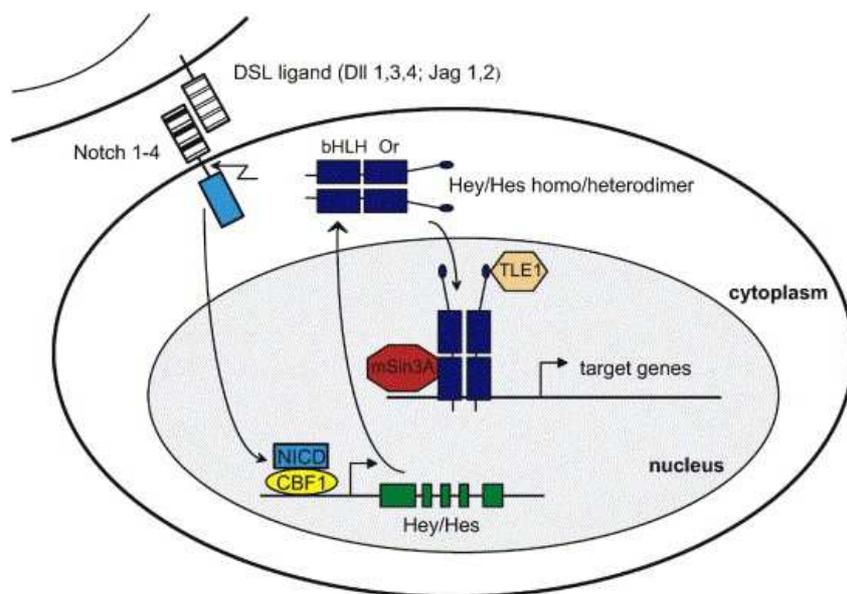


Abb. 1: Der Notch-Signaltransduktionsweg

Nach Interaktion mit einem Liganden wird die intrazelluläre Notch-Domäne (NICD) abgespalten. NICD bindet im Kern an CBF1 (*RBP-Jk*) und aktiviert dadurch die Transkription der *Hes*- und *Hey*-Gene (Fischer and Gessler 2003).

Eine fehlerhafte Notch-Signalkaskade ist für verschiedene Erkrankungen des Menschen wie z.B. bestimmte T-Zell-Leukämien und Hirninfarkte mit verantwortlich (Louvi and Artavanis-Tsakonas 2012).

Im Jahre 1991 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen verändertem *Notch* und menschlichen Erkrankungen erkannt. In bestimmten Fällen von akuter lymphoblastischer T-Zell-Leukämie wurde eine chromosomale Translokation

festgestellt [(7;9)(q34;q34.3)], die die Expression eines verkürzten und permanent aktiven Notch1-Rezeptors zur Folge hat. *Notch1* ist in diesen Fällen also ein Onkogen (Ellisen et al. 1991).

Im Jahre 1996 wurde festgestellt, dass bei CADASIL (Cerebrale Autosomal-Dominante Arteriopathie mit Subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie) Mutationen im *Notch3*-Gen vorliegen, die zu einer Mikroangiopathie der hirnversorgenden und anderer Blutgefäße führen. Dadurch kann es schon im mittleren Lebensalter zu multiplen Hirninfarkten kommen (Joutel et al. 1996).

Im Jahre 1997 konnte das Alagille-Syndrom, eine autosomal-dominant vererbte menschliche Erkrankung, bei der es u.a. zu Entwicklungsauffälligkeiten in Leber, Skelett, Niere, Herz und Gesicht kommt, in Verbindung mit Mutationen im Gen *Jagged1*, das einen Liganden des Notch-Rezeptors kodiert, gebracht werden (Li et al. 1997; Oda et al. 1997). Auch die Mutation des Gens des Liganden Delta-like 3 (*Dll3*) führt in der Maus zu schweren Deformierungen der Wirbel und Rippen (Kusumi et al. 1998).

Im Jahre 2011 wurde entdeckt, dass bestimmte Mutationen im letzten Exon von *Notch2* die Hauptursache für das sehr seltene, sporadisch auftretende oder autosomal-dominant vererbte Hajdu-Cheney Syndrom sind. Dieses Syndrom geht mit schwerem und fortschreitendem fokalen Knochenschwund, generalisierter Osteoporose, verschiedenen kraniofazialen Abweichungen und Zystennieren einher (Isidor et al. 2011; Majewski et al. 2011; Simpson et al. 2011).

1.2 *Hairy* und *Enhancer-of-split* und die verwandten *Hes-* und *Hey-* Gene

Die am besten untersuchten Ziele des Notch-Signaltransduktionswegs sind die Gene *Hairy* und *Enhancer-of-split* [*E(spl)*] in *Drosophila* und die verwandten *Hes-* und *Hey-* Gene in Säugern. Wichtige Prozesse wie die Segmentation und die Muskel- und Neuralentwicklung werden in *Drosophila* durch *Hairy* und *E(spl)* kontrolliert. Die Gene kodieren für basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine (Fisher and Caudy 1998). Diese Proteine bestehen aus einer basischen DNA-bindenden Domäne (b) und zwei α -Helices, die durch einen Loop getrennt sind (HLH). Über die HLH-Domäne können

zwei dieser Proteine dimerisieren (s. Abb. 2). Außerdem dient sie als Ausgangspunkt für weitere Proteininteraktionen (Massari and Murre 2000). Die Proteinprodukte der Gene *Hairy* und *E(spl)* wiederum verhindern die neurale Differenzierung, indem sie die Expression proneuraler Aktivatoren wie *Atonal* und Gene des *Achaete-Scute*-Komplexes (in Säugern *Math1* und *Mash1*) inhibieren (Fisher and Caudy 1998).

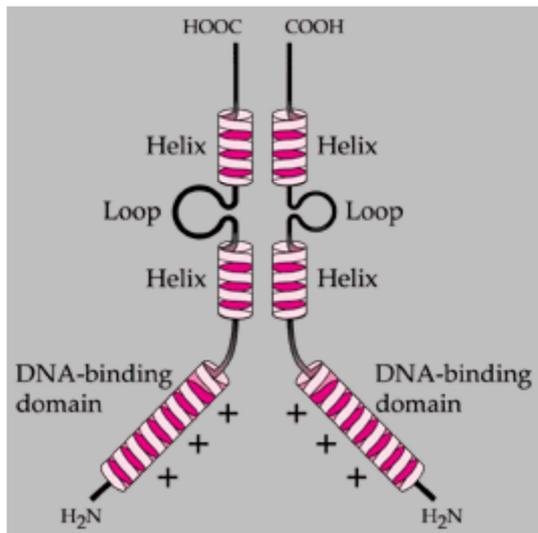


Abb. 2: Aufbau und Dimerisierung zweier bHLH-Proteine

Die Bindung zweier bHLH-Proteine erfolgt über die Helix-Loop-Helix-Domäne (Gilbert 1997).

Sieben *Hes*- (*Hes1-7*) und drei *Hey*-Gene (*Hey1*, *Hey2* und *HeyL* auch bekannt als *Hrt1-3*; *Hesr1,2*, *Herp2,1* oder *Chf2,1*) sind im Genom von Säugern bisher entdeckt worden (Fischer and Gessler 2007). *Hes*- und *Hey*-Proteine sind den *Hairy*- und *E(spl)*-Proteinen sehr ähnlich (Iso et al. 2003). Während *Hes2*, *Hes3* und *Hes6* unabhängig vom Notch-Signaltransduktionsweg zu sein scheinen und genauere Daten zu *Hes4* noch fehlen, werden die Gene *Hes1*, *Hes5*, *Hes7* und alle *Hey*-Gene vom Notchsignalweg beeinflusst (Fischer and Gessler 2007).

Die *Hes*- und *Hey*-Proteine sind in vielen verschiedenen Gewebearten zu finden und spielen eine wichtige Rolle sowohl in der Entwicklung eines Embryos als auch im Adulten. *Hes1* spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Nervensystem, Sinnesorganen (Auge, Innenohr), Pankreas und Lymphozyten. Da *Hes1* die Aufgabe von *Hes3* bzw. *Hes5* teilweise ersetzen kann (Redundanz), führt ein alleiniger Verlust von *Hes3* oder *Hes5* zu weniger ausgeprägten Fehlbildungen. Ein kombinierter Verlust von *Hes1* und *Hes3* bzw. *Hes5* hingegen ist wesentlich schwerwiegender. *Hes7* ist für die Somitogenese wichtig (Bessho et al. 2003).

Die *Hey*-Gene beeinflussen die Entwicklung des kardiovaskulären Systems. *Hey2*^{-/-} Mäuse und Mäuse mit kombiniertem Verlust von *Hey1* und *HeyL* leiden an schweren

angeborenen Herzfehlern. Ein kombinierter Verlust von *Hey1* und *Hey2* führt im Embryo zu Defekten in der Entwicklung der Blutgefäße (Fischer and Gessler 2007).

1.3 Die Neuralentwicklung

1.3.1 Anatomisch-histologischer Ablauf

Aus einer befruchteten Eizelle entwickeln sich in höheren Säugetieren in der frühen Embryogenese durch die sogenannte Gastrulation die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Nach der Gastrulation beginnt die Neuralentwicklung mit der Bildung von Neuroepithelzellen aus dem Ektoderm. Die Neuroepithelzellen formen anschließend die Neuralplatte. Neuroepithelzellen sind neurale Stammzellen, die sich symmetrisch teilen, um weitere neurale Stammzellen zu erzeugen (Alvarez-Buylla et al. 2001; Fujita 2003). Nachdem die Neuralplatte zum Neuralrohr umgebildet worden ist, werden die Neuroepithelzellen u.a. zu radialen Gliazellen. Von diesen radialen Gliazellen glaubte man früher, dass es spezialisierte Gliazellen seien, aber heute weiß man, dass es auch neurale Stamm- bzw. Vorläuferzellen sind (Gotz and Huttner 2005; Miller and Gauthier 2007). Die radiale Glia teilt sich viele Male asymmetrisch in jeweils eine radiale Gliazelle und ein Neuron (oder einen neuronalen Vorläufer) und formt so den vorderen Teil des Neuralrohrs zum sich entwickelnden Gehirn um. Nachdem die Neurogenese weitestgehend abgeschlossen ist, entwickeln sich aus der radialen Glia Gliazellen wie Oligodendrozyten und Astrozyten (s. Abb. 3). Neurale Stammzellen verändern also sowohl ihre Morphologie als auch ihre Fähigkeiten während der Embryonalentwicklung. Darüber hinaus muss eine Population von Stammzellen lange aufrechterhalten werden, um alle Arten von Zellen bilden zu können. Eine vorzeitige Zelldifferenzierung führt zu einer Fehlbildung von Form und Zellarchitektur des Gehirns. Heute wissen wir außerdem, dass Neurogenese nicht nur im sich entwickelnden, sondern auch im ausgewachsenen Gehirn stattfindet (Gage 2000; Ming and Song 2005; Imayoshi et al. 2008; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

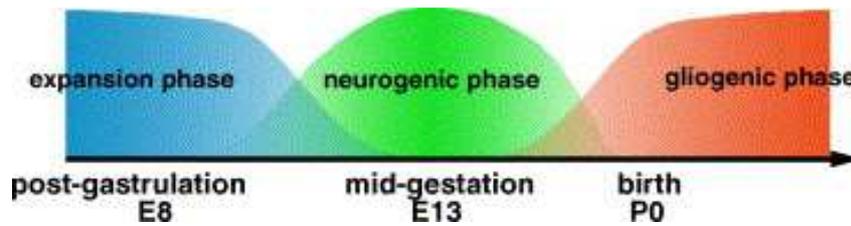


Abb. 3: Die Neuralentwicklung läuft in drei aufeinander folgenden Schritten ab.

Zunächst entstehen und verbreiten sich die neuralen Vorläuferzellen, es folgt die Neurogenese und schließlich findet die Bildung von Glia statt (Hirabayashi and Gotoh 2005).

1.3.2 Der Einfluss des Notch-Signaltransduktionswegs

Verschiedene Signalkaskaden sind für die molekularen Mechanismen der Neuralentwicklung wichtig (Faigle and Song 2012). Unter anderem spielen der Shh und der TGF β Signalweg bei der Entwicklung des Neuralrohrs eine Rolle (Rowitch 2004). Außerdem ist der JaK/STAT Signalweg für die Astrozyten- (Yoshimatsu et al. 2006) und der Wnt-Signalweg für die Neuronenentwicklung bedeutend (Hirsch et al. 2007).

Auch der Notch-Signalweg ist in der Neuralentwicklung von Bedeutung (Yoon and Gaiano 2005). Es wurde gezeigt, dass es in *Notch*^{-/-} Mäusen zu einer vorzeitigen neuronalen Differenzierung kommt, wobei das Repressorgen *Hes5* herunterreguliert war, während die proneuralen Gene und frühen Differenzierungsmarker *Mash1*, *NeuroD* und *Neurog2* sowie der Notch-Rezeptor-Ligand *Dll1* stärker exprimiert waren (de la Pompa et al. 1997; Lutolf et al. 2002). Weiterhin fiel bei der Kultivierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen, die am elften Tag der Embryonalentwicklung (E10.5) gewonnen wurden, eine deutlich niedrigere Neurosphärenzahl auf. Dies stützt die These, dass der Notch-Signalweg zur Aufrechterhaltung einer neuralen Stammzellpopulation wichtig ist (Hitoshi et al. 2002).

Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen an *Dll1*^{-/-} Mutanten, bei denen das Gen für den Notch-Rezeptor-Liganden Dll1 ausgeschaltet war. Auch hier war die Expression von *Hes5* reduziert und die neuronaler Marker wie *β III-Tubulin* erhöht, wobei auch die Zahl der Neuronen erhöht war (Yun et al. 2002; Grandbarbe et al. 2003).

Ein konditionaler Knockout von *RBP-Jk* (*CBF1*) ist eine Möglichkeit, die Notch-Signalkaskade nahezu komplett zu unterbrechen. Entsprechend findet sich bei *RBP-Jk*^{-/-} Mäusen analog zu *Notch*^{-/-}-Mäusen wieder reduziertes *Hes5* und erhöhtes *Dll1*,

Mash1 und *NeuroD* (de la Pompa et al. 1997). Außerdem werden bei der Kultivierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen (E8.5) keine Neurosphären gebildet (Hitoshi et al. 2002).

Bisherige Untersuchungen zur Rolle der Notch-Zielgene *Hes* und *Hey* bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems bei Säugern hatten vor allem die Gene *Hes1*, *Hes3* und *Hes5* im Fokus. Die *Hes*-Gene gehören zu den reprimierenden bHLH Genen und sie verhindern die Differenzierung neuraler Vorläuferzellen. Dies erreichen sie u.a. durch Blockieren proneuraler Gene (Aktivatorgene) wie *Mash1*, *Math1*, *Math3* und *Neurogenin2* (auch *Neurog2* oder *Ngn2*) (Kageyama et al. 2005) (s. Abb. 4).

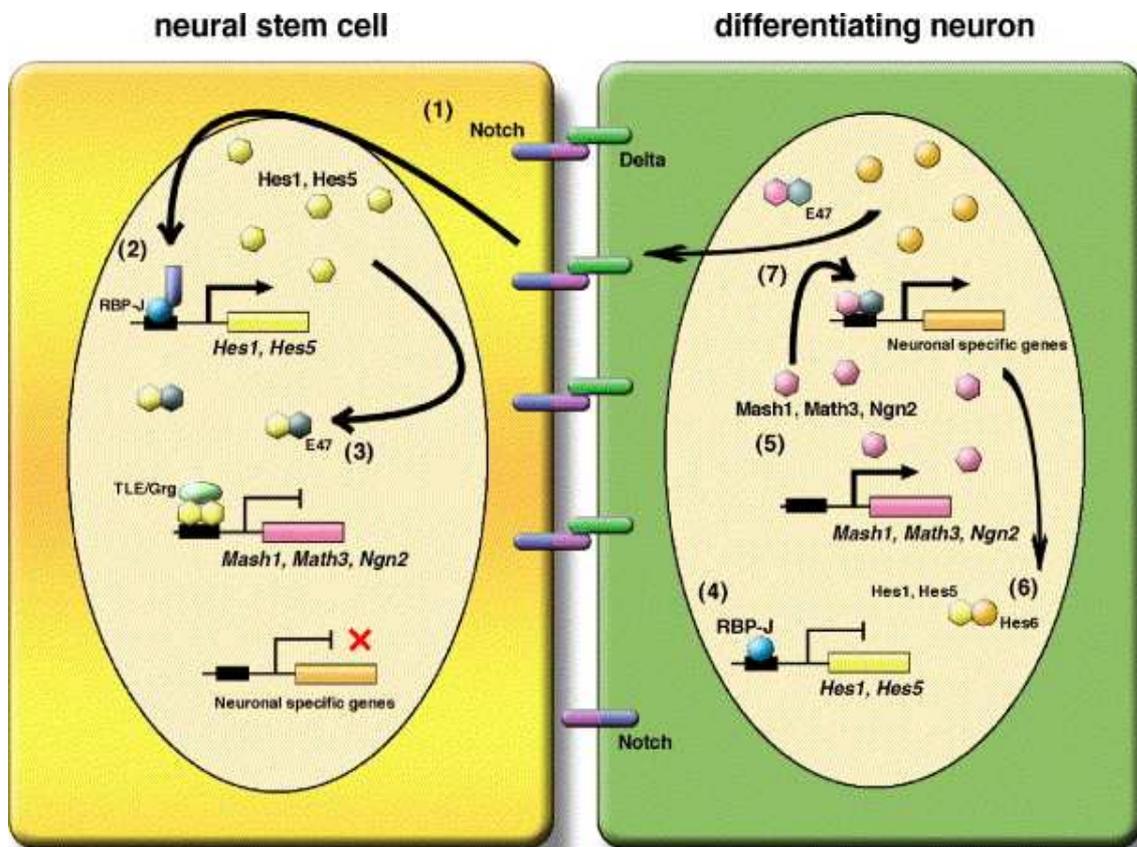


Abb. 4: Der Notch-Signaltransduktionsweg während der Neuralentwicklung

Links: Die Interaktion des Notch-Rezeptors mit Delta führt zur Expression von *Hes1* und *Hes5*. Die zugehörigen Proteinprodukte *Hes1* und *Hes5* reprimieren die Expression der proneuralen Gene *Mash1*, *Math3* und *Ngn2*, was die neuronale Differenzierung verhindert.

