

原钙黏附蛋白 18b 基因抑制对斑马鱼 神经系统发育的影响 *

贡月波 蒋 璆 胡晶莹 王跃祥 宋后燕 **

(复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

摘要 原钙黏附蛋白 18b(Protocadherin18b, Pcdh18b)属于钙黏附蛋白家族成员. 为了研究 pcdh18b 基因抑制对斑马鱼神经系统发育的影响, 针对 pcdh18b 的翻译起始位点设计一个吗啡啉修饰的反义寡核苷酸抑制其表达, 在斑马鱼受精卵一到二细胞期注射并且验证其有效性. 注射后用原位杂交和吖啶橙染色检测神经系统的表型和标志基因的表达. pcdh18b 下调使神经前体细胞的标志基因 neurog1、神经元标志基因 elavl3 和神经胶质细胞标志基因 gfap 的表达均出现下调, 中后脑边界的标志基因 pax2a 和 wnt1 表达减弱并出现神经管分叉现象, 同时与后脑分节相关的基因 krox20 表达减少. 吖啶橙染色显示 pcdh18b 下调后斑马鱼中脑、后脑及中后脑边界细胞凋亡增多. 这些结果表明 pcdh18b 抑制导致了斑马鱼神经系统发育的异常.

关键词 原钙黏附蛋白 18b, 斑马鱼, 神经系统发育, 整体原位杂交

学科分类号 Q3, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00084

钙黏附蛋白家族(cadherin family)为一类钙离子依赖型黏附分子, 均为单链跨膜糖蛋白, 主要参与介导特定组织或器官同型细胞间黏附, 对胚胎发育中的细胞识别、迁移、通讯和组织分化及中枢神经系统中神经回路的形成具有重要作用^[1-2]. 它们由一个含 5 个串联重复单位(每个重复单位约 100 个氨基酸)的胞外结构域、一个跨膜结构域和一个很保守的胞内结构域(约 200 个氨基酸)构成^[3]. 根据它们的胞外结构域和胞内结构域的不同, 将钙黏附蛋白家族分为 4 类: 经典的钙黏附蛋白(classical cadherins)、桥粒钙黏附蛋白(desmosomal cadherins)、钙黏附蛋白相关蛋白(cadherin-related proteins)和原钙黏附蛋白(protocadherins, Pcdh)^[4].

原钙黏附蛋白是一种具有新特性的钙黏蛋白, 是钙黏蛋白超家族中一个最大的亚族. 目前为止, 在哺乳动物中发现有 60 余种原钙黏附蛋白^[5]. 原钙黏附蛋白同样也具有三个结构域, 但胞外结构域一般有 5 个以上串联重复单位组成, 另外其胞外结构域并不直接与 β -连环蛋白(β -catenin)相互作用, 这与经典的钙黏附蛋白不相同^[6-8]. 有研究表明,

原钙黏附蛋白在神经元发育和突触形成中有重要的作用^[9-10].

原钙黏附蛋白 18(protocadherin18, Pcdh18)主要表达于小鼠的前脑与后脑的脑室管膜区、嗅泡、大脑皮层、丘脑及小脑中^[11-12]. 哺乳动物宫内发育不便于对活体神经系统的研究和观察. 斑马鱼是近年来出现的一种良好的模式生物, 体外受精, 体外发育, 一次产卵较多, 此外斑马鱼胚胎发育期, 通体透明, 便于形态学检测和发育过程观察, 所以利用斑马鱼研究 pcdh18 基因对神经系统发育的影响具有独特的优势. 斑马鱼 Pcdh18 包含两个成员 Pcdh18a 和 Pcdh18b, 两者蛋白质同源性 70%, 但它们的表达模式并不完全相同. 在斑马鱼发育过程中 Pcdh18a 主要表达于中枢神经系统, 包括端脑、

* 国家自然科学基金资助项目(30600489).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237739, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

收稿日期: 2010-04-01, 接受日期: 2010-05-17

间脑、顶盖、后脑、脊索以及鳃弓等处, Pcdh18a 的主要作用是参与斑马鱼体轴和神经管形成、鳃弓发育等过程. Pcdh18b 主要表达于斑马鱼的神经管和中枢神经系统, 但是其在神经系统发育中的具体作用及其分子机制尚不清楚^[3]. 本文利用吗啡啉类似物修饰的反义寡核苷酸全胚胎显微注射的方法, 建立了 pcdh18b 基因抑制的斑马鱼模型, 同时还利用胚胎整体 RNA 原位杂交和吖啶橙染色等方法首次证实了 pcdh18b 抑制后斑马鱼神经系统的发育情况, 以及相关标志基因的表达情况, 为 pcdh18b 对神经系统发育影响的相关机制研究提供了重要基础.