Rechts: Zellen, in denen der Notch-Signalweg nicht aktiv ist, exprimieren Gene wie *Mash1*, *Math3* und *Ngn2*, deren Proteinprodukte die Differenzierung zu Neuronen ermöglichen. Außerdem wird die sogenannte laterale Inhibition in Gang gesetzt: *Mash1*, *Math3* und *Ngn2* induzieren nämlich zusätzlich den Notch-Liganden Delta, der in der Nachbarzelle die Notch-Signalkaskade aktiviert und diese somit von der Differenzierung abhält (Kageyama et al. 2005)

Hes1^{-/-} Mäuseembryos zeigten schwere Fehlbildungen in der Neuralentwicklung wie fehlenden Neuralrohrverschluss und Anenzephalie (Ishibashi et al. 1995). *Hes1* und *Hes5* scheinen redundante Aufgaben in der Neuralentwicklung zu haben. Zum einen haben *Hes1;Hes5* Doppelknockout-Mäuse einen wesentlich schwerer ausgeprägten Phänotyp als die Phänotypen von *Hes1* und *Hes5* Singleknockout-Mäusen zusammengenommen (Ohtsuka et al. 1999), zum anderen wurde eine erhöhte *Hes5* Expression in *Hes1*^{-/-} Mutanten festgestellt, was Kompensationsmechanismen zwischen diesen beiden Notch-Zielgenen nahelegt (Ishibashi et al. 1995).

Hes1, *Hes3* und *Hes5* scheinen auch eine wichtige Rolle in sogenannten Grenzzellen zu spielen. Grenzzellen sind in den Grenzbereichen zwischen den einzelnen Gehirnkompartmenten angesiedelt und haben die Aufgabe die Entwicklung der angrenzenden Gehirnkompimente zu steuern. Grenzzellen sind neuralen Stammzellen morphologisch ähnlich, proliferieren aber normalerweise langsam und differenzieren nicht zu Neuronen. Vermutlich wird die Differenzierung zu Neuronen durch die Repression proneuraler Gene durch die *Hes*-Gene verhindert. So kommt es in *Hes1;Hes3;Hes5* Dreifachknockout-Mäusen zu einer Expression proneuraler Gene und zu Neurogenese in den Grenzbereichen, was zur Folge hat, dass die Grenzbereiche und Gehirnkompimente fehlerhaft ausgebildet werden (Kageyama et al. 2008).

Die Rolle der *Hey*-Gene *Hey1*, *Hey2* und *HeyL* während der Neuralentwicklung ist noch recht unklar. Die Überexpression von *Hey1* und *Hey2* in einem frühen Entwicklungsstadium (E13.5) führt vermutlich zum Aufrechterhalten einer Population neuraler Stamm- und Vorläuferzellen. Auch die Überexpression in einem späteren Entwicklungsstadium (E15.5) scheint die Neurogenese vorübergehend zu hemmen und später (P5) zur vermehrten Bildung von Gliazellen zu führen (Sakamoto et al. 2003). Außerdem zeigen *Hey1;Hey2* Doppelknockout-Mäuse ein deutlich dünneres Neuralrohr (Fischer et al. 2004). Für *HeyL* wurde gezeigt, dass ein Knockout des Gens bei neuralen Stamm- und Vorläuferzellen zu einer geringeren Neuronenzahl bei der Differenzierung führt (Jalali et al. 2011).

1.3.3 Experimentelle Modelle

Um die Neuralentwicklung zu untersuchen, stehen verschiedene in vivo- und in vitro-Systeme zur Verfügung. Da Experimente in vivo meist mit einem höheren Aufwand verbunden sind, finden zur Untersuchung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen vor allem die in vitro Systeme breite Anwendung. Eine Zellkultur kann sicherlich die Bedingungen wie sie in vivo vorherrschen nur bedingt abbilden und es ist wahrscheinlich, dass sich isolierte Zellen in vitro zum Teil anders verhalten als Zellen in vivo, die ja auf vielfältige Weise mit ihrer Umgebung kommunizieren und auf unterschiedliche Wachstumsfaktoren angewiesen sind. In vitro Systeme zeigen aber auch viele Gemeinsamkeiten mit der in vivo Situation. In beiden entstehen zum Beispiel zunächst Neuronen und anschließend erst Gliazellen (Qian et al. 2000).

Die beiden wichtigsten in vitro-Systeme sind derzeit zum einen die Neurosphärenkultur und zum anderen die Monolayerkultur. Am weitesten verbreitet und am besten untersucht ist die erstmals 1992 beschriebene Neurosphärenkultur (Reynolds and Weiss 1992; Reynolds and Rietze 2005). Deshalb wurden die Experimente zu dieser Arbeit zunächst an Neurosphärenkulturen durchgeführt. Versetzt man zerkleinertes Gehirngewebe mit Nährmedium (inklusive Wachstumsfaktoren) proliferieren nur die neuralen Stamm- und Vorläufer und bilden sogenannte Neurosphären. Eine Neurosphäre ist eine kugelförmige Anordnung von zusammenhängenden Zellen. In diesem komplexen Gebilde finden sich sowohl multipotente Stammzellen als auch Vorläuferzellen, die schon auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt sind. Außerdem sind auch ausdifferenzierte Astrozyten und Neuronen vorhanden (Reynolds and Weiss 1992).

Neurosphärenkulturen haben zwar Vorteile, wie z.B. eine unkomplizierte Kultivierung, aber auch Nachteile, wie z.B. eine große Heterogenität, die Untersuchungsergebnisse beeinflussen kann und damit auch die Vergleichbarkeit von Ergebnissen beeinträchtigt (Suslov et al. 2002; Jensen and Parmar 2006). Die Nachteile der Neurosphärenkultur führten in den letzten Jahren zu einer verstärkten Hinwendung zur Monolayerkultur. Es wurde gezeigt, dass sich die Stamm- und Vorläuferzellen in einer Monolayerkultur symmetrisch teilen und sich selbst erneuern. Außerdem scheinen sie eine relativ homogene Population von Zellen darzustellen (Conti et al. 2005; Pollard et al. 2006). Weiterhin sind sie über einen langen Zeitraum

fähig, sich in die drei Zellarten Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen zu differenzieren. Damit erfüllen die Zellen in diesen Monolayerkulturen alle Eigenschaften, die eine multipotente Stammzelle definieren (Glaser et al. 2007).

1.4 Zielsetzung

Dass der Notch-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Neuralentwicklung spielt, ist unumstritten. Sind Notch oder Teile des Signalwegs ausgeschaltet führt das in vivo teilweise zu schweren neuralen Fehlbildungen. Auch Untersuchungen in vitro haben schon viele Einsichten gegeben wie der Notch-Signalweg an der Neuralentwicklung und an der Aufrechterhaltung von neuralen Stammzellen beteiligt ist. Allerdings ist der Notch-Signalweg wohl wesentlich komplexer als früher angenommen (Guruharsha et al. 2012) und gerade die Bedeutung der einzelnen Notch-Zielgene wie *Hes* und insbesondere *Hey* für den Differenzierungsprozess neuraler Stamm- und Vorläuferzellen ist noch recht unklar.

Ein Ziel dieser Arbeit war nun herauszufinden, ob der Notch-Signalweg und seine Zielgene der *Hey*-Familie vielleicht essentielle Schalter für Zellschicksalsentscheidungen in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen darstellen. Da das gezielte Ausschalten eines Gens eine aussagekräftige Methoden zur Erforschung seiner Funktion ist, wurden zunächst die Neurosphären von *Hey1*^{-/-} und *Hey2*^{-/-} Mäuseembryonen mit denen von Wildtyp-Mäuseembryonen verglichen. Außerdem sollte der Notch-Signalweg durch konditionales Ausschalten von *RBP-Jk* in Neurosphären komplett inhibiert werden. Eine weitere Möglichkeit, Aufschluss über die Funktion eines Gens zu bekommen, ist, dieses zu überexprimieren. Deshalb wurden auch Neurosphären mit konditional aktivierbarem *Hey1*-Transgen, die eine Überexpression von *Hey1* aufweisen, untersucht.

Hierzu mussten zunächst die Neurosphären aus Wildtyp-Mäuseembryonen und Neurosphären aus Mäuseembryonen mit den beschriebenen genetischen Veränderungen etabliert, kultiviert und dann zur Differenzierung gebracht werden. Durch anschließende Immunfluoreszenzfärbung sollte jeweils die Anzahl der entstandenen Neuronen und Gliazellen miteinander verglichen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Abläufe und insbesondere wieder die Funktion des Notch-Signalwegs während der Differenzierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen auf Genebene genauer zu untersuchen. Dazu wurde in Wildtyp-Neurosphärenzellen die Genexpression von Genen, die in der Neuralentwicklung und in der Notch-Signalkaskade eine Rolle spielen, zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten mit Hilfe von qRT-PCR quantifiziert. Anschließend sollte die Genexpression in differenzierenden genveränderten Neurosphärenzellen mit Wildtyp-Neurosphärenzellen verglichen werden.

Da sich herausstellte, dass die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche teilweise widersprüchlich und schlecht reproduzierbar waren, was an den vorgegebenen Eigenschaften einer Neurosphärenkultur liegen könnte, war das nächste Ziel meiner Arbeit, adäquate Monolayerkulturen zu etablieren. Die Experimente könnten dann mit diesen Monolayerkulturen wiederholt bzw. fortgeführt werden.

2 Material

2.1 Mausstämme

Hey1^{-/-} Mäuse (Fischer et al. 2004)

Zur Gewinnung dieses Mausstamms wurde ein *lacZ*-Ziel-Vektor mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht. Dieser Vektor wurde anschließend in das *Hey1*-Gen eingebaut und ersetzt die Exons 2-4 und Teile des Exons 5. Das *Hey1*-Gen ist in diesen Mäusen damit funktionslos.

Hey2^{-/-} Mäuse (Gessler et al. 2002)

Dieser Mausstamm entstand durch Transfektion embryonaler Stammzellen mit einem *lacZ*-Vektor, der in das *Hey2*-Gen eingebaut wurde und dadurch Teile des Exons 2 und das Exon 3 ersetzt. Das modifizierte *Hey2*-Gen codiert für ein funktionsloses Protein.

RBP-Jk^{fl/fl}/Cre-ERT2⁺ Mäuse (Nakhai et al. 2008)

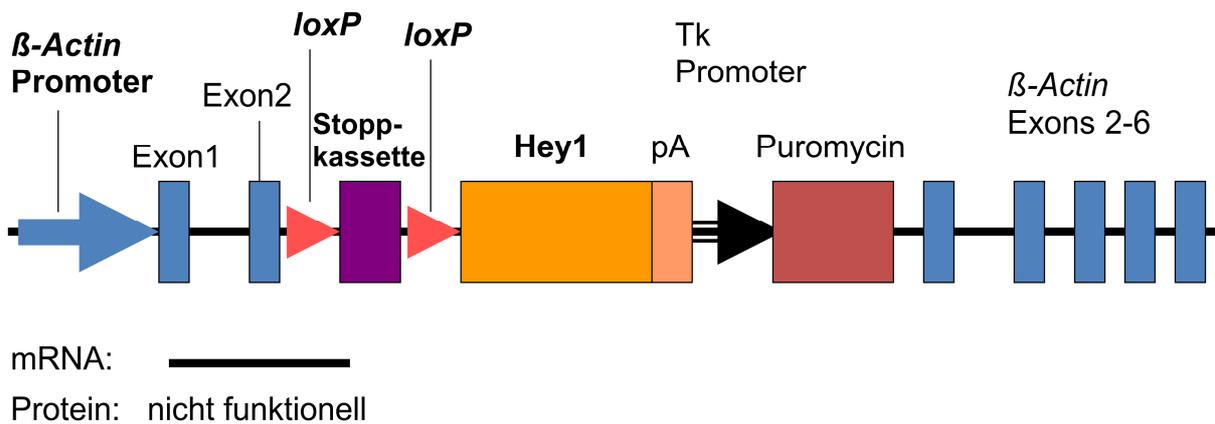
RBP-Jk^{fl/fl}/Cre-ERT2⁺ Mäuse sind eine Kreuzung aus *RBP-Jk^{fl/fl}* und *Cre-ERT2⁺* Mausstämmen und ermöglichen einen konditionalen Knockout von *RBP-Jk*. Im Erbgut von *RBP-Jk^{fl/fl}* Mäusen ist das Exon 7 des *RBP-Jk*-Gens mit loxP-Erkennungssequenzen flankiert. In den *Cre-ERT2⁺* Linien wird Cre-Rekombinase (Cre) als Fusionsprotein (Cre-ERT2) mit einem modifizierten Östrogenrezeptor (ERT2) exprimiert. In den Zellen der *RBP-Jk^{fl/fl}/Cre-ERT2⁺* Mäuseembryonen wird das Cre-ERT2 Protein zunächst im Cytosol gehalten. Von außen zugeführtes 4-Hydroxytamoxifen (OHT) kann an ERT2 andocken und das Fusionsprotein aktivieren. Das Fusionsprotein wandert darauf in den Zellkern, erkennt die loxP-Sequenzen und deletiert das Exon 7. Das veränderte *RBP-Jk*-Gen codiert nun für ein funktionsloses Protein.

ActH1⁺/Cre-ERT2⁺ Mäuse (Vooijs et al. 2001; Salie et al. 2010)

Diese Mäuse sind Nachkommen aus Kreuzungen von *ActH1⁺* und *Cre-ERT2⁺* Mausstämmen. Die *ActH1⁺* Mäuse besitzen ein zusätzliches *Hey1*-Gen unter Kontrolle des β -*Actin* Promoters (*ActH1*). Die Expression von ActH1 wird zunächst

durch eine mit loxP-Erkennungssequenzen markierten Stoppkassette verhindert. Die *Cre-ERT2*⁺ Mäuse wurden bereits oben beschrieben. Bindet nun exogenes OHT in den Zellen der *ActH1*⁺/*Cre-ERT2*⁺ Mäuseembryonen an ERT2, wandert das Fusionsprotein in den Zellkern, erkennt die loxP-Sequenzen und die Cre-Rekombinase kann die Stoppkassette deletieren. Damit wird eine zusätzliche *Hey1* Expression ermöglicht (s. Abb. 5).

Vor Cre-Rekombination:



Nach Cre-Rekombination:

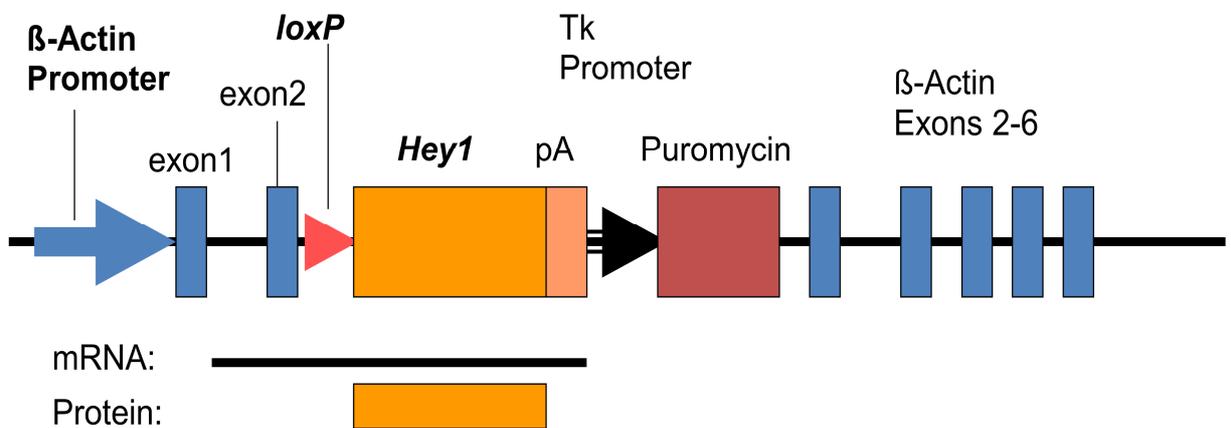


Abb. 5: Transgene *Hey1* Expression unter Kontrolle des *β-Actin* Promoters

Vor Cre-Rekombination: Ein zusätzliches *Hey1*-Gen wurde in das *β-Actin*-Gen mittels Transfektion eingebaut. Eine Puromycin-Kassette macht die Zellen resistent gegen Puromycin. Somit können gezielt die Zellen, die erfolgreich mit dem *Hey1*-Puromycin-Konstrukt transfiziert wurden, selektiert werden. Die *Hey1* Expression wird zunächst durch eine Stoppkassette verhindert.

Nach Cre-Rekombination: Nach erfolgter Deletion der Stoppkassette durch Cre-Rekombinase kann zusätzliches *Hey1* transkribiert und translatiert werden.

2.2 Zellkultur

AccuMax (PAA, Cölbe)

Accutase (PAA, Cölbe)

B-27 Serum-free supplement (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)

DEPC (Diethylpyrocarbonat) (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

DMSO (Dimethylsulfoxid) (ROTH, Karlsruhe)

L-Glutamin (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)

N-2 Supplement (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)

Neurobasalmedium (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)

Neurocult NSC differentiation supplement (STEMCELL Technologies, Köln)

NS-A Medium (Euroclone, Mailand, Italien)

Penicillin/Streptomycin (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)

Poly-DL-Ornithin (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

rh EGF (ImmunoTools, Friesoythe)

rh FGF-basic (ImmunoTools, Friesoythe)

4-Hydroxytamoxifen (OHT) (Amersham Biosciences, Freiburg)

Trypanblau (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

Trypsin (PAN-Biotech, Aidenbach)

Zellsiebe 70µm (Hartenstein, Würzburg)

2.3 Immunfluoreszenz

Mowiol 4-88 (Calbiochem, Darmstadt)

Fluorescence Mounting Medium (Dako, Hamburg)

DAPI (Amersham Biosciences, Freiburg)

Ziegenserum (PAA, Cölbe)

HBSS (inkl. Ca²⁺ und Mg²⁺) (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)

Paraformaldehyd (ROTH, Karlsruhe)

Primärantikörper

Gfap [Glial fibrillary acidic protein] (DakoCytomation, Hamburg)

Nestin [Rat 401] (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City)

Oligodendrozytenmarker O4 (R&D Systems, Wiesbaden)

Tuj1 [anti-neuron-specific class III beta-tubulin antibody, clone TuJ-1] (R&D Systems, Wiesbaden)

Sekundärantikörper

Alexa 488 Anti-Rabbit IgG (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe)

Alexa 563 Anti-Mouse IgG (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe)

Cy3 Anti-Mouse IgG (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

2.4 PCR und qRT-PCR

2.4.1 Chemikalien

BSA (bovines Serumalbumin) (Amersham Biosciences, Freiburg)

dNTPs (ROTH, Karlsruhe)

FITC (BioRad, München)

Proteinase K (Roche, Grenzach Wyhlen)

Sybr Green (Cambrex, Apen)

Taq-Polymerase (im eigenen Labor produziert)

2.4.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech GmbH (Ebersberg) oder Sigma Aldrich (München) bestellt.

2.4.2.1 PCR zur Genotypisierung

Hey1 (wt: 300bp, ko: 240bp)

Hey1-lac-KOtest5´new CGTCCGCCACCATGAAGA

clk2 CTGGCCAAAACCTGGGAC

Z3L ATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTA

Hey2 (wt: 250bp, ko: 430bp)

Hey2-ko-test3 TCGGTGAATTGGACCTCATCACTGAGC

Hey2-ko-test5 GCTGTCTCAAGGCCTCAACAGCATTG

Z3L ATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTA

ActH1 (wt: 240bp, floxed: 169bp)

b-act1 TTCCTTTGTCCCCTGAGCTT

b-act2 CACGATGGAGGGGAATACAG

b-act3 CAGCCCAAGCTGATCCTCTA

RBPJ/CBF1 (wt: 165bp, floxed: 211bp, deleted: 316bp)

RBPJ-flox-for GTGGAACCTTGCTATGTGCTTTG

RBPJ-flox-rev1 CTGCCATATTGCTGAATGAAAA

RBPJ-flox-rev2 CACATTCCCATTATGATACTGAGTG

Rosa-Cre/ERT2 (wt: 240bp, Cre⁺: 300bp)

Rosa26-for TGGGATACAGAAGACCAATGC

Rosa26-creER ACGGACAGAAGCATTTCCTCA

Rosa26-wt-rev GTCTCTGCCTCCAGAGTGCT

2.4.2.2 qRT-PCR

Blbp

mBLBP-ex2real AGTGGGAAACGTGACCAAAC

mBLBP-ex3real TTTCTTTGCCATCCCCTTC

Dat1

mDat1_5'real TGGAGGTTTCCCTACCTGTG

mDat1_3'real CCAGCAGCTCCTTCTCTGTT

Gfap

mGfap_5'real GGAGGTGGAGAGGGACAACCT

mGfap_3'real ATACGCAGCCAGGTTGTTCT

Hes1

mHes1realfor AAAGATAGCTCCCGGCATTC

mHes1realrev GTGTTAACGCCCTCACACG

Hes3

mHes3_5'real_b CCAAGCCTCTGATGGAGAAG

mHes3_3'real_b CACTGGGTACTGGCCAGAGT

Hes5

mHES5-for-real GCCGTCAGCTACCTGAAACA

mHES5-rev-real CGCTGGAAGTGGTAAAGCAG

Hes6

mHes6realfor TGCAGGCCAAGCTAGAGAAC

mHes6realrev TCAGCTGAGACAGTGGCATC

Hey1

Clikseq5 [Hey1, forward primer] ACCCCAAACTCCGATAGTCC

huclik-3 [Hey1, reverse primer] TGAGCTGAGAAGGCTGGTAC

Hey1 endogen

mHey1-5'UTR CTGCAGTTAACTCCTCCTTGC

clik-race ATTCTCGTCCGCGCTCTCCTTTTCC

Hey1 transgen (ActH1)

b-act-ex1 CAGCTTCTTTGCAGCTCCTT

clik-race ATTCTCGTCCGCGCTCTCCTTTTCC

Hey2

mHey2-real-e3for TGAGAAGACTAGTGCCAACAGC

mHey2-real-e5rev TGGGCATCAAAGTAGCCTTTA

Hprt

mHPRT-real-ex8 TGTTGTTGGATATGCCCTTG

mHPRT-real-ex9 ACTGGCAACATCAACAGGACT

Id4

mId4-real5'neu AGGGTGACAGCATTCTCTGC

mId4-real3'neu TGGAAATGACAAGACGAGACG

Mash1

mMash1_5'real TCTCCTGGGAATGGACTTTG

mMash1_3'real CCCCTGTTTGCTGAGAACAT

Math1

mMath1_5'real GATGGCACAGAAGGACCTGT

mMath1_3'real GGGCATTGTTGTCTCAGT

Math3

mMath3_5'real GCCCAGAGACTGTGGTACTGA

mMath3_3'real_b AGAGCCCGGTCTTCTCTCTT

Neurogenin2

mneurog2_5'real GACATTCCCGGACACACAC

mneurog2_3'real_b CCCAGCAGCATCAGTACCTC

Olig2

mOlig2_5'real CAGCGAGCACCTCAAATCTA

mOlig2_3'real CACAGTCCCTCCTGTGAAGC

Tubb3

mtubb3_5'real GTCAGCATGAGGGAGATCGT

mtubb3_3'real GCAGGTCTGAGTCCCCTACA

2.4.3 RNA Präparation und cDNA Synthese

peqGOLD TriFast (peqLab, Erlangen)

RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Herstellung von Neurosphären

10xPBS: 1,4 M Natriumchlorid
30 mM Kaliumchlorid
63 mM Dinatriumhydrogenphosphat
13 mM Kaliumdihydrogenphosphat

Um Neurosphären zu gewinnen, wird zunächst eine Maus nach 14 Tagen Schwangerschaft (E14.5) durch Begasung mit Kohlendioxid getötet. Daraufhin werden die Embryos entnommen. In einer mit PBS gefüllten Petrischale wird den Embryos der Kopf abgetrennt und anschließend unter dem Mikroskop mit Pinzetten das Gehirn entnommen. Das Gehirn wird nun mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. In einer Zentrifuge werden Gewebe und PBS (3 min bei 1000 rpm) voneinander getrennt. Das Pellet wird in 5 ml Neurobasalmedium (mit 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin; 1% L-Glutamin; 2% B-27 Zusatz; 20 ng/ml EGF und 20 ng/ml FGF) aufgenommen und durch energisches Pipettieren zerkleinert. Die Zellen werden nun in T25 Flaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nur die neuralen Stamm- und Vorläuferzellen können in dem Medium überleben und bilden schwimmende Neurosphären.

3.1.2 Kultivierung und Differenzierung

3.1.2.1 Neurosphäre

Für die Neurosphärenkulturen werden die Primärkulturen an Tag 2 mit weiteren 5 ml Medium in T75 Flaschen umgesetzt. An Tag 5 werden dann die schwimmenden

Neurosphären und das Medium entnommen, abzentrifugiert (3 min bei 1000 rpm) und mit 10 ml frischem Medium in neue T75 Flaschen gebracht. An Tag 7 haben sich die Neurosphären so stark vermehrt, dass die Neurosphärenkulturen passagiert werden müssen. Dabei wird eine Hälfte nach vorsichtigem Zerkleinern der Neurosphären durch Pipettieren in neuen Kulturflaschen weiterkultiviert und die andere Hälfte wird verworfen, eingefroren (in Medium mit 10% DMSO bei -80°C) oder für weitere Experimente verwendet.

Um die Neurosphären in einzelne Zellen zu vereinzeln, wird vorsichtig das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt, nachdem sich die Neurosphären abgesetzt haben. Die Neurosphären werden in 10 ml PBS aufgenommen und abzentrifugiert (5 min bei 1350 rpm). Dann werden die Neurosphären in 1 bis 2 ml AccuMax aufgenommen und für 15 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen der Neurosphäre zu vereinzeln. Durch anschließende Verdünnung mit 10 ml PBS wird die Wirkung von AccuMax herabgesetzt, damit keine Schäden durch zu lange Einwirkzeit an den Zellen entstehen. Das Gemisch wird nun durch ein Zellsieb pipettiert, um nur vereinzelt Zellen zu erhalten. Zellverbände bleiben im Sieb hängen. Die vereinzelt Zellen können nun z.B. für eine Differenzierung weiterverwendet werden.

Differenzierung von Neurosphärenkulturen

Für die Differenzierung muss zunächst die Zellzahl pro ml Ausgangsvolumen bestimmt werden. Dazu wird zunächst ein definiertes Probevolumen mit Trypanblau, das tote Zellen anfärbt, versetzt. Unter dem Mikroskop wird dann die Zahl der lebenden Zellen in dem Probevolumen bestimmt. Nachdem daraus die Zellzahl pro ml Ausgangsvolumen errechnet wurde, werden zunächst $3,5 \times 10^5$ Zellen mit 10 ml Medium (inkl. Wachstumsfaktoren) in eine T25 Zellkulturflasche ausgesät. Nach zwei Tagen Inkubation haben sich kleine Neurosphären gebildet. Diese werden abzentrifugiert (5 min bei 1300 rpm) und in 6 ml frisches Medium (ohne Wachstumsfaktoren, mit 10% Neurocult NSC differentiation supplement) aufgenommen. Durch Pipettieren werden die Zellen etwas vereinzelt und je 1 ml wird in eine Wanne einer 24-Wannen-Platte gegeben. In die Wannen wurde am Tag zuvor jeweils ein steriles Glasplättchen gelegt und über Nacht mit Polyornithin ($20\mu\text{g/ml}$) beschichtet. Nach jeweils 2 Tagen erfolgt ein Mediumwechsel. Nach 7

Tagen haben sich Astrozyten und Neuronen differenziert. Nach spätestens 14 Tagen sollten auch die Oligodendrozyten ausdifferenziert sein.

3.1.2.2 Monolayer

Für die Monolayerkulturen werden die Neurosphären an Tag 3 auf Polyornithin (20µg/ml) beschichtete 6-Wannen-Platten ausgesät. Hierzu werden die Kulturflaschen zunächst aufgestellt. Nachdem sich die Neurosphären abgesetzt haben, wird ungefähr die Hälfte des Mediums entnommen und verworfen. Das restliche Medium mit den unvereinzelten Neurosphären darin wird zusammen mit 3 ml frischem Medium (es findet das gleiche Medium wie bei der Neurosphäregewinnung Anwendung) in eine Wanne eingebracht. Im weiteren Verlauf setzen sich die Neurosphären ab und beginnen einen Zellrasen aus neuralen Stamm- und Vorläuferzellen zu bilden.

Alle zwei bis drei Tage muss das Medium gewechselt werden. Es wird zunächst das alte Medium vorsichtig abpipettiert. Dann werden die Wannen mit PBS gespült um tote und nicht adhärente Zellen zu entfernen. Abschließend wird 3 ml frisches Medium zugegeben.

Spätestens wenn der Wannenboden komplett mit einem Zellrasen bedeckt ist, müssen die Zellen passagiert werden. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen für 30 min mit 1 ml Accutase bei 37°C inkubiert. Der Zellrasen wird dann mit 5 ml PBS vom Grund abgespült. 2 ml des entstandenen Gemischs werden abzentrifugiert (3 min bei 1000 rpm) und der Rest verworfen. Die abzentrifugierten Zellen werden in 3 ml frisches Medium aufgenommen und auf einer neuen Platte ausgesät. Nach 2 Passagen können die Zellen eingefroren oder für weitere Experimente verwendet werden.

Differenzierung von Monolayerkulturen

Um die neuralen Stamm- und Vorläuferzellen einer Monolayerkultur differenzieren zu lassen, werden die Zellen wie beim Passagieren aus den 6-Wannen-Platten abgelöst. Jeweils 1×10^4 Zellen werden in eine Wanne einer 24-Wannen-Platte ausgesät und für 48 Stunden in Medium (inkl. Wachstumsfaktoren) inkubiert. In die Wannen wurde am Tag zuvor jeweils ein steriles Glasplättchen gelegt und über

Nacht mit Polyornithin (20µg/ml) beschichtet. Am Tag 3 wird das Medium abgesaugt und durch Medium mit 10% Neurocult NSC differentiation supplement ersetzt. Nach 7 Tagen haben sich Astrozyten und Neuronen differenziert. Nach spätestens 14 Tagen sollten auch die Oligodendrozyten ausdifferenziert sein.

3.2 Immunfluoreszenz

3.2.1 Tuj1, Gfap und Nestin

MSP buffer: 80 mM PIPES (pH 6,8)
1 mM Magnesiumchlorid
5 mM EGTA
0,5% Triton X 100

Um nach der Differenzierung die Zahl der entstandenen Neuronen und Astrozyten zu bestimmen, werden die Zellen nach 7 Tagen mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Hierzu werden zunächst die Glasplättchen aus den Wannen der 24-Wannen-Platte, in denen die Differenzierung stattgefunden hatte, in neue 24-Wannen-Platten mit jeweils 500 µl PBS pro Wanne überführt. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen 30 sec lang in MSP inkubiert. Anschließend wird das MSP abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Methanol pro Wanne für 3 min bei -20°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (inkl. 0,1% Triton X 100) für jeweils 5 min, werden die Zellen für 10 min mit einer Antikörperverdünnungslösung aus PBS, 0,1% Triton X 100 und 5% Ziegenserum geblockt. Die Primärantikörper Gfap (für Astrozyten) und Tuj1 (für Neuronen) werden 1:600 mit Antikörperverdünnungslösung gemischt. Mit dieser Lösung werden die Zellen für 30 min bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen viermal mit PBS (inkl. 0,1% Triton X 100) gewaschen wurden, werden sie mit dem Sekundärantikörper für 30 min im Dunkeln inkubiert. Dieser Sekundärantikörper bindet jeweils an den Primärantikörper und ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Für Gfap findet Alexa 488 Anti-Rabbit IgG und für Tuj1 Alexa 563 Anti-Mouse IgG oder Cy3 Anti-Mouse IgG (jeweils 1: 200 verdünnt) Verwendung. Nach wiederum viermaligem

Waschen mit PBS (inkl. 0,1% Triton X 100), wird für 1 min DAPI (1:500) hinzugefügt, um die DNA der Zellkerne anzufärben. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und die Glasplättchen werden vorsichtig aus den 24-Wannen-Platten gehoben, um sie mit den Zellen nach unten auf Objektträgern zu platzieren. Auf die Objektträger wurde zuvor jeweils ein Tropfen Dako Fluorescence Mounting Medium gegeben. Am nächsten Tag werden die Glasplättchen mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach Abfotografieren der Proben mithilfe eines Zeiss Axiophot Fluoreszenz Mikroskops, einer CC12 Kamera und der Software Olympus Cell, können die Zellen ausgezählt werden.

Um die Zellen einer undifferenzierten Monolayerkultur anzufärben, wird wie oben beschrieben vorgegangen. Zusätzlich wird für die Färbung der neuralen Stamm- und Vorläuferzellen als Pntikörper Nestin (unverdünnt) und als Sekundärantikörper Cy3 Anti-Mouse IgG (1:200) verwendet.

3.2.2 O4

Um nach der Differenzierung die Zahl der entstandenen Oligodendrozyten zu bestimmen, werden die Zellen nach 14 Tagen mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Hierzu werden zunächst die Glasplättchen aus den Wannen der 24-Wannen-Platte, in denen die Differenzierung stattgefunden hatte, in neue 24-Wannen-Platten mit jeweils 500 µl PBS pro Wanne überführt. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen werden 20 min bei 37°C mit den Primärantikörpern (PBS, 5% Ziegenserum, O4 1:100) inkubiert. Anschließend wird zweimal für je 10 min mit warmem HBSS gewaschen. Nun werden die Zellen 20 min lang in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS werde die Zellen für 10 min mit 5% Ziegenserum geblockt. Als nächstes werden die Zellen für 90 min mit den Sekundärantikörpern (PBS, 5% Ziegenserum, Alexa 563 Anti-Mouse IgG 1:200) inkubiert. Wiederum wird dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 1 min mit DAPI (1:500) gefärbt. Die Zellen werden nochmal mit PBS gewaschen und die Glasplättchen werden vorsichtig aus den 24-Wannen-Platten gehoben, um sie mit den Zellen nach unten auf Objektträgern zu platzieren. Auf die Objektträger wurde zuvor jeweils ein Tropfen Dako Fluorescence Mounting Medium gegeben. Am

nächsten Tag werden die Glasplättchen mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.3 PCR und qRT-PCR

3.3.1 PCR zur Genotypisierung

Lyse Puffer: 0,5% N-Lauroylsarcosin
100 mM Natriumchlorid
5% Chelex-100

Proteinase K Lösung: 20 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA pH 8
10 mg/ml Proteinase K

10xPCR Puffer: 100 mM Tris pH 8,85
500 mM Kaliumchlorid
15 mM Magnesiumchlorid
1% Triton X 100
970 µl des 10xPCR Puffers mit 30 µl BSA [2 mg/ml] mischen

PCR [1 x mix]: 2,5 µl 10xPCR Puffer
0,25 mM dNTPs
0,3 µM Primer 1
0,3 µM Primer 2
0,3 µM Primer 3
3 U Taq
ad 25 µl H₂O

Programm: Schritt 1: 5 min 94°C
Schritt 2: 30 sec 94°C
Schritt 3: 30 sec 60°C

- Schritt 4: 45 sec 72°C
- Schritt 5: 35 mal Schritte 2 bis 4 wiederholen
- Schritt 6: 5 min 72 °C
- Schritt 7: 4 °C

Die präparierten Embryonen werden mittels PCR genotypisiert. Teile des Dottersacks oder des Körpers werden in 100 µl Chelex Puffer und 5 µl Proteinase K Lösung bei 55°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden die Proben für 8 min gekocht und für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. 1 µl Überstand und 24 µl PCR [1 x mix] werden gemischt und die Embryo-DNA wird nach dem oben beschriebenen Programm vervielfältigt.

3.3.2 RNA Präparation

Für die RNA Präparation werden zunächst die gewünschten Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit 500 µl TriFast in einem Eppendorf-Röhrchen inkubiert. Um die RNA zu isolieren, werden zu den nun aufgelösten Zellen 100 µl Chloroform hinzugefügt. Anschließend werden die Zellen für 15 sec geschüttelt und dann für 3 min bei RT belassen. Nun wird für 20 min bei maximaler Umdrehungszahl und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist, wird in ein neues Röhrchen pipettiert. Die RNA wird durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt und das Gemisch wird für 10 min bei RT stehen gelassen. Daraufhin wird wieder mit maximaler Umdrehungszahl bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend wird 5 min lang bei 4°C mit maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Alle Flüssigkeit wird gründlich abgesaugt und das Pellet an der Luft getrocknet, bis sich das Aussehen von weiß auf durchsichtig verändert. Nach Zugabe von 20 µl DEPC-H₂O wird die RNA für 10 min bei 55°C belassen. DEPC sorgt dafür, dass das entstandene Gemisch frei von RNAsen wird und zerfällt anschließend rasch. Nach Mischen der Lösung durch wiederholtes Pipettieren kann die RNA Menge mittels Photometer bestimmt werden. Nun steht die RNA für weitere Versuche bereit oder kann bei -70°C gelagert werden.