1 材料和方法

1.1 实验动物

斑马鱼(AB 系)喂养方案根据 Westerfield 的方法进行^[4], 照明 14 h 黑暗 10 h 交替, 雌雄两组分别饲养. 定时喂以鱼饵外加咸水丰年虫(Artemien, Salina), 直到雌雄体发育到可以产卵后, 把一雌三雄放在装有产卵箱的水族箱内, 次日清晨 6:00~8:00 产卵. 收集鱼卵培养于 28℃ 培养液, 根据形态特征区分发育阶段^[5].

1.2 显微注射

为了有效地抑制 protocadherin18b 基因表达, 我们针对 pcdh18bmRNA 翻译起始位点设计了一条吗啡啉修饰的反义寡核苷酸(Morpholino-modified antisense oligonucleotides) “pcdh18b-MO” 5' GTT-GTTCCCATATTTGAAGACGTGC 3', 一条标准对照为 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA 3' (均购于 Gene Tools, LLC). 稀释在 Danieau's 溶液中后, 在一到二细胞期的野生型胚胎中注射, 注射量为每个胚胎 0.25~5 ng. 为了验证吗啡啉抑制 pcdh18b 表达的有效性, 我们构建了 pcdh18b-EGFP 的融合质粒, 把一段 271 bp pcdh18b 的基因片段融入 pEGFP-N1 载体, 其中包括 218 bp 5' UTR 和其附近编码区域编码起始 21 个氨基酸. 为了进一步验证吗啡啉抑制 pcdh18b 表达的有效性, 体外转录了 pcdh18mRNA. pcdh18b 基因体外合成步骤包括 RT-PCR 扩增、双酶切、亚克隆和体外转录. 从 24hpf 斑马鱼胚胎抽提 RNA, 由高保真性 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (TaKaRa 公司) PCR 扩增得到含有整个可读框的 PCR 产物, 引物序列为 5'GTTGGATCCTCAAATATGGGAACAA-

C TAAG 3' 和 5' ACGGAATTCTCCACTCTC -ATAAATAATAATAAAA 3'(下画线碱基为酶切位点), 将 PCR 产物克隆到 pcDNA3 载体中构建重组质粒 pcDNA3-pcdh18b, 用于转录正义加帽的 mRNA, 转录所用的试剂为 mMessage Machine T7 试剂盒(Ambion 公司).

1.3 整体原位杂交

取不同发育时期的胚胎, 用 1×PBST 溶液洗去多余的甲醇溶液, 蛋白酶 K 消化, 将胚胎置于 65℃ 水浴进行预杂交 3 h, 然后加入所合成的反义 RNA 探针 65℃ 水浴杂交过夜. 多余的探针用 0.2×SSC 溶液洗去, 加入 anti-Dig-AP (购于 Roche 公司) 与反义 RNA 探针结合过夜. 未结合的抗体用 1×PBST 溶液洗去, 再加入 BCIP/NBT/NTMT 溶液显色 30 min, 迅速用 1×PBST 溶液洗去多余的显色液, 在显微镜下观察并记录结果^[6].

1.4 形态学观察

在 Olympus 解剖显微镜下观察斑马鱼胚胎发育的全过程, 并进行活体摄影. 在各观察时点计数胚胎存活情况及畸形数, 观察胚胎发育及神经系统情况.

1.5 吖啶橙染色

吖啶橙(acridine orange)染色用于检测细胞凋亡, 将胚胎去除卵膜(chorion), 置于吖啶橙染液(将吖啶橙溶于 PBS 中, 终浓度 2 mg/L, pH 7.1)中 1 h, PBS 清洗 2 遍, 在荧光显微镜下, 选用波长大于 515 nm 的激发光源观察结果.