3.3.3 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgt nach den Anweisungen des RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit. Die RNA wird zunächst in einer Verdünnung von 2 µg auf 11 µl DEPC-H₂O mit 1 µl Oligo dT Primer gemischt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Dann wird das Gemisch weitere 5 min auf Eis gekühlt. Das Annealing der Primer wird erreicht, indem nach Zugabe von 4 µl Puffer, 2 µl dNTP und 1 µl RNase Inhibitor für 5 min bei 37°C inkubiert wird. Nach Zugabe von 1 µl reverse Transkriptase und Erhöhen der Temperatur auf 42°C startet die cDNA Synthese. Nach 60 min wird die Temperatur für 10 min auf 70°C erhöht, um die Transkription zu stoppen. Die Proben werden auf 4°C abgekühlt und mit 80 µl H₂O verdünnt. Nun kann die cDNA für eine quantitative Realtime-PCR weiterverwendet oder bei –20°C gelagert werden.

3.3.4 qRT-PCR

qRT-PCR [1 x mix]: 2,5 µl 10xPCR Puffer
0,25 mM dNTPs
0,3 µM Primer 1
0,3 µM Primer 2
5 nM FITC
0,75 µl SybrGreen
3,75 U Taq
ad 25 µl H₂O

Programm: Schritt 1: 3 min 94°C
Schritt 2: 60 sec 60°C
Schritt 3: 60 sec 95°C
Schritt 4: 40 mal Schritte 2 und 3 wiederholen
Schritt 5: 45 mal 10 sec 50°C (+1°C pro Zyklus)
Schritt 6: 4 °C

Für die qRT-PCR werden 23µl qRT-PCR [1 x mix] mit 2µl cDNA gemischt. Die cDNA wird nach dem oben beschriebenen Programm vervielfältigt und in Echtzeit mit Hilfe

von Fluoreszenz-Messungen quantifiziert. Als Fluoreszenzfarbstoff findet SybrGreen Verwendung. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die DNA ein und die Fluoreszenz nimmt somit proportional mit der Menge des PCR-Produkts zu.

4 Ergebnisse

4.1 Neurosphärenkulturen

4.1.1 *Hey 1* und *Hey 2* Knockout

Ein Gen gezielt auszuschalten ist eine sehr aufschlussreiche Methode, die Funktion dieses Gens zu untersuchen. Deshalb wurden zunächst Neurosphären von *Hey1*^{-/-} und *Hey2*^{-/-} Mäuseembryonen mit denen von Wildtyp-Mäuseembryonen verglichen. Dazu wurden zwei *Hey1*^{-/-} Neurosphärenzellkulturen, eine *Hey2*^{-/-} Neurosphärenzellkultur und jeweils Kontroll-Neurosphärenzellkulturen etabliert, expandiert und zur Differenzierung gebracht. Nach 7 Tagen wurden ein Teil der Zellen mit den Primärantikörpern Gfap und Tuj1 gefärbt und unter dem Mikroskop fotografiert, um die Anzahl der Neuronen und Astrozyten zu bestimmen. Nach insgesamt 14 Tagen wurden mit dem Primärantikörper O4 auch die Oligodendrozyten gefärbt.

Die genveränderten Neurosphärenkulturen konnten weder makro- noch mikroskopisch von den wildtypischen Neurosphärenkulturen unterschieden werden. Sie wiesen außerdem ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf.

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen konnten die unterschiedlichen Zelltypen unter dem Mikroskop eindeutig identifiziert werden. Aufgrund der Dichte der Zellen, konnte die Zahl der Gfap⁺ Zellen allerdings nur eingeschränkt beurteilt werden (s. Abb. 6). Während es bei den *Hey1*^{-/-} Kulturen gar nicht möglich war, konnte bei den *Hey2*^{-/-} Kulturen die Gfap⁺ Zellen an einigen geeigneten Stellen ausgezählt werden. Da nur sehr wenige Oligodendrozyten entstanden, wurde darauf verzichtet, diese auszuzählen. Es differenzierten bei den *Hey1*^{-/-} Neurosphärenkulturen ca. 6,6% (bei den Kontrollen 6,6%) und bei den *Hey2*^{-/-} Kulturen 10,9% (Kontrollen 8,7%) der Zellen zu Neuronen. Bei den *Hey2*^{-/-} Kulturen differenzierten 77,8% der Zellen zu Astrozyten, bei den Kontrollen im Vergleich dazu 88,2% (s. Tab. 1 und 2).

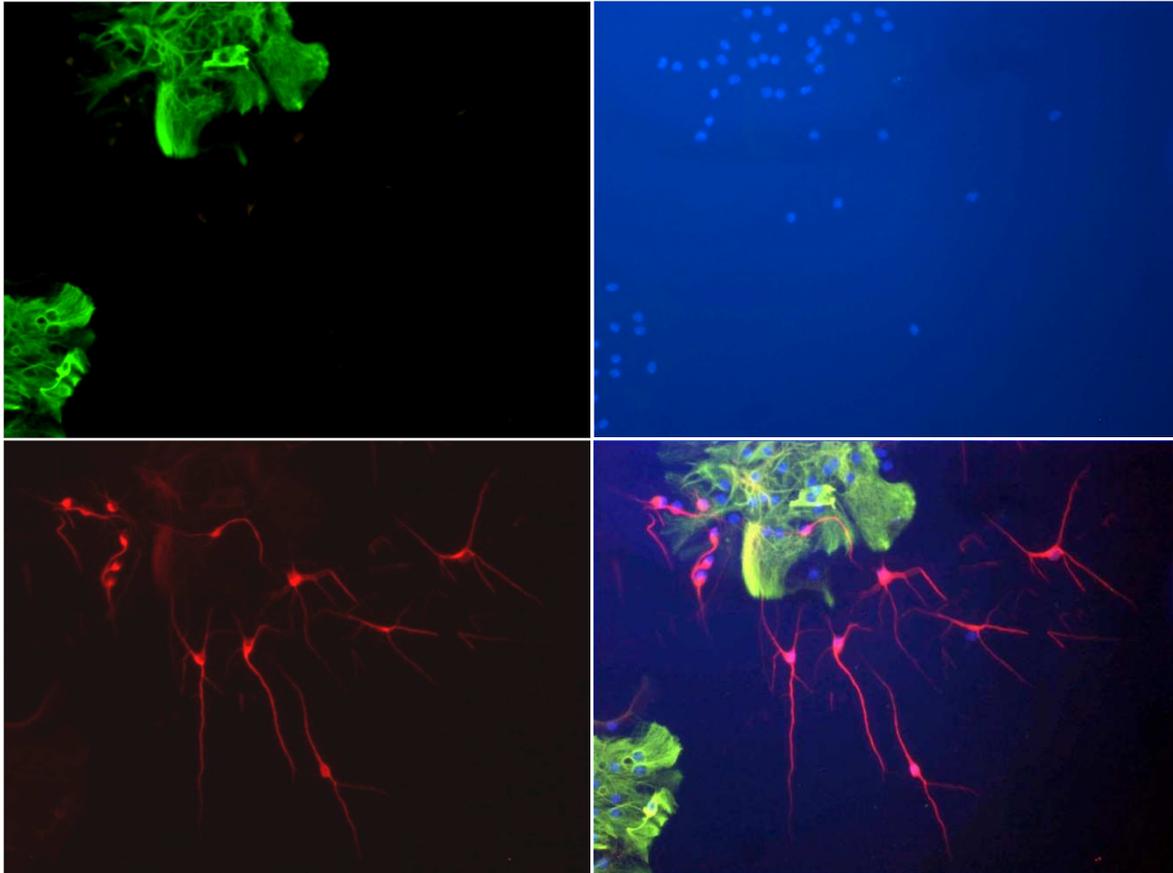


Abb. 6: Differenzierte und gefärbte Neurosphärenzellen

Typischerweise traten Astrozyten in Clustern auf, was die Auszählung erschwerte.

links oben: Gfap+ Zellen (Astrozyten, Sekundärantikörper Alexa 488 Anti-Rabbit IgG)

links unten: Tuj1+ Zellen (Neuronen, Sekundärantikörper Alexa 563 Anti-Mouse IgG)

rechts oben: Färbung mit DAPI (Zellkerne); rechts unten: Overlay

	Anteil der Tuj1 ⁺ Zellen (Neuronen)
Hey1 ^{-/-}	6,7% ± 2,6%
Hey1 ^{-/-}	6,5% ± 2,5%
Kontrolle	6,6% ± 3,0%

Tab. 1: Anzahl der Neuronen nach Differenzierung von Hey1^{-/-} Neurosphären.

Der Anteil der Tuj1⁺ Zellen bei Proben und Kontrolle unterschieden sich nicht. Es wurden pro Kultur 4-5 Ausschnitte (ca. 800-1000 Zellen) unter dem Mikroskop ab fotografiert und ausgezählt. Für jeden ausgezählten Ausschnitt wurde der Prozentsatz der Tuj1⁺ Zellen ermittelt. Dann wurden der Mittelwert der Prozentsätze und die Standardabweichung berechnet.

	Anteil der Tuj1 ⁺ Zellen (Neuronen)	Anteil der Gfap ⁺ Zellen (Astrozyten)
<i>Hey2</i> ^{-/-}	10,9% ± 5,7%	77,8% ± 5,2%
Kontrolle 1	5,9% ± 2,5%	83,8% ± 3,5%
Kontrolle 2	10,5% ± 7,5%	83,7% ± 12,3%
Kontrolle 3	10,5% ± 6,0%	92,6% ± 4,9%
Kontrollen gesamt	8,7% ± 5,5%	88,2% ± 7,2%

Tab. 2: Ergebnis der Differenzierung von *Hey2*^{-/-} Neurosphären.

Die Anzahl der Tuj1⁺ Zellen und der Gfap⁺ Zellen bei Probe und Kontrollen unterschieden sich nur geringfügig. Es wurden pro Kultur für die Neuronen 4-5 Ausschnitte (ca. 500-1000 Zellen) und für die Astrozyten 2-5 andere Ausschnitte (ca. 80-250 Zellen) unter dem Mikroskop abfotografiert und ausgezählt. Für jeden ausgezählten Ausschnitt wurde der Prozentsatz der Tuj1⁺ bzw. Gfap⁺ Zellen ermittelt. Dann wurden der Mittelwert der Prozentsätze und die Standardabweichung berechnet.

4.1.2 Konditionaler *RBP-Jk* Knockout

Da das alleinige Ausschalten der Notch-Zielgene *Hey1* bzw. *Hey2* keinen Einfluss auf die Differenzierungsrichtung der Neurosphärenzellen hatte, sollte als nächstes die Notch-Signalkaskade komplett inhibiert werden. Eine Möglichkeit die Signalkaskade nahezu komplett zu unterbrechen ist ein Knockout von *RBP-Jk*. Dazu wurden *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁺ Mäuseembryonen verwendet, in denen ein konditionaler Knockout von *RBP-Jk* durch OHT möglich ist (s. auch 2.1). Dieser Umweg über den konditionalen Knockout ist notwendig, da ein konstitutiver *RBP-Jk* Knockout früh embryonal letal ist (Conlon et al. 1995; Krebs et al. 2000).

Es wurden drei *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁺ (nach Rekombination *RBP-Jk*^{-/-}) und als Kontrolle drei *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁻ Neurosphärenkulturen, bei denen eine Behandlung mit OHT keine Rekombination zur Folge haben sollte, etabliert. Nach elf Tagen Kultivierung in OHT-haltigem Medium wurde den Kulturen eine Probe entnommen und der Genotyp mittels PCR festgestellt. Diese PCR ergab, dass die Rekombination in den *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁺ Kulturen erfolgreich war und somit *RBP-Jk* in den jetzt *RBP-Jk*^{-/-} Kulturen nahezu komplett ausgeschaltet sein sollte. Außerdem fand wie erwartet in den *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁻ Neurosphärenzellen keine Rekombination statt (s. Abb. 7).

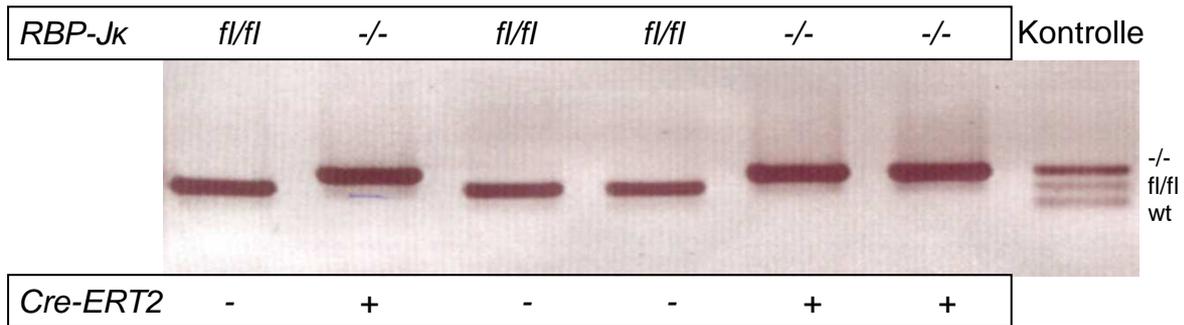


Abb. 7: PCR von drei *RBP-Jk^{fl/fl}/Cre-ERT2⁺* und drei *RBP-Jk^{fl/fl}/Cre-ERT2⁻* Kulturen nach 11 Tagen OHT-Behandlung

Eine Rekombination konnte ausschließlich in *Cre-ERT2⁺* Kulturen beobachtet werden. Das Bild zeigt die Auftrennung des PCR-Produkts nach Größe (bp). Die Kontrolle zeigt die zu erwartenden Banden für wt (165bp), *RBP-Jk^{fl/fl}* (ohne Rekombination, 211bp) und *RBP-Jk^{-/-}* (nach Rekombination, 316bp).

Auch diese Neurosphärenkulturen konnten weder makro- noch mikroskopisch unterschieden werden und wiesen ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten auf.

Die sechs Kulturen wurden nun zur Differenzierung gebracht. An Tag 1 waren noch keine Unterschiede zu beobachten, die Neurosphären beider Genotypen setzten sich ab und begannen zu differenzieren. Ab Tag 2 begannen sich die *RBP-Jk^{-/-}* Zellen vom Untergrund zu lösen. Die Ablösung der Zellen war bei den Kontrollen nicht zu beobachten. Es blieben nach fünf bis acht Tagen nur einige wenige Zellen der *RBP-Jk^{-/-}* Kulturen haften (s. Abb. 8).

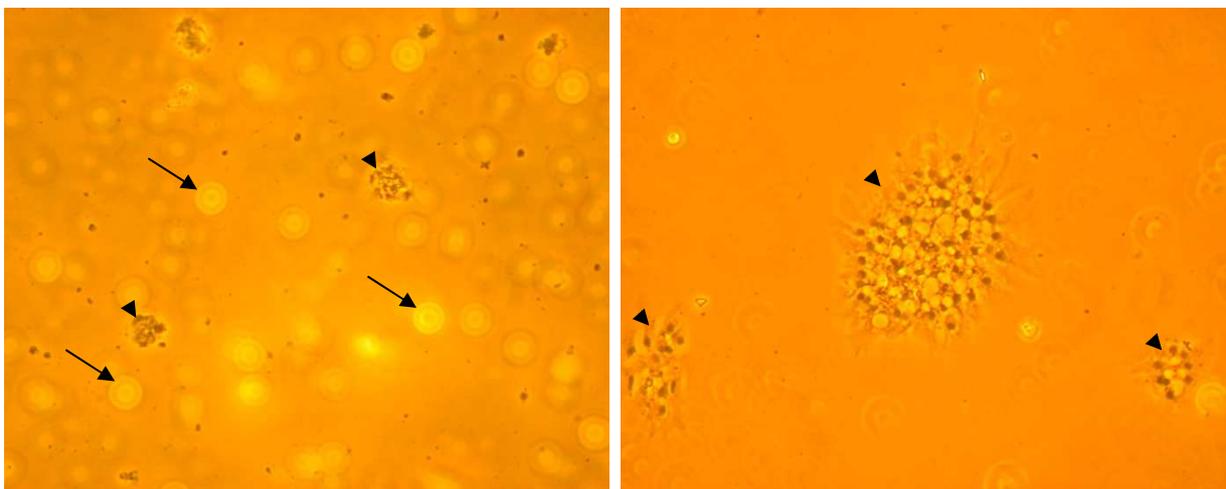


Abb. 8: Tag 5 der Differenzierung von *RBP-Jk^{-/-}* und *RBP-Jk^{fl/fl}*

Links: *RBP-Jk^{-/-}* Zellen lösen sich ab und schwimmen im Medium.
 Rechts: Normale Differenzierung und Haftung von *RBP-Jk^{fl/fl}* Zellen.
 Pfeilspitzen: haftende Zellen, Pfeile: abgelöste Zellen

Nun stellte sich die Frage, ob die Zellen ihre Adhäsionsfähigkeit verloren hatten oder einfach nur abgestorben waren. Dazu wurde eine Trypanblaufärbung der abgelösten

Zellen durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der die defekte Zellmembran toter Zellen durchdringt und als Anion an zytosolische Proteine bindet. Da sich die abgelösten Zellen nicht anfärben ließen, muss davon ausgegangen werden, dass diese zum Zeitpunkt der Färbung lebend waren. Eine zweifache Wiederholung des Experiments mit denselben Zellkulturen führte zum gleichen Ergebnis.

Um der Frage nachzugehen, ob die noch anhaftenden Zellen bei den *RBP-Jk*^{-/-} Zellkulturen tatsächlich auch rekombinierte oder vielleicht übrig gebliebene nicht rekombinierte Zellen sind, wurde eine PCR dieser restlichen Zellen durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass auch diese Zellen *RBP-Jk*^{-/-} waren (s. Abb. 9).

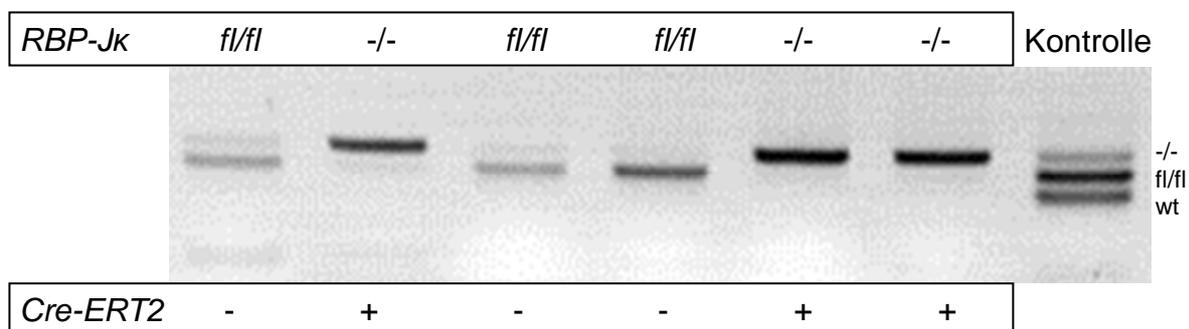


Abb. 9: PCR der noch anhaftenden Zellen nach Differenzierung

Auch die noch verbliebenen anhaftenden Zellen der *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁺ Kulturen sind rekombiniert. Untersucht wurden drei *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁺ und drei *RBP-Jk*^{fl/fl}/*Cre-ERT2*⁻ Kulturen.