2 结果与分析

2.1 pcdh18b 的表达抑制对斑马鱼脑部形态的影响

注射吗啡啉修饰的反义寡核苷酸是一种已经建立的良好干扰目标 mRNA 翻译的方法^[7]. 为了研究 pcdh18b 基因对斑马鱼神经系统发育的影响, 我们设计了一个吗啡啉修饰的反义寡核苷酸干扰 pcdh18b 翻译起始位点, 用 pcdh18b-MO 注射斑马鱼胚胎, 结果显示注射后胚胎脑部明显畸形. con-MO 注射组和未经注射的野生型(WT)组的表型基本一致, 因此后续所有实验仅设置了 con-MO 注射组作为对照. 为了验证吗啡啉修饰的反义寡核苷酸的有效性, 将其与编码 pcdh18b-EGFP 融合蛋白的 pcdh18b-EGFP DNA 共注射, 结果显示 pcdh18b-MO 抑制了 pcdh18b-EGFP 融合蛋白的表达(图 1, $n > 100$), 从而也验证了 pcdh18b-MO 能够

有效抑制内源性 *pcdh18b* 的表达. 在注射后发现, 受精 28 h 后 *pcdh18b* 抑制的斑马鱼胚胎与对照组相比后脑室变大、后脑结构模糊、中脑与后脑边界松散、甚至消失(表 1, 图 2a, a', b, b'). 我们构建了体外 *pcdh18b*-mRNA 转录体系, 得到了包括 *pcdh18b*-CDS 全长的体外转录 mRNA. 与 *pcdh18b*-MO 共注射后, 表型检验结果显示, 其可以部分补救 *pcdh18b* 下调造成的表型缺陷(表 1, 图 2c, c'), 同时也验证了 *pcdh18b*-MO 的有效性和特异性.

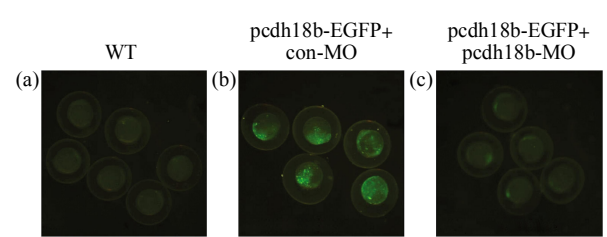


Fig. 1 Effect of *pcdh18b* expression down regulation (a) Wild-Type. (b) Coinjection of 5 ng con-MO with the 150 pg *pcdh18b*-EGFP DNA produced green fluorescence. (c) Coinjection of 5 ng *pcdh18b*-MO with the 150 pg *pcdh18b*-EGFP DNA inhibited production of the *pcdh18b*-EGFP fusion production.

Table 1 Phenotypes of wild-type embryos injected with <i>pcdh18b</i> -MO, standard control-MO and mRNA				
MO (injected)	n	Phenotypes		
		Normal	Abnormal	Death
2.5 ng <i>pcdh18b</i> -MO	161	67(42%)	77(48%)	17(10%)
5 ng <i>pcdh18b</i> -MO	186	50(27%)	111(60%)	25(13%)
5 ng control MO	124	118(95%)	1(1%)	5(4%)
5 ng <i>pcdh18b</i> -MO + 200 pg mRNA	154	123(80%)	23(15%)	8(5%)

The total number of embryos (*n*) was scored at 30hpf, and phenotypes were separated into three categories: normal, abnormal (showing brain irregularly shaped, hindbrain obscure and hindbrain ventricle enlarged) and death.