4.1.3 Konditionale *Hey1* Überexpression

Nachdem das Ausschalten der Notch-Zielgene *Hey1* bzw. *Hey2* zu keinen offensichtlichen Defekten der neuralen Differenzierung führte, sollte nun untersucht werden, ob vielleicht eine Überexpression von *Hey1* Veränderungen in der Differenzierung hervorruft. Dazu wurden Neurosphären aus *ActH1*⁺/*Cre-ERT2*⁺ Mäuseembryonen gewonnen, in denen eine zusätzliche *Hey1* Expression konditional durch Zugabe von OHT möglich ist (s. auch 2.1).

Es wurden drei *ActH1*⁺/*Cre-ERT2*⁺ Neurosphärenkulturen etabliert. Damit OHT für die Deletion der Stoppkassette gut auf die einzelnen Zellen wirken kann, wurden die Neurosphären zunächst vorsichtig mechanisch und chemisch (mit Accutase®) vereinzelt. Die eine Hälfte einer Zellkultur wurde jeweils mit OHT und als Kontrolle die andere Hälfte ohne OHT kultiviert. Als weitere Kontrollen wurden drei *ActH1*⁻/*Cre-ERT2*⁺ Neurosphärenkulturen generiert und mit OHT behandelt, um eventuelle

Effekte von OHT auf die Ergebnisse auszuschließen. Nach sieben Tagen Kultivierung in Medium (+/-OHT) wurden die Zellen zur RNA Präparation und anschließenden cDNA Synthese geerntet. Um zu erkennen, ob die Rekombination erfolgreich war und um das Ausmaß der *Hey1* Überexpression und die Beeinflussung der Genexpression von endogenem *Hey1* und der *Hes*-Gene *Hes1*, *Hes3*, *Hes5* und *Hes6* durch zusätzliches *Hey1* zu quantifizieren, wurde pro Kultur eine qRT-PCR durchgeführt. Die Expressionswerte der Gene wurden zunächst auf das Gen *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) abgeglichen. *HPRT* ist ein „Haushaltsgen“, welches konstitutiv exprimiert wird und keiner Regulation unterliegt. Die Genexpression dieses Gens sollte also in allen Zellen immer gleich sein. Als nächstes wurden die abgeglichenen Werte von *ActH1*⁺ Zellen ohne OHT-Behandlung gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Expression von *ActH1*⁺ Zellen nach OHT-Behandlung und einer Kontrolle nach OHT-Behandlung als Vielfaches der Expression von *ActH1*⁺ Zellen ohne OHT-Behandlung bestimmt. Aus den errechneten Werten wurden dann der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Die Neurosphärenkulturen zeigten in Aussehen und Wachstumsverhalten keine Unterschiede. Die qRT-PCRs ergaben, dass die Rekombination erfolgreich war und *Hey1* zusätzlich exprimiert wurde. Wie die Ergebnisse aber auch zeigten, war die endogene *Hey1*-Expression bei den Neurosphärenzellen schon so hoch, dass die gesamte *Hey1* Expression nur ungefähr verdreifacht werden konnte. Transgenes *Hey1* schien überdies die Expression von endogenem *Hey1* und der verwandten Gene *Hes3* und *Hes5* hochzuregulieren. Die Expression von *Hes1* und *Hes6* blieben unverändert. Weiterhin ließen die Ergebnisse erkennen, dass transgenes *Hey1* bei *ActH1*⁺ Zellen auch schon ohne OHT-Behandlung exprimiert wurde, wenn auch wesentlich schwächer als nach OHT-Behandlung. In den Kontrollen kam es zu keiner Expression von *ActH1*, die übrigen Expressionswerte der Kontrollen unterschieden sich nicht wesentlich von denen der *ActH1*⁺ Zellen ohne OHT-Behandlung (s. Abb. 10).

Eine weitere Kultivierung und Differenzierung der Zellkulturen erschien nicht sinnvoll, da die Überexpression von *Hey1* nicht ausreichend war.

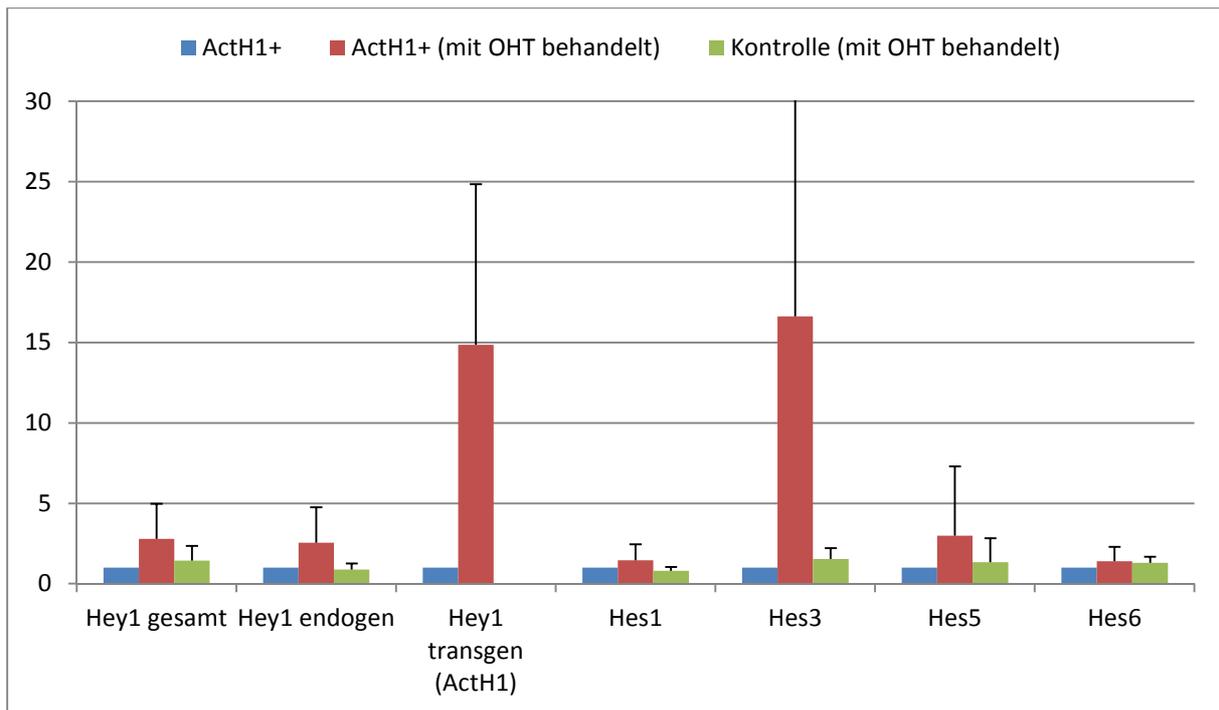


Abb. 10: Genexpression in ActH1⁺ Zellen

Nach Rekombination mit OHT wurde transgenes *Hey1* ca. 15fach stärker exprimiert. Das reichte allerdings nur aus, die gesamte *Hey1* Expression (*Hey1* endogen und *ActH1* zusammen) ungefähr zu verdreifachen. Auch die Expression von endogenem *Hey1*, *Hes3* und *Hes5* wurde in den *ActH1*⁺ Zellen hochreguliert. Gezeigt ist die Genexpression von *ActH1*⁺ Zellen nach OHT-Behandlung und einer Kontrolle nach OHT-Behandlung als Vielfaches der Expression von *ActH1*⁺ Zellen ohne OHT-Behandlung. Die Genexpression von *ActH1*⁺ Zellen ohne OHT-Behandlung wurde gleich 1 gesetzt. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. Mittelwert und Standardabweichung aus je 3 Werten (1 Wert pro Zellkultur). Normalisierung erfolgte durch *Hprt*.

4.1.4 Genexpression in differenzierenden Neurosphärenzellen

Um die Abläufe während der Differenzierung neuraler Stammzellen auf Genebene besser zu verstehen, wurden die Genexpression von Genen, die in der Neuralentwicklung und in der Notch-Signalkaskade eine Rolle spielen, zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe von qRT-PCR quantifiziert. Anschließend sollte die Genexpression in differenzierenden genveränderten Neurosphärenzellen mit Wildtyp-Neurosphärenzellen verglichen werden.

Die Ausdifferenzierung der Zellen zu Astrozyten und Neuronen wird etwa für Tag 7 erwartet, Oligodendrozyten sollten spätestens an Tag 14 ausgereift sein. Um die Genexpression der Neurosphärenzellen zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierung zu bestimmen, wurde in einer ersten Testreihe bei drei Wildtyp-Neurosphärenkulturen an Tag 0 und Tag 3 der Differenzierung jeweils RNA präpariert und anschließend cDNA synthetisiert. Die cDNA wurde dazu verwendet,

die Expression von 13 Genen mittels qRT-PCR zu quantifizieren. Die Versuche wurden für jede Zellkultur einmal wiederholt, so dass für jedes Gen sechs Werte zur Verfügung standen. Diese Werte wurden zunächst auf das „Haushaltsgen“ HPRT abgeglichen. Als nächstes wurden die abgeglichenen Werte von Tag 0 gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Expression an Tag 3 als Vielfaches davon bestimmt. Aus den sechs errechneten Werten wurden dann der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Bis auf *Hes5*, dessen Expression bis Tag 3 um mehr als die Hälfte herunterreguliert wurde, wurden alle betrachteten Gene an Tag 3 stärker exprimiert als an Tag 0 (s. Abb. 11). Während sich die Expression von *Hes1* und *Hey2* nur schwach änderte, stieg die Expression von *Hes3*, *Hes6* und *Hey1* deutlich. Das bHLH Gen *Id4* wurde an Tag 3 ca. 26fach stärker exprimiert als an Tag 0. Die proneuralen Gene *Mash1*, *Math1*, *Math3* und *Neurog2*, die die Differenzierung zu Neuronen ermöglichen, wurden alle um das 2 bis 4fache hochreguliert. Die Expression der Markergene *Blimp* für neurale Vorläuferzellen und *Olig2* für Oligodendrozyten war nur geringfügig verändert.

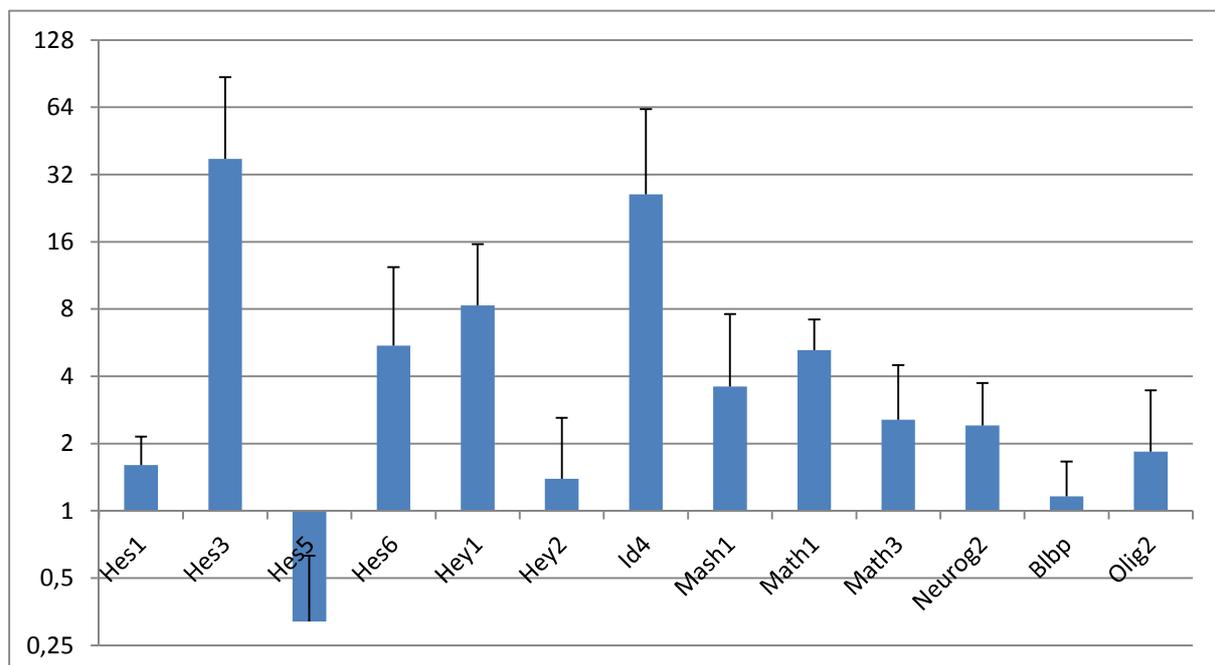


Abb. 11: Genexpression differenzierender Wildtyp-Neurosphärenzellen

Bis auf *Hes5* wurden alle Gene leicht bis deutlich hochreguliert. Gezeigt ist die Genexpression an Tag 3 als Vielfaches der Expression an Tag 0. Mittelwerte aus je 6 Werten (2 qRT-PCRs pro Zellkultur). Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. Die Genexpression an Tag 0 wurde gleich 1 gesetzt und entspricht der x-Achse. Halbblgarithmische Darstellung. Normalisierung erfolgte durch Hprt.

In einer zweiten Testreihe wurden drei andere Wildtyp-Neurosphärenkulturen untersucht. Um die Genexpression auch im späteren Verlauf der Differenzierung zu analysieren, wurde diesmal die Genexpression an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 der Differenzierung bestimmt. Dazu wurde wie bei der ersten Testreihe vorgegangen. Da die Proben einer Neurosphärenzellkulturen für Tag 14 während der cDNA Synthese verloren gingen, besteht der Wert für Tag 14 aus dem dem Mittelwert von nur vier Ergebnissen. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Genen, wurde diesmal die Expression von *Dat1*, *Tubb3* und *Gfap* bestimmt.

Von den *Hey*- und *Hes*-Genen wurden diesmal bis auf *Hes3* und *Hey1*, die leicht hochreguliert wurden, alle herunterreguliert. Besonders stark wurde *Hes5*, das an Tag 0 eine hohe Ausgangsexpression hatte, im Verlauf der Differenzierung reprimiert. Auffällig ist auch, dass die Expression von *Hes6* erst nach Tag 7 abfiel. *Id4* zeigte nur eine leichte Veränderung.

Die proneuralen Gene *Mash1*, *Math1*, *Math3*, *Neurog2* sowie das Dopamin-Transporter-Gen *Dat1* wurden alle herunterreguliert. Bei den linienspezifischen Genen sank die Expression des Markers für neurale Vorläuferzellen *Blbp* und des Oligodendrozytenmarkers *Olig2*, während die Marker für Neuronen (*Tubb3*) und Astrozyten (*Gfap*) deutlich stiegen (s. Abb. 12).

Da die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche teilweise widersprüchlich und schlecht reproduzierbar waren, wurde darauf verzichtet, die Genexpression in differenzierenden Wildtyp-Neurosphärenzellen mit genveränderten Neurosphärenzellen zu vergleichen.

Stattdessen wurde versucht, Monolayerkulturen zu etablieren, damit die Experimente mit diesen wiederholt und fortgeführt werden könnten. Es gibt Hinweise darauf, dass in Monolayerkulturen eine homogenere Population von Stammzellen vorherrscht als in Neurosphären und somit auch die Ergebnisse von Untersuchungen verlässlicher und besser vergleichbar sind (Conti et al. 2005; Pollard et al. 2006).

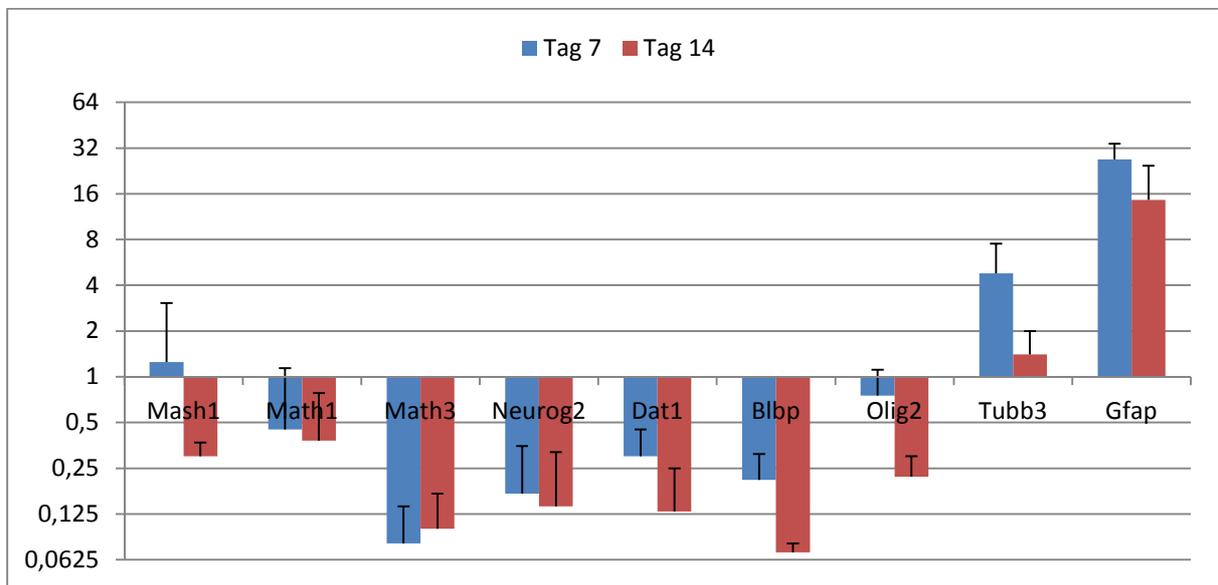
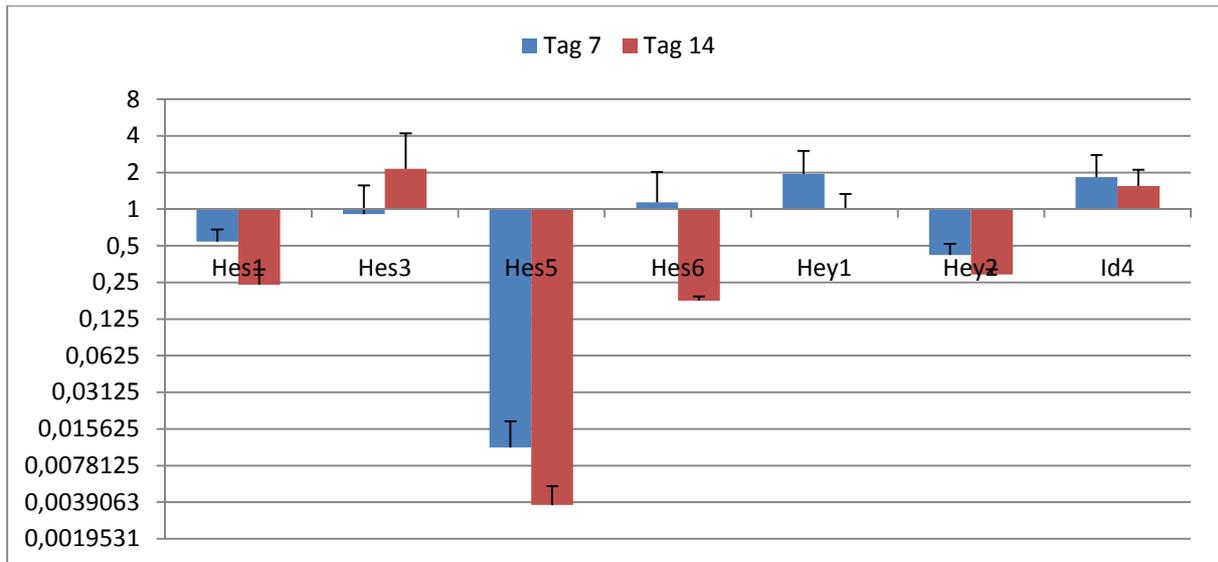


Abb. 12: Veränderung der Genexpression differenzierender Wildtyp-Neurosphärenzellen

Oben: Die Gene der *Hes*- und *Hey*-Familie wurden bis auf *Hes3* und *Hey1*, die leicht hochreguliert wurden, herunterreguliert. *Id4* blieb im Wesentlichen unverändert.

Unten: Die proneuralen Gene wurden an Tag 7 und Tag 14 schwächer exprimiert als an Tag 0. Die Expression der Marker *Blbp* und *Olig2* sank, während die Marker *Tubb3* und *Gfap* deutlich stiegen.

Gezeigt ist die Genexpression an Tag 7 und Tag 14 als Vielfaches der Expression an Tag 0. Mittelwerte an Tag 0 und Tag 7 aus je 6 Werten (2 qRT-PCRs pro Zellkultur), an Tag 14 aus 4 Werten (1 Probe während cDNA-Gewinnung verloren gegangen). Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung. Die Genexpression an Tag 0 wurde gleich 1 gesetzt und entspricht der x-Achse. Halblogarithmische Darstellung. Normalisierung erfolgte durch Hprt.

4.2 Monolayerkulturen

4.2.1 Etablierung

Zunächst wurde versucht, Monolayerkulturen neuraler Stamm- und Vorläuferzellen nach einem Protokoll von Conti et al. zu etablieren. Monolayerkulturen nach diesem Protokoll wurden als homogen beschrieben. Außerdem zeigten die meisten Zellen in den Kulturen Stammzellcharakter und ließen sich zu einem überdurchschnittlichen Anteil von ca. 40% zu Neuronen differenzieren (Conti et al. 2005). Für diese Monolayerkulturen wurden neurale Stamm- und Vorläuferzellen zunächst als Primärkultur in Neurosphärenform gewonnen und kultiviert. Die Neurosphären sollten sich dann auf Gelatine beschichteten Wannen absetzen und in NS-A Medium (inklusive N-2 Zusatz und Wachstumsfaktoren) als Monolayer wachsen. Zum Passagieren wurde PBS oder Trypsin verwendet.

Beim Versuch nach oben beschriebenen Protokoll Monolayerkulturen zu gewinnen, ergaben sich einige Probleme.

Zuerst stellte sich heraus, dass die Zellen der Neurosphären-Primärkulturen in NS-A Medium sehr langsam proliferierten. Dies erschwerte die Kultivierung der Zellen. Deshalb wurde die Proliferation der Primärkultur-Zellen in NS-A Medium (mit N-2 Zusatz und Wachstumsfaktoren) mit der Proliferation in Neurobasalmedium (mit B-27 Zusatz und Wachstumsfaktoren) verglichen. Neurobasalmedium fand schon in den vorherigen Versuchen für die Kultivierung der Neurosphären Verwendung. Die Neurosphären proliferierten in Neurobasalmedium deutlich besser (s. Abb. 13). Auch die aus den Neurosphären gewonnenen Monolayerkulturen wurden weiter in Neurobasalmedium kultiviert und zeigten gute Proliferationsraten.

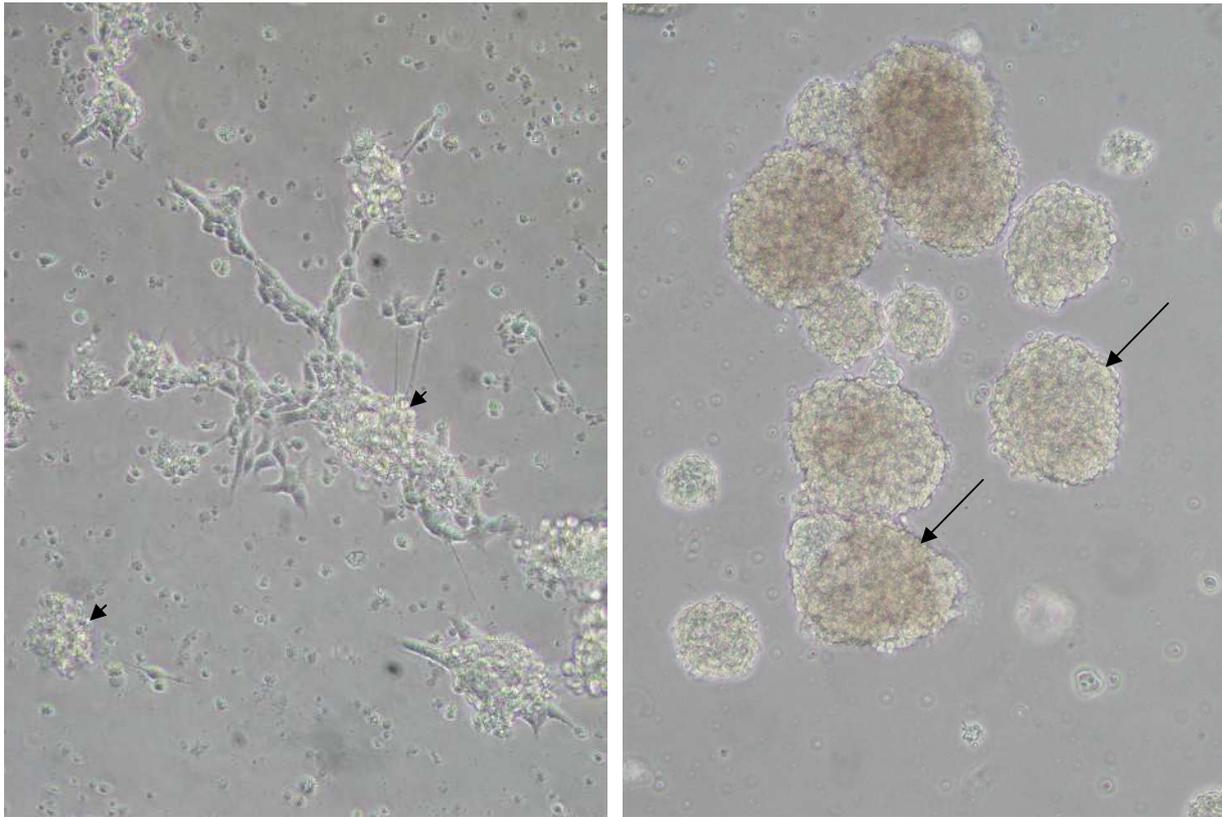


Abb. 13: Primärkultur an Tag 4 nach Präparation in unbeschichteter Kulturflasche

Links: In NS-A Medium (mit N-2 Zusatz) proliferierten die Zellen sehr langsam. Dies führte zu einer geringen Neurosphärendichte und kleinen Neurosphären (Pfeilspitzen: kleine Neurosphären).

Rechts: In Neurobasalmedium (mit B-27 Zusatz) proliferierten die Zellen wesentlich schneller. Dies führte zu einer hohen Neurosphärendichte und großen Neurosphären (Pfeile: große Neurosphären).

Ein zweites Problem stellte die unzureichende Haftung der Zellen auf Gelatine dar, was die Kultivierung erheblich erschwerte und Färbungen unmöglich machte. Außerdem bildeten die nicht haftenden Zellen wieder Neurosphären, was mit einer homogenen Monolayerkultur nicht vereinbar war. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde nach der Methode einer anderen Arbeitsgruppe (Hirsch et al. 2007) eine Beschichtung mit Polyornithin getestet und mit der Beschichtung mit Gelatine verglichen. Es zeigte sich, dass die Zellen bei einer Beschichtung mit Polyornithin wesentlich besser hafteten und keine Neurosphären bildeten (s. Abb. 14).

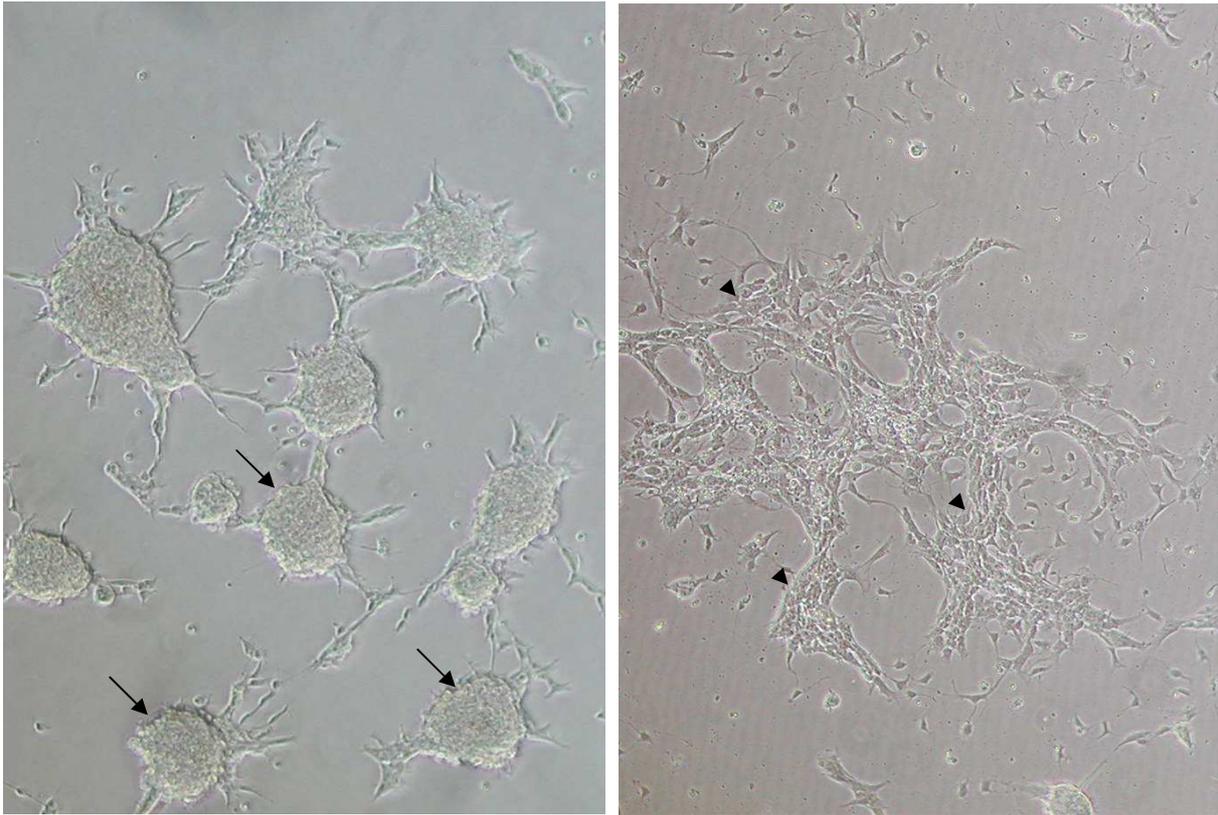


Abb. 14: Neurale Stamm- und Vorläuferzellen als Monolayerkultur bei unterschiedlichen Beschichtungen

Links: Schwache Zellhaftung und Neurosphärenbildung auf Gelatine-Beschichtung.

Rechts: Eine Polyornithin-Beschichtung führte zu guter Zelladhäsion.

Pfeile: locker anhaftende Neurosphären, Pfeilspitzen: Zellen mit guter Adhäsion

Das dritte Problem betraf das Passagieren der Zellen. Zwar war PBS für das Passagieren von Zellen, die nur locker auf Gelatine adhärten, ausreichend, für Zellen hingegen, die auf Polyornithin wuchsen, war PBS zu schwach. Da Trypsin sich als zu aggressiv erwies und die Zellen absterben ließ, wurde das Passagieren mit Accutase[®] (Hirsch et al. 2007) versucht. Eine ausreichend lange Einwirkzeit vorausgesetzt (15 bis 20 Minuten) funktionierte Accutase[®] sehr gut.

Die verschiedenen Methoden wurden mehrmals mit frisch präparierten Zellkulturen getestet und lieferten reproduzierbare Ergebnisse. Es wurden keine Kulturen verwendet, die vorher schon längere Zeit mit einer bestimmten Methode kultiviert wurden, um etwaige Verfälschungen durch eine Gewöhnung der Zellen auszuschließen.

Zusammenfassend erwies sich für die Monolayerkultur eine Polyornithinbeschichtung in Kombination mit Neurobasalmedium (inkl. B-27 Zusatz) und ein Passagieren mit

Accutase[®] am besten. Die Kultivierung der Zellen wurde im Folgenden unter diesen Bedingungen durchgeführt.

4.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Conti et al. wiesen für die Monolayerkulturen ihrer neuralen Stamm- und Vorläuferzellen unter den von ihnen beschriebenen Bedingungen Stammzellcharakter nach (Conti et al. 2005). Da die Bedingungen aber stark verändert werden mussten, um adäquate Monolayerkulturen zu erhalten, stellte sich nun die Frage, ob der Stammzellcharakter der Zellen erhalten blieb.

Um Aufschluss darüber zu gewinnen, welche Arten von Zellen in einer undifferenzierten Monolayerkultur existieren, wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Dazu wurden Zellen einer Monolayerkultur mit den Primärantikörpern Nestin, Gfap und Tuj1 angefärbt. Nestin ist als Marker für neurale Stamm- und Vorläuferzellen bekannt. Die Färbungen zeigten, dass sich fast alle Zellen in einer Monolayerkultur mit Nestin anfärben ließen und keine Zellen Tuj1⁺ und nur einige wenige Zellen Gfap⁺ sind. Genaue Auszählungen waren aufgrund der Zelldichte nicht möglich (s. Abb. 15 und 16). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Zellen in einer Monolayerkultur unter den oben beschriebenen Bedingungen hauptsächlich undifferenziert sind und neuralen Stamm- bzw. Vorläuferzellcharakter haben.

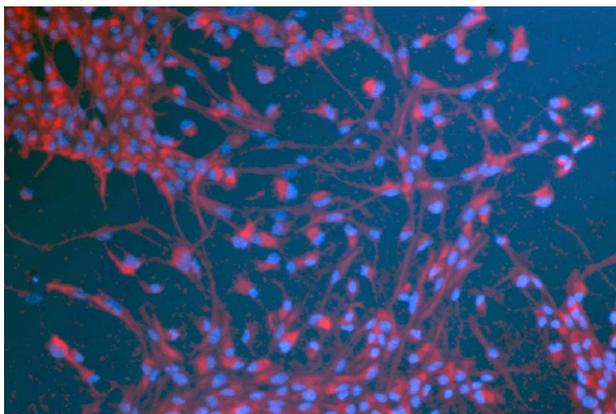


Abb. 15: Färbung einer undifferenzierten Monolayerkultur mit Nestin

Fast alle Zellen sind Nestin⁺ (rot, Sekundärantikörper Cy3 Anti-Mouse IgG) und haben damit vermutlich Stamm- bzw. Vorläuferzellcharakter. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).



Abb. 16: Färbung einer undifferenzierten Monolayerkultur mit Gfap und Tuj1

Nur sehr wenige Zellen sind Gfap⁺ (Astrozyten, grün, Alexa 488 Anti-Rabbit IgG) und keine Tuj1⁺ (Neuronen, rot, Sekundärantikörper Cy3 Anti-Mouse IgG). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

5 Diskussion

5.1 *Hey 1* und *Hey 2* Knockout

Es ist zwar unbestritten, dass der Notch-Signalweg eine wichtige Funktion bei der Neuralentwicklung hat, es ist aber bisher noch unklar, welche genaue Rolle die *Hey*-Gene hierbei spielen.

Eine aussagekräftige Methode, um die Funktion eines Gens für die Differenzierungsrichtung von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen zu bestimmen, ist, dieses im Genom einer Neurosphärenzellkultur gezielt auszuschalten. Deshalb wurden zunächst Neurosphärenzellkulturen mit einem Knockout von *Hey1* bzw. *Hey2* gewonnen und diese anschließend zur Differenzierung gebracht.

Die Tatsache, dass die Überexpression von *Hey1* und *Hey2* in vivo zu den Entwicklungszeitpunkten E13.5 und E15.5 die Neurogenese zu hemmen scheint (Sakamoto et al. 2003), führte zur Vermutung, dass eine Knockout der Gene eventuell die Neurogenese fördert und somit die Zahl der Neuronen steigen lässt. Die Immunfluoreszenzfärbungen der differenzierten *Hey1*^{-/-} und *Hey2*^{-/-} Neurosphärenzellen zeigten allerdings etwa die gleiche Anzahl an Neuronen und Astrozyten im Vergleich zu Wildtyp-Neurosphärenzellen. In den *Hey2*^{-/-} Kulturen wurde immerhin eine leichte Steigerung der Neuronenzahl festgestellt (s. Tab. 2).

Da die Neurosphärenzellen als kleine Neurosphären zur Differenzierung gebracht wurden, traten die Astrozyten und Neuronen in Haufen auf, was die Auszählungen erschwerte bzw. unmöglich machte. Dass nur bestimmte Bereiche einer differenzierten Kultur ausgezählt werden konnten, lässt aber auch die Aussagekraft der Ergebnisse sinken. Eine Methode, die eine homogene Zellverteilung während der Differenzierung ermöglichen würde, könnte zu besser auszählbaren Färbungen führen und etwaige Unterschiede in der entstandenen Zellzahl verlässlicher aufdecken.