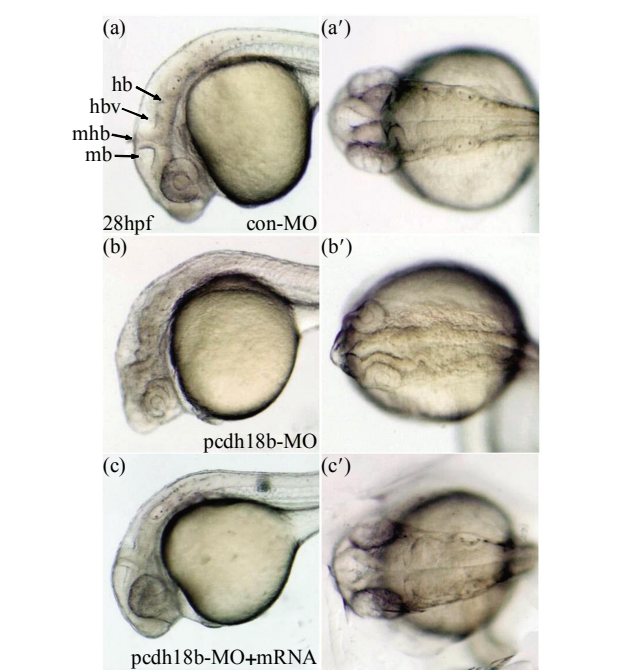


Fig. 2 Knockdown of *pcdh18b* affects midbrain, hindbrain and midbrain-hindbrain boundary (a, a') 5ng con-MO injected embryos. (b, b') 5ng *pcdh18b*-MO injected embryos. (c, c') 5ng *pcdh18b*-MO and 200pg *pcdh18b*-mRNA. (a, b, c) Lateral view. (a', b', c') Dorsal view. At 28hpf, hindbrain and midbrain-hindbrain boundary are obscure in *pcdh18b* morphant in b, b'. hb: Hindbrain; hbv: Hindbrain ventricle; mhb: Midbrain-hindbrain boundary; mb: Midbrain.

2.2 *pcdh18b* 的表达抑制对斑马鱼神经系统发育的影响

pcdh18b 基因表达抑制后斑马鱼脑部畸形可能由神经组织发育异常所导致. 为了验证这个推测, 我们利用胚胎整体 RNA 原位杂交的方法检测了神经系统相关标志分子: *neurog1*、*elavl3*、*gfap*、*pax2a*、*wnt1*、*krox20* 在受精卵发育过程中 18hpf, 24hpf 和 30hpf 的表达情况.

neurog1 是神经前体细胞的标志, 在胚胎受精 24 h 后主要分布于前脑、中脑、后脑、脊髓、耳部和鳃背基板处^[18]. *pcdh18b* 基因下调组的 18hpf 胚胎与对照组相比, *neurog1* 在前脑、中脑、后脑表达均减弱. *pcdh18b* 基因下调组的 24hpf 胚胎与对照组相比, *neurog1* 在中脑及后脑的表达均明显减少, 在前脑及其他部位中无显著变化(图 3).

为了进一步研究 *pcdh18b* 下调后神经细胞分化情况, 我们检测了 *elavl3*、*gfap* 的表达情况. *elavl3* 是最早期的神经元标志物之一, 在神经系统广泛表达, 是神经元决定的标志^[19-20]. *gfap* 为神经胶质细胞的标志, 胚胎受精 12h 后在脑中表达, 15h 后至成鱼在神经胶质细胞中持续表达^[21]. *pcdh18b* 基因下调组的 18hpf 和 30hpf 胚胎中 *elavl3* 和 *gfap* 在中脑和后脑的表达均显著减少, 中后脑

边界模糊甚至消失(图 4 和图 5)。根据标记分子 *neurog1*、*elav13*、*gfap* 在 *pcdh18b* 基因下调组胚胎

中的表达情况, 我们得出结论: *pcdh18b* 基因下调后导致胚胎中脑、后脑及中后脑边界形成异常。

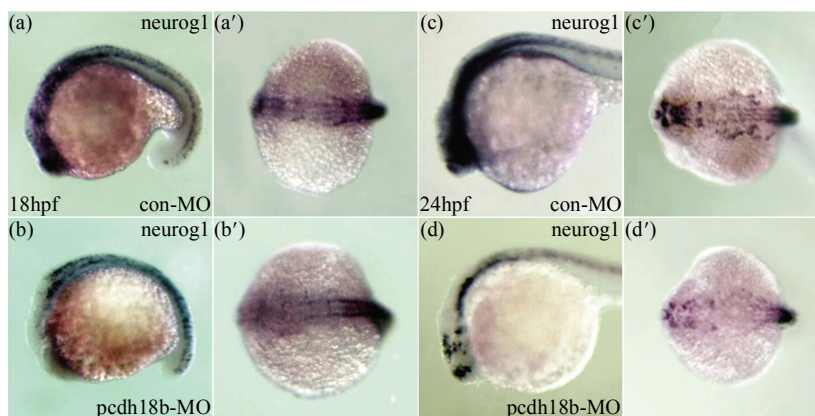


Fig. 3 Knockdown of *pcdh18b* decreases *neurog1* expression

(a, a', c, c') 5 ng con-MO injected embryos. (b, b', d, d') 5 ng *pcdh18b*-MO injected embryos. (a, b, c, d) Lateral view. (a', b', c', d') Dorsal view. At 18hpf and 24hpf, *in situ* hybridization showed that *pcdh18b*-MO caused severe loss of *neurog1* in the embryonic midbrain and hindbrain.

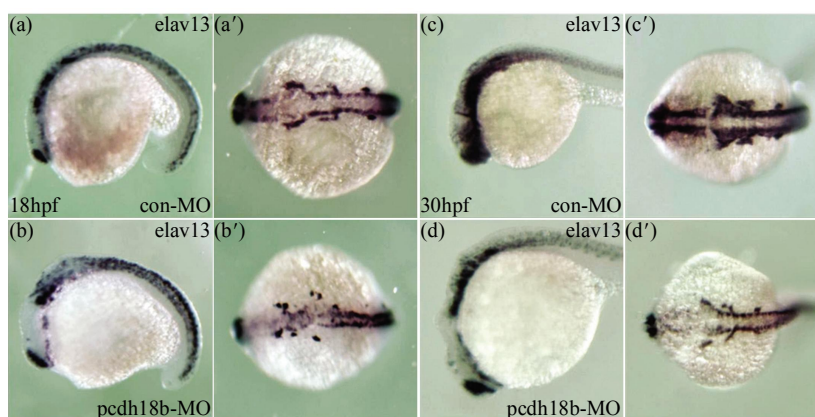


Fig. 4 Knockdown of *pcdh18b* reduces neurons

(a, a', c, c') 5 ng con-MO injected embryos. (b, b', d, d') 5 ng *pcdh18b*-MO injected embryos. (a, b, c, d) Lateral view. (a', b', c', d') Dorsal view. At 18hpf and 30hpf, the number of neurons was also significantly decreased in the midbrain and hindbrain of the *pcdh18b*-MO morphant.

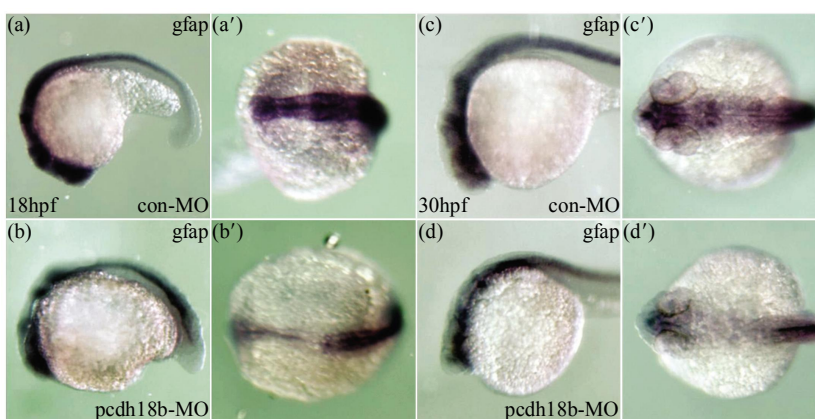


Fig. 5 Knockdown of *pcdh18b* reduces neuroglia cells

(a, a', c, c') 5 ng con-MO injected embryos. (b, b', d, d') 5 ng *pcdh18b*-MO injected embryos. (a, b, c, d) Lateral view. (a', b', c', d') Dorsal view. At 18hpf and 30hpf, the number of neuroglia cells was also considerably reduced in the midbrain and hindbrain of the *pcdh18b*-MO morphant.

为了进一步证明 *pcdh18b* 基因抑制后对胚胎中后脑及其边界的影响, 我们检测了 *pax2a*、*wnt1*、*krox20* 标记分子的表达情况. *pax2a* 为核转录因子, 属于配对盒基因家族成员, *pax2a* 是早期参与中后脑边界发育的基因, 它促进中后脑边界的形成^[22]. *pax2a* 基因缺失的胚胎中后脑边界上的细胞无法正常分化并且细胞凋亡增多, 最终导致中后脑边界缺失^[23]. 胚胎受精 28~30 h 后, *pax2a* 主要在野生型胚胎后脑、中后脑边界、眼茎、耳泡、脊髓中间神经元等区域表达. *wnt1* 基因是果蝇 *Wingless* (*wg*) 基因在脊椎动物中的同源基因, *wnt1* 诱导了

中脑前体尾部细胞过度增殖, 缩短细胞周期, 增强了细胞的增殖能力, 在中脑和后脑的发育过程中调节特异前体细胞的数量, 保持中后脑区域正常的组织形态^[24]. *wnt1* 在 30hpf 野生型胚胎中主要表达于背侧神经节、中后脑边界前部、脊髓. *pcdh18b* 基因下调组的 30hpf 胚胎与对照组相比 *wnt1* 和 *pax2a* 在中脑后脑的表达均减少, 并且中后脑边界处出现分叉, 提示神经管发育出现异常. 同时, *wnt1* 在 7 个菱脑节的表达明显消失, 说明 *pcdh18b* 基因下调后影响了菱脑节的形成(图 6).