Die fehlenden Unterschiede in den ausdifferenzierten Zellen, könnten auch dadurch zustande gekommen sein, dass das jeweils noch vorhandene *Hey*-Gen eventuell die Aufgabe des ausgeschalteten *Hey*-Gens redundant übernahm (Fischer et al. 2004).

Weitere Experimente mit einem Doppelknockout von *Hey1* und *Hey2* könnten hierüber Aufschluss geben.

5.2 Konditionaler *RBP-Jk* Knockout

Da ein Knockout der Notch-Zielgene *Hey1* und *Hey2* keine Unterschiede in der Differenzierungsrichtung von Neurosphärenzellen ergab, wurden als nächstes Zellkulturen mit konditional deletierbaren *RBP-Jk* erzeugt, in denen der Notch-Signalweg nahezu komplett inhibiert werden kann.

Bei *Notch1*^{-/-} Mäusen fiel bei der Kultivierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen, die am elften Tag der Embryonalentwicklung (E10.5) gewonnen wurden, eine deutlich niedrigere Neurosphärenzahl auf als bei Wildtyp-Zellen. Außerdem wurden bei der Kultivierung neuraler *RBP-Jk*^{-/-} Stamm- und Vorläuferzellen (E8.5) keine Neurosphären gebildet (Hitoshi et al. 2002). Gegensätzlich konnten aber aus Hirnregionen mit inaktiviertem *RBP-Jk* (E11.5) besonders viele Neurosphären gewonnen werden. Allerdings fanden sich in diesen Neurosphären mehr neurale Vorläuferzellen und weniger neurale Stammzellen als in den Kontrollen, was die Vermutung nahelegt, dass die neuralen Stammzellen vorzeitig gereift sind. Das würde wiederum zur beschriebenen Aufgabe von Notch bei der Aufrechterhaltung einer neuralen Stammzellpopulation passen (Gao et al. 2009). In den Experimenten zu dieser Arbeit wurden keinerlei Unterschiede in Morphologie und Wachstumsverhalten zwischen *RBP-Jk*^{-/-} und Wildtyp-Neurosphärenkulturen (E14.5) festgestellt. Zum einen könnte es sein, dass Der Notch-Signalweg eher in der frühen Embryonalentwicklung für die Aufrechterhaltung einer neuralen Stammzellpopulation wichtig ist. Zum anderen wurde die Art der Zellen in diesen Neurosphären nicht genauer untersucht und es könnte sein, dass auch diese aus mehr neuralen Vorläuferzellen und weniger Stammzellen aufgebaut waren.

Der Versuch, *RBP-Jk*^{-/-} Neurosphärenzellen differenzieren zu lassen, schlug wiederholt fehl. Schon an Tag 2 der Differenzierung begannen sich die meisten Zellen vom Untergrund abzulösen bis an Tag 8 nur noch wenige Zellen anhafteten. Nun lag zunächst die Vermutung nahe, dass es sich bei den abgelösten Zellen um

abgestorbene Zellen handelte. Überraschenderweise ergab eine Färbung der Zellen mit Trypanblau, dass diese größtenteils lebend waren.

RBP-Jk^{-/-} Zellen waren auch die ersten transgenen Zellen, die als Monolayer kultiviert werden sollten. Hierbei zeigte sich in drei Testreihen, dass sich die meisten Zellen, wie schon die differenzierenden *RBP-Jk^{-/-}* Neurosphärenzellen, nach einigen Tagen vom Polyornithin-beschichteten Untergrund ablösten. Um auszuschließen, dass die noch haftenden Zellen nicht rekombinierte Zellen sind, wurde nach drei Passagierungen von den haftenden Zellen eine PCR durchgeführt, die ergab, dass auch diese Zellen rekombiniert waren.

Es könnte also sein, dass der Notch-Signaltransduktionsweg eine Rolle bei der Zelladhäsion sowohl bei Stamm- und Vorläuferzellen als auch während der Differenzierung spielt. Für die Aufgaben des Notch-Signalwegs bei der Zelladhäsion gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Es ist aber bekannt, dass Notch für die Migrationseigenschaften von Zellen wichtig ist. Es gibt Hinweise darauf, dass eine erhöhte Migrationsfähigkeit mit einer reduzierten Adhäsionsfähigkeit einhergeht. Kürzlich wurde gezeigt, dass im Hornhautepithel, das wie die neuralen Stamm- und Vorläuferzellen vom embryonalen Ektoderm abstammt, die Inhibition des Notch-Signalwegs sowohl zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit als auch zu einer geringeren Adhäsion der Zellen auf Fibronectin-Kollagen beschichteten Platten führte. Eine Aktivierung des Notch-Signalwegs führte hingegen zu einer Steigerung der Zelladhäsion an die beschichteten Platten (Movahedan et al. 2012).

Dass die noch haftenden Zellen auch rekombiniert waren, zeigt, dass es einigen Zellen trotz fehlendem *RBP-Jk* möglich war zu adhären. Weitere Untersuchungen an weiteren Zellkulturen wären nötig, um herauszufinden, ob *RBP-Jk^{-/-}* Neurosphärenzellen generell eine geringere Adhäsionsfähigkeit haben.

5.3 Konditionale *Hey1* Überexpression

Da in der Veröffentlichung von Sakamoto et al. (2003) eine Überexpression der *Hey*-Gene zu einer Hemmung der Neurogenese führte, wurde als nächstes versucht die Expression von *Hey1* zu steigern. Die Expression von *Hey1* in *ActH1⁺/Cre-ERT2⁺* Neurosphärenzellen stieg aber im Vergleich zu Kontrollen trotz erfolgreicher

Rekombination nur ungefähr auf das dreifache. Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es, in Osteoblasten und Osteoklasten *Hey1* bis zu 100fach zu überexprimieren. Die Zellen stammten auch von Mäusen, die zusätzliches *Hey1* unter dem β -*Actin*-Promotor exprimierten (Salie et al. 2010). Da die Expressionswerte von endogenem *Hey1* in den qRT-PCRs schon sehr hoch waren, ist es fraglich, ob eine ausreichend hohe Überexpression von *Hey1* in Neurosphärenzellen überhaupt möglich ist.

Ein weiteres Ziel der qRT-PCRs war es, zu erkennen, ob die zusätzliche transgene *Hey1* Expression, die Expression anderer Gene beeinflusst. Die *Hey*- und *Hes*-Gene sind sich nämlich sehr ähnlich und sind teilweise auch in ihrer Funktion redundant (Fischer et al. 2004). Die zugehörigen Proteine können sogar untereinander Heterodimere bilden (Leimeister et al. 2000). Außerdem könnte transgenes *Hey1* dazu führen, dass die Expression des endogenen *Hey1* im Ausgleich herunterreguliert wird. Überraschenderweise wurde endogenes *Hey1* aber in den rekombinierten Zellen etwas stärker exprimiert. Auch eine leichte Steigerung der *Hes5* und eine deutliche Steigerung der *Hes3* Expression wurden beobachtet. Da die Standardabweichungen dieser Werte allerdings recht hoch waren, bleibt es offen, ob die beobachteten Expressionssteigerungen auf Regulationsmechanismen zurückzuführen sind oder doch Messungenauigkeiten darstellen.

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse auch, dass transgenes *Hey1* bei *ActH1*⁺ Zellen auch schon ohne OHT-Behandlung exprimiert wurde. Möglicherweise banden endogene Steroide an den ERT2-Rezeptor und führten dadurch zu einer Rekombination.

5.4 Genexpression in differenzierenden Neurosphärenzellen

Die bisherigen Experimente zeigten keine klaren Hinweise dafür, dass der Notch-Signalweg und die *Hey*-Gene eine Funktion bei der Neuralentwicklung haben.

Eine weitere Möglichkeit, um die Bedeutung des Notch-Signalwegs zu untersuchen, stellt die Quantifizierung der Genexpression in Neurosphärenzellen während des Differenzierungsprozesses dar. Hierbei können Wildtyp-Zellen zum einen isoliert betrachtet werden, um Aufschluss zu bekommen, welche Gene des Notch-Signalwegs zu welchem Zeitpunkt der Differenzierung hoch- oder herunterreguliert

werden. Zum anderen können Wildtyp-Neurosphärenzellen mit genveränderten Zellen verglichen werden, um zu erkennen, inwiefern z.B. der Knockout eines Gens, die Expression anderer Gene beeinflusst.

Die Ergebnisse der qRT-PCRs von differenzierenden Wildtyp-Neurosphären werden im Folgenden diskutiert.

5.4.1 Gene der *Hes*- und *Hey*-Familie sowie *Id4*

Es wurden die Gene *Hes1*, *Hes3*, *Hes5*, *Hes6*, *Hey1* und *Hey2* sowie *Id4* untersucht. *Hes1*, *Hes3* und insbesondere *Hes5* wurden als wichtige Regulatoren zum Erhalt neuraler Stamm- bzw. Vorläuferzellenzellen beschrieben (Ohtsuka et al. 1999; Hatakeyama et al. 2004; Basak and Taylor 2007; Kageyama et al. 2008). *Hey1* und *Hey2* scheinen die Neurogenese zu hemmen (Sakamoto et al. 2003) und für *Id4* (*Id* steht für Inhibitor of differentiation) wurde beobachtet, dass es in differenzierenden Zellen herunterreguliert wird (Kondo and Raff 2000). *Id4* ist ein bHLH Gen, das für die Differenzierung von Oligodendrozyten wichtig ist und bei dem beobachtet wurde, dass es in differenzierenden Zellen herunterreguliert wird (Kondo and Raff 2000).

So erscheint es schlüssig, dass die Genexpression von *Hes1* und *Hes5*, sowie *Hey2* während der Differenzierung zum Teil deutlich herunterreguliert wurde. Überraschend war hingegen, dass *Hes3*, *Hey1* und *Id4* zunächst bis Tag 3 stark anstiegen, um dann an Tag 7 und 14 etwa wieder den Ausgangswert zu erreichen.

Für *Hes6*, das wahrscheinlich nicht direkt durch Notch reguliert wird, ein Inhibitor von *Hes1* ist und die neuronale Differenzierung zu fördern scheint (Bae et al. 2000; Koyano-Nakagawa et al. 2000), wurde eher eine Herunterregulation erwartet. *Hes6* stieg aber bis Tag 3 zunächst an, die Expression ging im Folgenden dann zurück und erreichte an Tag 14 nur noch ca. ein Viertel des Ausgangswertes.

5.4.2 Proneurale Gene

Weiterhin wurde die Expression der proneuralen Gene *Mash1*, *Math1*, *Math3* und *Neurog2* bestimmt. Diese Gene werden u.a. durch *Hes1* und *Hes5* reguliert, wobei

eine Expression von *Hes1* und *Hes5* die proneuralen Gene blockiert und so verhindert, dass die Zelle differenziert (s. Abb. 4).

Dass alle proneuralen Gene bis zum Tag 3 der Differenzierung auf das 2-5fache anstiegen, passte zu der bisher beschriebenen Funktion der Gene. Dass die Expression an Tag 7 und Tag 14 zum Teil deutlich unter der Ausgangsexpression von Tag 0 lag, könnte dadurch erklärt werden, dass ab Tag 7 fast alle Zellen ausdifferenziert waren und die proneuralen Gene, die ja die Differenzierung fördern, nicht mehr aktiv sein mussten.

5.4.3 Linienspezifische Markergene

Zu den linienspezifischen Markergenen, die quantifiziert wurden, gehören *Blbp*, *Olig2*, *Tubb3* und *Gfap*.

Blbp ist ein direktes Ziel für Notch und außerdem auf radialen Gliazellen exprimiert, weshalb es als Stammzellmarker gilt (Anthony et al. 2005). Die Expression von *Blbp* veränderte sich bis Tag 3 zunächst nicht und wurde dann aber stark herunterreguliert, was darauf hinweisen könnte, dass an Tag 3 noch viele radiale Gliazellen vorhanden sind, die erst später ausdifferenzieren.

Der Oligodendrozytenmarker *Olig2* änderte sich zunächst wenig und wurde an Tag 14 schließlich etwas schwächer exprimiert als an Tag 0. Auch mikroskopisch wurden in den Immunfluoreszenzfärbungen nur wenige Oligodendrozyten beobachtet, die Kulturbedingungen scheinen also eine Differenzierung zu Oligodendrozyten eher zu verhindern.

Tubb3, ein Klasse III β -Tubulin, ist an der Bildung von Mikrotubuli in unreifen Neuronen beteiligt (Katsetos et al. 2003). Es wurde also erwartet, dass *Tubb3* in der frühen Neurogenese hochreguliert würde. Tatsächlich war die Expression an Tag 7 (*Tubb3* wurde an Tag 3 nicht bestimmt) erhöht. Die Expression fiel darauf hin etwa auf das Ausgangsniveau, was darauf schließen lässt, dass die Differenzierung der Neuronen wahrscheinlich spätestens an Tag 14 abgeschlossen ist.

Da während der Differenzierung auch Astrozyten entstanden, stieg die Expression von *Gfap*, ein Marker für diese Zellen.

Auffällig war auch, dass nicht nur der Stammzellmarker *Blbp*, sondern auch alle anderen linienspezifischen Marker schon an Tag 0 stark exprimiert waren. Das weist

darauf hin, dass schon in der undifferenzierten Neurosphärenkultur viele Zellen existierten, die nicht mehr Stammzellcharakter hatten, sondern schon auf einen Zelltyp festgelegt waren.

Wie die Ergebnisse zeigen, war die Expression in den Neurosphärenzellkulturen, die nur drei Tage differenzierten, und den Kulturen, die 14 Tage differenzierten, teilweise gegensätzlich. Ob dies nun auf feste Regulationsmechanismen auf Genebene oder doch eher auf Unterschiede in den Ausgangskulturen zurückzuführen ist, blieb unklar. Auch Widersprüche zu bisher in der Fachliteratur veröffentlichten Ergebnissen lassen sich eventuell mit unterschiedlichen Ausgangskulturen erklären. Insgesamt gibt es eine große Vielzahl verschiedener Protokolle zur Gewinnung neuraler Stammzellen, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse insgesamt erschwert.

5.5 Neurosphären- versus Monolayerkultur

Das System Neurosphärenkultur schien nicht ideal für die bisherigen Experimente geeignet gewesen zu sein. Zum einen gab es Probleme beim Auszählen der Immunfluoreszenzfärbungen der differenzierten Neurosphären. Da sich die Neurosphären zu Beginn der Differenzierung als Ganzes absetzten, waren die Zellen nach Differenzierung meistens so dicht, dass die Bestimmung der Astrozytenzahl nur an wenigen Stellen möglich war. Auch die Verteilung der Neuronen war sehr inhomogen, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zusätzlich erschwerte. Zum anderen lieferten die qRT-PCRs unterschiedlicher Neurosphärenzellkulturen teils schwer nachvollziehbare Expressionsmuster und widersprachen zudem bisherigen Forschungsergebnissen.

Für die Experimente kamen bis zu diesem Zeitpunkt Neurosphärenkulturen zum Einsatz. Die Neurosphären proliferierten aber recht ungleichmäßig in drei Dimensionen, so dass innerhalb einer Kultur immer unterschiedlich große Neurosphären existierten. Weil aber anzunehmen ist, dass sich die Zellen innerhalb einer Neurosphäre gegenseitig stark beeinflussen und nicht jede Zelle im gleichen Entwicklungsstadium ist, erschweren unterschiedlich große Neurosphären die

Vergleichbarkeit (Bez et al. 2003). Eine Neurosphäre besteht zu unklaren Anteilen aus Stamm-, Vorläufer- und differenzierten Zellen wie Gliazellen und Neuronen, wobei wohl nur ein kleiner Teil der Zellen überhaupt Stammzellen sind (Reynolds and Rietze 2005). Außerdem beeinflusst die Position der neuralen Stammzellen in der Neurosphäre Prozesse wie Mitose und Apoptose (Bez et al. 2003). Die Heterogenität der Neurosphären wurde auch auf molekularer Ebene nachgewiesen (Suslov et al. 2002) und die Variabilität zwischen und innerhalb von Neurosphärenkulturen kann zu gegensätzlichen Ergebnissen führen (Morshead et al. 2002). Neurosphärenkulturen sind also sowohl morphologisch als auch funktionell sehr heterogen.

Conti et al. berichteten 2005 von einer Methode, homogene Monolayerkulturen zu schaffen, um die beschriebenen Probleme zu umgehen (Conti et al. 2005). Die Kulturen waren auch nach vielen Passagierungen noch pluripotent. Die Zellen waren unter anderem zu über 95% mit dem Stammzellmarker Nestin anfärbbar und außerdem differenzierte ein überproportional großer Anteil von ca. 40% zu Neuronen. Deshalb wurde versucht, nach diesem Protokoll Monolayerkulturen zu etablieren.

Das Protokoll musste allerdings an einigen Stellen angepasst werden. Erstens proliferierten die Zellen im beschriebenen Medium nur sehr langsam, deswegen wurde das Nährmedium geändert. Zweitens konnten die Zellen auf den Gelatine beschichteten Platten nicht adäquat haften, weshalb die Platten im Folgenden mit Polyornithin beschichtet wurden. Es bleibt letztendlich offen, warum es nicht gelang Monolayerkulturen nach dem Protokoll von Conti et al. zu etablieren.

Mit den Veränderungen des Protokolls war es nun zwar möglich, Monolayerkulturen zu gewinnen, jedoch haben die Änderungen wahrscheinlich auch Einfluss auf die Homogenität und den Stammzellcharakter der Zellen. Ein veränderter Untergrund durch die Polyornithinbeschichtung, könnte z.B. einige Zellen in der Kultur schon in eine bestimmte Richtung vordifferenzieren lassen. Polyornithinbeschichtungen finden schließlich auch häufig Verwendung für die Differenzierung von Zellen. Ein anderes Nährmedium könnte auch Auswirkungen auf die Entwicklung der Zellen haben.

Auch beim selbst etablierten Protokoll waren fast alle Zellen mit Nestin anfärbbar. Allerdings ist Nestin als Stammzellmarker nicht unumstritten. Es wurde gezeigt, dass sich Gfap⁺ Vorläuferzellen zum Teil mit Nestin anfärben lassen. Das bedeutet, dass wohl auch Zellen, die schon in die gliale Richtung vordifferenziert sind Nestin⁺

bleiben können. Es ist also möglich, dass Nestin nicht nur multipotente Stammzellen, sondern teilweise auch gliale Vorläuferzellen anfärbt (Sergent-Tanguy et al. 2006). Um den Stammzellcharakter klar zu belegen, sind weitere Experimente notwendig, die zeigen, dass die Zellen zum einen multipotent sind und sich in die verschiedenen neuronalen Zelltypen (Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten) differenzieren lassen und zum anderen diese Fähigkeit auch über längere Zeit beibehalten. Anschließend könnten die bisherigen Experimente wiederholt bzw. fortgeführt werden, um weitere Einblicke in die Funktion des Notch-Signalwegs und insbesondere der *Hey*-Gene bei der Neuralentwicklung zu bekommen.