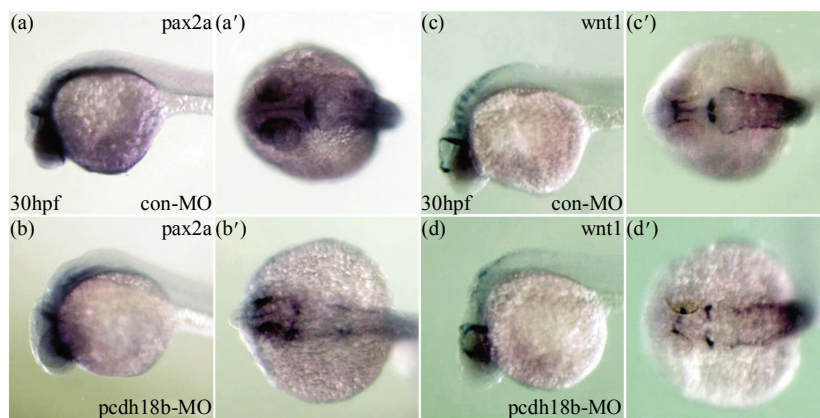


Fig. 6 Knockdown of *pcdh18b* lessens expression of *pax2a* and *wnt1* in midbrain and hindbrain

(a, a', c, c') 5 ng con-MO injected embryos. (b, b', d, d') 5 ng *pcdh18b*-MO injected embryos. (a, b, c, d) Lateral view. (a', b', c', d') Dorsal view. Neural tube duplications and loss of hindbrain segmentation were exhibited in the *pcdh18b*-MO injected embryos at 30hpf.

krox20 是参与后脑发育的重要基因, 是后脑沿前后轴分化成 7 个菱脑节的关键因子. 30hpf 野生型胚胎中 *krox20* 分布于第三及第五菱脑节^[25]. 在 *pcdh18b* 下调组的 30hpf 胚胎中, *krox20* 在第三和第五菱脑节的表达明显减弱(图 7).

2.3 *pcdh18b* 的表达抑制促进神经细胞的凋亡

pax2a 和 *wnt1* 均有促进细胞增殖抑制凋亡的作用, *pcdh18b* 下调后两者在中脑及后脑中的表达均减少, 这提示抑制 *pcdh18b* 基因后可能促进了中脑和后脑神经细胞的凋亡. 吖啶橙染色显示 *pcdh18b* 下调组 30hpf 胚胎与对照组相比, 整个中枢神经系统凋亡细胞明显增加, 尤其是中脑、后脑及中后脑边界最为显著(图 8).

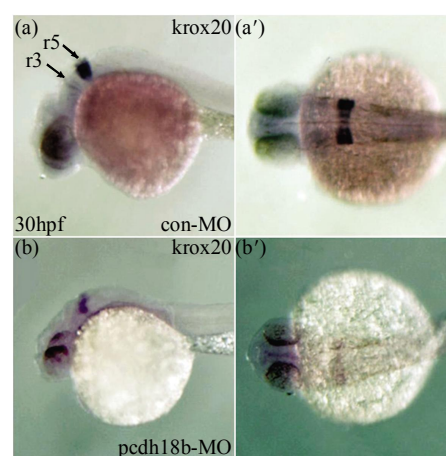


Fig. 7 Knockdown of *pcdh18b* diminishes *krox20* expression in the rhombomeres (r) r3 and r5

(a, a') 5 ng con-MO injected embryos. (b, b') 5 ng *pcdh18b*-MO injected embryos. (a, b) Lateral view. (a', b') Dorsal view. At 30hpf, the number of *krox20*-positive cells within the *pcdh18b*-MO morphant r3 and r5 was eminently diminished.

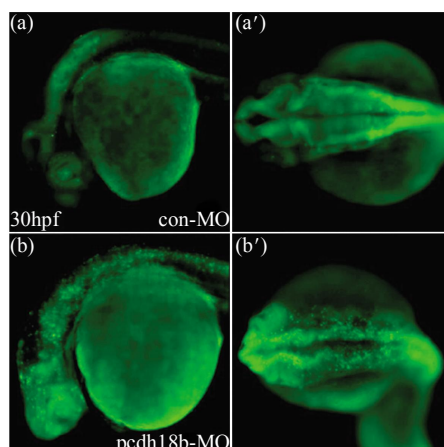


Fig. 8 Apoptosis in the brain of pcdh18b-MO morphant
(a, a') 5 ng con-MO injected embryos. (b, b') 5 ng pcdh18b-MO injected embryos. (a, b) Lateral view. (a', b') Dorsal view. At 30hpf, large number of acridine orange stained cells are detected in midbrain, hindbrain and midbrain-hindbrain boundary of pcdh18-MO injected embryos in (b) and (b') that are sparse in the control embryos.

3 讨 论

神经系统发育是脊椎动物发育过程中最复杂次序最严谨的事件之一。脊椎动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)含有许多不同类型的神经细胞(神经元和神经胶质细胞),其形成机制受到细胞内在因子与细胞外环境的严密调控,近年来发现有许多细胞内和细胞外的信号分子参与调控^[26-28]。脊椎动物中脑及后脑的发育受到中后脑边界即称为中后脑边界组织者区域的严格调控,参与这些调控的主要有转录因子 *Engrailed*、*Pax*、*Otx*、*Gbx* 和分泌蛋白 *Wnt*、*Fgf* 等,它们均在中后脑边界处有表达^[29]。

斑马鱼 *Pcdh18* 属于 $\delta 2$ -*pcdh* 亚家族,包括两个成员 *Pcdh18a* 与 *Pcdh18b*,两者蛋白质序列有 70% 的一致性, *pcdh18b* 的表达模式和作用与 *pcdh18a* 并不相同。利用吗啡啉下调 *pcdh18a* 后,斑马鱼胚胎出现发育延迟,体轴变短,细胞死亡和剂量依赖性胚胎死亡, *pcdh18a* 过表达后则出现孵化腺(hatching gland)位置异常,神经管短而宽,同时咽弓发育也发生异常^[30]。本文利用了模式生物斑马鱼,研究下调 *pcdh18b* 基因后对斑马鱼神经系统发育的影响。研究发现, *pcdh18b* 基因在中枢神经系统有广泛的表达,在后脑的表达呈现和菱脑一样的分节现象,下调 *pcdh18b* 后发现脑部各类神经细胞明显减少,中后脑边界不清晰甚至消失,神经管发育异常出现了分叉现象。这些表明 *pcdh18b* 参与

了神经细胞的发育以及中后脑边界区域细胞正确的迁移定位。 *pcdh18a* 与 *pcdh18b* 二者均参与了中枢神经系统的发育,但是作用部位和方式并不完全一致。同时,仍有很多问题尚待进一步研究, *pcdh18b* 在神经细胞和中后脑发育过程中的具体分子机制, *pcdh18b* 与相关转录因子之间的关系,它们之间如何互相作用参与调控中后脑边界组织者的发生。

参 考 文 献

- [1] Yagi T, Takeichi M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev*, 2000, **14**(10): 1169-1180
- [2] Tepass U, Truong K, Godt D, *et al.* Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, **1**(2): 91-100
- [3] Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, *et al.* Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol*, 1988, **106**(3): 873-881
- [4] Angst B D, Marcozzi C, Magee A I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*, 2001, **114**(Pt 4): 629-641
- [5] Frank M, Kemler R. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**(5): 557-562
- [6] Cronin K D, Capehart A A. Gamma protocadherin expression in the embryonic chick nervous system. *Int J Biol Sci*, 2007, **3**(1): 8-11
- [7] Yoshida K, Watanabe M, Kato H, *et al.* BH-protocadherin-c, a member of the cadherin superfamily, interacts with protein phosphatase 1 alpha through its intracellular domain. *FEBS Lett*, 1999, **460**(1): 93-98
- [8] Sano K, Tanihara H, Heimark R L, *et al.* Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J*, 1993, **12**(6): 2249-2256
- [9] Washbourne P, Dityatev A, Scheiffele P, *et al.* Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci*, 2004, **24** (42): 9244-9249
- [10] Bass T, Ebert M, Hammerschmidt M, *et al.* Differential expression of four protocadherin alpha and gamma clusters in the developing and adult zebrafish: DrPcdh2gamma but not DrPcdh1gamma is expressed in neuronal precursor cells, ependymal cells and non-neural epithelia. *Dev Genes Evol*, 2007, **217**(5): 337-351
- [11] Homayouni R, Rice D S, Curran T. Disabled-1 interacts with a novel developmentally regulated protocadherin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **289**(2): 539-547
- [12] Wolvertont T, Lalande M. Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins. *Genomics*, 2001, **76**(1-3): 66-72
- [13] Kubota F, Murakami T, Tajika Y, *et al.* Expression of protocadherin 18 in the CNS and pharyngeal arches of zebrafish embryos. *Int J Dev Biol*, 2008, **52**(4): 397-405
- [14] Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. Oregon: University of Oregon Press, 1995