6 Zusammenfassung

Die Neuralentwicklung wird durch eine Vielzahl von Genen reguliert. Hierbei scheint der Notch-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle zu spielen. Die primären Zielgene der Notch-Signalkaskade sind die *Hes*- und *Hey*-Gene. Die genaue Bedeutung der Signalkaskade, der *Hes*- und insbesondere der *Hey*-Gene für den Differenzierungsprozess neuraler Stamm- und Vorläuferzellen ist noch nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Aufgaben von Notch und der *Hey*-Gene beim Differenzierungsprozess neuraler Stamm- und Vorläuferzellen genauer zu untersuchen.

Da das gezielte Ausschalten eines Gens eine aussagekräftige Methode zur Erforschung seiner Funktion ist, wurden zunächst neurale Stamm- und Vorläuferzellen in Form von sogenannten Neurosphären von *Hey1*^{-/-} und *Hey2*^{-/-} Mäuseembryonen mit denen von Wildtyp-Mäuseembryonen verglichen. Dabei differenzierten bei den *Hey1*^{-/-} Neurosphärenkulturen ca. 6,6% (bei den Kontrollen 6,6%) und bei den *Hey2*^{-/-} Kulturen 10,9% (Kontrollen 8,7%) der Zellen zu Neuronen. Eine komplette Inhibierung der Notch-Signalkaskade wurde durch das Etablieren von *RBP-Jk*^{-/-} Kulturen erreicht. *RBP-Jk*^{-/-} Zellen waren jedoch während der Differenzierung nur noch zu einem kleinen Teil in der Lage zu adhären, was weitere Experimente mit den Zellen unmöglich machte. Als nächstes sollten Neurosphären mit einer Überexpression von *Hey1* mit Wildtyp-Neurosphären verglichen werden. Es gelang allerdings aufgrund einer schon hohen Ausgangsexpression von *Hey1* in Neurosphären nur, die Expression zu verdreifachen, was für weitere Experimente nicht ausreichend schien.

Um die Prozesse, die auf Genebene während der Differenzierung neuraler Stamm- und Vorläuferzellen ablaufen, besser zu verstehen, wurden die Expression von Genen, die in der Neuralentwicklung und in der Notch-Signalkaskade eine Rolle spielen, in Wildtyp-Neurosphärenzellen mittels qRT-PCR zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten quantifiziert. Die Genexpression von *Hes1* und *Hes5*, sowie *Hey2* wurde während der Differenzierung zum Teil deutlich herunterreguliert. Die Gene *Hes3*, *Hey1* und *Id4* hingegen stiegen zunächst bis Tag 3 stark an, um dann an Tag 7 und 14 etwa wieder den Ausgangswert zu erreichen. Die Regulation der Gene war insgesamt recht uneinheitlich und nicht immer nachvollziehbar. Da

diese teils widersprüchlichen Ergebnisse auf die vorgegebene Heterogenität einer Neurosphärenkultur zurückzuführen sein könnten, wurde nach einer Alternative zur Neurosphärenkultur gesucht.

Deshalb wurde im Weiteren versucht homogene Monolayerkulturen nach einem Protokoll von Conti et al. (2005) zu etablieren. Das Protokoll musste aber an einigen Stellen angepasst werden, um adäquate Kulturen zu erhalten. Da die Monolayerkulturen auf Gelatine nicht gut hafteten wurde auf eine Polyornithin-Beschichtung umgestellt. Außerdem wurde das NS-A Medium mit N-2 Zusatz aufgrund schlechter Proliferation der Zellen auf Neurobasalmedium mit B-27 Zusatz umgestellt. Färbungen dieser Monolayerkulturen zeigten, dass sich fast alle Zellen mit dem Stammzellmarker Nestin anfärben ließen und keine Zellen Tuj1⁺ (Neuronen) und nur einige wenige Zellen Gfap⁺ (Astrozyten) waren. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Zellen in einer Monolayerkultur unter den oben beschriebenen Bedingungen hauptsächlich undifferenziert sind und neuralen Stamm- bzw. Vorläuferzellcharakter haben.

7 Literaturverzeichnis

- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo and A. D. Tramontin (2001). "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells." Nature reviews Neuroscience **2**(4): 287-293.
- Anthony, T. E., H. A. Mason, T. Gridley, G. Fishell and N. Heintz (2005). "Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells." Genes & development **19**(9): 1028-1033.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.
- Bae, S., Y. Bessho, M. Hojo and R. Kageyama (2000). "The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation." Development **127**(13): 2933-2943.
- Basak, O. and V. Taylor (2007). "Identification of self-replicating multipotent progenitors in the embryonic nervous system by high Notch activity and Hes5 expression." The European journal of neuroscience **25**(4): 1006-1022.
- Bessho, Y., H. Hirata, Y. Masamizu and R. Kageyama (2003). "Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock." Genes & development **17**(12): 1451-1456.
- Bez, A., E. Corsini, D. Curti, M. Biggiogera, A. Colombo, R. F. Nicosia, S. F. Pagano and E. A. Parati (2003). "Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization." Brain research **993**(1-2): 18-29.
- Conlon, R. A., A. G. Reaume and J. Rossant (1995). "Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites." Development **121**(5): 1533-1545.
- Conti, L., S. M. Pollard, T. Gorba, E. Reitano, M. Toselli, G. Biella, Y. Sun, S. Sanzone, Q. L. Ying, E. Cattaneo and A. Smith (2005). "Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell." PLoS biology **3**(9): e283.
- de la Pompa, J. L., A. Wakeham, K. M. Correia, E. Samper, S. Brown, R. J. Aguilera, T. Nakano, T. Honjo, T. W. Mak, J. Rossant and R. A. Conlon (1997). "Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis." Development **124**(6): 1139-1148.
- Ellisen, L. W., J. Bird, D. C. West, A. L. Soreng, T. C. Reynolds, S. D. Smith and J. Sklar (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." Cell **66**(4): 649-661.
- Faigle, R. and H. Song (2012). "Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis." Biochimica et biophysica acta **1830**(2): 2435-2448.

- Fischer, A. and M. Gessler (2003). "Hey genes in cardiovascular development." Trends in cardiovascular medicine **13**(6): 221-226.
- Fischer, A. and M. Gessler (2007). "Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors." Nucleic acids research **35**(14): 4583-4596.
- Fischer, A., N. Schumacher, M. Maier, M. Sendtner and M. Gessler (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes & development **18**(8): 901-911.
- Fisher, A. and M. Caudy (1998). "The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions." BioEssays **20**(4): 298-306.
- Fujita, S. (2003). "The discovery of the matrix cell, the identification of the multipotent neural stem cell and the development of the central nervous system." Cell structure and function **28**(4): 205-228.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-1438.
- Gao, F., Q. Zhang, M. H. Zheng, H. L. Liu, Y. Y. Hu, P. Zhang, Z. P. Zhang, H. Y. Qin, L. Feng, L. Wang, H. Han and G. Ju (2009). "Transcription factor RBP-J-mediated signaling represses the differentiation of neural stem cells into intermediate neural progenitors." Molecular and cellular neurosciences **40**(4): 442-450.
- Gessler, M., K. P. Knobloch, A. Helisch, K. Amann, N. Schumacher, E. Rohde, A. Fischer and C. Leimeister (2002). "Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2 ^{-/-} mice." Current biology **12**(18): 1601-1604.
- Gilbert, S. (1997). "Developmental Biology." Sinauer Associates, Inc., Sunderland MA.
- Glaser, T., S. M. Pollard, A. Smith and O. Brustle (2007). "Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells." PloS one **2**(3): e298.
- Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." Nature reviews Molecular cell biology **6**(10): 777-788.
- Grandbarbe, L., J. Bouissac, M. Rand, M. Hrabe de Angelis, S. Artavanis-Tsakonas and E. Mohier (2003). "Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process." Development **130**(7): 1391-1402.
- Guruharsha, K. G., M. W. Kankel and S. Artavanis-Tsakonas (2012). "The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway." Nature reviews Genetics **13**(9): 654-666.

- Hatakeyama, J., Y. Bessho, K. Katoh, S. Ookawara, M. Fujioka, F. Guillemot and R. Kageyama (2004). "Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation." Development **131**(22): 5539-5550.
- Hirabayashi, Y. and Y. Gotoh (2005). "Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain." Neuroscience research **51**(4): 331-336.
- Hirsch, C., L. M. Campano, S. Wöhrle and A. Hecht (2007). "Canonical Wnt signaling transiently stimulates proliferation and enhances neurogenesis in neonatal neural progenitor cultures." Experimental cell research **313**(3): 572-587.
- Hitoshi, S., T. Alexson, V. Tropepe, D. Donoviel, A. J. Elia, J. S. Nye, R. A. Conlon, T. W. Mak, A. Bernstein and D. van der Kooy (2002). "Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells." Genes & development **16**(7): 846-858.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, T. Ohtsuka, K. Takao, T. Miyakawa, M. Yamaguchi, K. Mori, T. Ikeda, S. Itohara and R. Kageyama (2008). "Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain." Nature neuroscience **11**(10): 1153-1161.
- Ishibashi, M., S. L. Ang, K. Shiota, S. Nakanishi, R. Kageyama and F. Guillemot (1995). "Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects." Genes & development **9**(24): 3136-3148.
- Isidor, B., P. Lindenbaum, O. Pichon, S. Bezieau, C. Dina, S. Jacquemont, D. Martin-Coignard, C. Thauvin-Robinet, M. Le Merrer, J. L. Mandel, A. David, L. Faivre, V. Cormier-Daire, R. Redon and C. Le Caignec (2011). "Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis." Nature genetics **43**(4): 306-308.
- Iso, T., L. Kedes and Y. Hamamori (2003). "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." Journal of cellular physiology **194**(3): 237-255.
- Jalali, A., A. G. Bassuk, L. Kan, N. Israsena, A. Mukhopadhyay, T. McGuire and J. A. Kessler (2011). "HeyL promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells." Journal of neuroscience research **89**(3): 299-309.
- Jensen, J. B. and M. Parmar (2006). "Strengths and limitations of the neurosphere culture system." Molecular neurobiology **34**(3): 153-161.
- Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cecillion, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E. A. Cabanis, M. M. Ruchoux, J. Weissenbach, J. F. Bach, M. G. Bousser and E. Tournier-Lasserre (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." Nature **383**(6602): 707-710.

- Kageyama, R., T. Ohtsuka, J. Hatakeyama and R. Ohsawa (2005). "Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation." Experimental cell research **306**(2): 343-348.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka and T. Kobayashi (2008). "Roles of Hes genes in neural development." Development, growth & differentiation **50**(2): 97-103.
- Katsetos, C. D., M. M. Herman and S. J. Mork (2003). "Class III beta-tubulin in human development and cancer." Cell motility and the cytoskeleton **55**(2): 77-96.
- Kondo, T. and M. Raff (2000). "The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation." The EMBO journal **19**(9): 1998-2007.
- Koyano-Nakagawa, N., J. Kim, D. Anderson and C. Kintner (2000). "Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation." Development **127**(19): 4203-4216.
- Krebs, L. T., Y. Xue, C. R. Norton, J. R. Shutter, M. Maguire, J. P. Sundberg, D. Gallahan, V. Closson, J. Kitajewski, R. Callahan, G. H. Smith, K. L. Stark and T. Gridley (2000). "Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice." Genes & development **14**(11): 1343-1352.
- Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla (2009). "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." Annual review of neuroscience **32**: 149-184.
- Kusumi, K., E. S. Sun, A. W. Kerrebrock, R. T. Bronson, D. C. Chi, M. S. Bulotsky, J. B. Spencer, B. W. Birren, W. N. Frankel and E. S. Lander (1998). "The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue Dll3 and initiation of early somite boundaries." Nature genetics **19**(3): 274-278.
- Leimeister, C., K. Dale, A. Fischer, B. Klamt, M. Hrabe de Angelis, F. Radtke, M. J. McGrew, O. Pourquie and M. Gessler (2000). "Oscillating expression of c-Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors." Developmental biology **227**(1): 91-103.
- Li, L., I. D. Krantz, Y. Deng, A. Genin, A. B. Banta, C. C. Collins, M. Qi, B. J. Trask, W. L. Kuo, J. Cochran, T. Costa, M. E. Pierpont, E. B. Rand, D. A. Piccoli, L. Hood and N. B. Spinner (1997). "Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1." Nature genetics **16**(3): 243-251.
- Louvi, A. and S. Artavanis-Tsakonas (2012). "Notch and disease: a growing field." Seminars in cell & developmental biology **23**(4): 473-480.
- Lutolf, S., F. Radtke, M. Aguet, U. Suter and V. Taylor (2002). "Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum." Development **129**(2): 373-385.

- Majewski, J., J. A. Schwartzentruber, A. Caqueret, L. Patry, J. Marcadier, J. P. Fryns, K. M. Boycott, L. G. Ste-Marie, F. E. McKiernan, I. Marik, H. Van Esch, J. L. Michaud and M. E. Samuels (2011). "Mutations in NOTCH2 in families with Hajdu-Cheney syndrome." Human mutation **32**(10): 1114-1117.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Molecular and cellular biology **20**(2): 429-440.
- Miller, F. D. and A. S. Gauthier (2007). "Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex." Neuron **54**(3): 357-369.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annual review of neuroscience **28**: 223-250.
- Morshead, C. M., P. Benveniste, N. N. Iscove and D. van der Kooy (2002). "Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations." Nature medicine **8**(3): 268-273.
- Movahedan, A., M. Majdi, N. Afsharkhamseh, H. M. Sagha, N. S. Saadat, K. Shalileh, B. Y. Milani, H. Ying and A. R. Djalilian (2012). "Notch Inhibition during Corneal Epithelial Wound Healing Promotes Migration." Investigative ophthalmology & visual science **53**(12): 7476-7483.
- Muller, U., P. Winter and M. B. Graeber (2012). "A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease." Lancet neurology **12**(2): 129-130.
- Nakhai, H., J. T. Siveke, B. Klein, L. Mendoza-Torres, P. K. Mazur, H. Algul, F. Radtke, L. Strobl, U. Zimmer-Strobl and R. M. Schmid (2008). "Conditional ablation of Notch signaling in pancreatic development." Development **135**(16): 2757-2765.
- Oda, T., A. G. Elkahloun, B. L. Pike, K. Okajima, I. D. Krantz, A. Genin, D. A. Piccoli, P. S. Meltzer, N. B. Spinner, F. S. Collins and S. C. Chandrasekharappa (1997). "Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome." Nature genetics **16**(3): 235-242.
- Ohtsuka, T., M. Ishibashi, G. Gradwohl, S. Nakanishi, F. Guillemot and R. Kageyama (1999). "Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation." The EMBO journal **18**(8): 2196-2207.
- Pollard, S. M., L. Conti, Y. Sun, D. Goffredo and A. Smith (2006). "Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain." Cerebral cortex **16**(1): 112-120.
- Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis and S. Temple (2000). "Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells." Neuron **28**(1): 69-80.
- Reynolds, B. A. and R. L. Rietze (2005). "Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship." Nature methods **2**(5): 333-336.

- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.
- Rowitch, D. H. (2004). "Glial specification in the vertebrate neural tube." Nature reviews Neuroscience **5**(5): 409-419.
- Sakamoto, M., H. Hirata, T. Ohtsuka, Y. Bessho and R. Kageyama (2003). "The basic helix-loop-helix genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain." The Journal of biological chemistry **278**(45): 44808-44815.
- Salie, R., M. Kneissel, M. Vukevic, N. Zamurovic, I. Kramer, G. Evans, N. Gerwin, M. Mueller, B. Kinzel and M. Susa (2010). "Ubiquitous overexpression of *Hey1* transcription factor leads to osteopenia and chondrocyte hypertrophy in bone." Bone **46**(3): 680-694.
- Sergent-Tanguy, S., D. C. Michel, I. Neveu and P. Naveilhan (2006). "Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation." Journal of neuroscience research **83**(8): 1515-1524.
- Shen, J., R. T. Bronson, D. F. Chen, W. Xia, D. J. Selkoe and S. Tonegawa (1997). "Skeletal and CNS defects in *Presenilin-1*-deficient mice." Cell **89**(4): 629-639.
- Simpson, M. A., M. D. Irving, E. Asilmaz, M. J. Gray, D. Dafou, F. V. Elmslie, S. Mansour, S. E. Holder, C. E. Brain, B. K. Burton, K. H. Kim, R. M. Pauli, S. Aftimos, H. Stewart, C. A. Kim, M. Holder-Espinasse, S. P. Robertson, W. M. Drake and R. C. Trembath (2011). "Mutations in *NOTCH2* cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss." Nature genetics **43**(4): 303-305.
- Suslov, O. N., V. G. Kukekov, T. N. Ignatova and D. A. Steindler (2002). "Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(22): 14506-14511.
- Vooijs, M., J. Jonkers and A. Berns (2001). "A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that *LoxP* recombination is position dependent." EMBO reports **2**(4): 292-297.
- Yoon, K. and N. Gaiano (2005). "Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants." Nature neuroscience **8**(6): 709-715.
- Yoshimatsu, T., D. Kawaguchi, K. Oishi, K. Takeda, S. Akira, N. Masuyama and Y. Gotoh (2006). "Non-cell-autonomous action of *STAT3* in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex." Development **133**(13): 2553-2563.

Yun, K., S. Fischman, J. Johnson, M. Hrabec de Angelis, G. Weinmaster and J. L. Rubenstein (2002). "Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon." Development **129**(21): 5029-5040.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
E14.5	embryonic day 14.5
P8	postnatal day 8
PCR	polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
U	Unit
wt	Wildtyp

Danksagung

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden zwischen April 2005 und März 2006 am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Manfred Gessler und Dr. Andreas Fischer durchgeführt.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler für seine jederzeit äußerst freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Andreas Fischer für seine stets geduldige Betreuung.

Ermöglicht wurde diese Arbeit nur durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Albrecht Müller. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei Dr. Timo Christoph Dinger, der mich in die Welt der neuronalen Stammzellen einführte.

Mein Dank gilt allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gessler für die sehr gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglichten und mir jederzeit zur Seite standen.