- [15] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 1995, **203**(3): 253–310
- [16] Yelon D, Horne S A, Stainier D Y. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev Biol*, 1999, **214**(1): 23–37
- [17] Nasevicius A, Ekker S C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet*, 2000, **26**(2): 216–220
- [18] Cau E, Casarosa S, Guillemot F. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development*, 2002, **129**(8): 1871–1880
- [19] Kim C H, Ueshima E, Muraoka O, *et al.* Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neuroscience Letters*, 1996, **216**(2): 109–112
- [20] Marusich M F, Furneaux H M, Henion P D, *et al.* Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiology*, 1994, **25**(2): 143–155
- [21] Bernardos R L, Raymond P A. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr Patterns*, 2006, **6**(8): 1007–1013
- [22] Krauss S, Johansen T, Korzh V, *et al.* Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis. *Development*, 1991, **113**(4): 1193–1206
- [23] Pfeffer P L, Gerster T, Lun K, *et al.* Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development*, 1998, **125**(16): 3063–3074
- [24] Guo C, Qiu H Y, Huang Y, *et al.* Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmus organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development*, 2007, **134**(2): 317–325
- [25] Seitanidou T, Schneider-Maunoury S, Desmarquet C, *et al.* Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Mech Dev*, 1997, **65**(1–2): 31–42
- [26] Lillien L. Neural progenitors and stem cells: mechanisms of progenitor heterogeneity. *Curr Opin Neurobiol*, 1998, **8**(1): 37–44
- [27] Stemple D L, Mahanthappa N K. Neural stem cells are blasting off. *Neuron*, 1997, **18**(1): 1–4
- [28] McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, **276**(5309): 66–71
- [29] Rhinn M, Brand M. The midbrain–hindbrain boundary organizer. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, **11**(1): 34–42
- [30] Amar E, Dawid I B. Protocadherin-18a has a role in cell adhesion, behavior and migration in zebrafish development. *Dev Biol*, 2008, **318**(2): 335–346

The Effects of Protocadherin18b Down Regulation on Embryonic Neurogenesis in Zebrafish*

GONG Yue-Bo, JIANG Qiu, HU Jing-Ying, WANG Yue-Xiang, SONG Hou-Yan**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College and Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Protocadherin18b (Pcdh18b) belongs to the protocadherins, which make up the largest subgroup within the cadherin superfamily. To study the role of pcdh18b on embryonic neurogenesis in zebrafish, one type of well designed antisense morpholino oligonucleotide was injected into one or two-cell stage embryos to block the translation of pcdh18b. After injection, the phenotypes of nervous system were monitored by whole mount *in situ* hybridization and acridine orange staining. Whole-mount *in situ* hybridization with neurog1, elavl3, gfap and krox20 RNA probes showed that the expression of neural precursor cells, neurons, neuroglia cells and rhombencephalon3, 5 was strikingly affected; meanwhile, the expression of MHB (midbrain-hindbrain boundary) markers pax2a and wnt1 was significantly compromised and showed duplication of neural tube in pcdh18b down regulation group. Acridine orange staining pointed out that down regulation of pcdh18b increased cell apoptosis in midbrain, hindbrain and MHB region. These results suggest that pcdh18b plays an important role in the zebrafish neurogenesis.

Key words pcdh18b, zebrafish, neurogenesis, whole mount *in situ* hybridization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00084

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30600489).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-54237739, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

Received: April 1, 2010 Accepted: May 17, 2010