

Die Funktion von Mash1 in der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hendrik Wildner
aus Borken / Westfalen

November, 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier
2. Gutachter: Prof Dr. Fritz Rathjen

Disputation am 09.03.2006

INHALTSVERZEICHNIS

DIE FUNKTION VON MASH1 IN DER ENTWICKLUNG DES DORSALEN RÜCKENMARKS	I
1. EINLEITUNG	6
1.1 Neurale Induktion und Neurulation	6
1.2 Musterbildung im Neuralrohr durch Morphogene	7
1.3 Musterbildungsgene bestimmen das weitere Entwicklungsschicksal	9
1.4 Entwicklung des dorsalen Rückenmarks	10
1.5 Dorsale Rückenmarksinterneurone werden in zwei Phasen der Neurogenese geboren	13
1.6 Neurale Zell-Determinierung und Zellzyklus	15
1.6.1 Zellzyklus-Austritt und Zellschicksal	15
1.6.2 Die Verknüpfung von Zellteilung und Zellschicksal	17
1.7 Die Rolle von Mash1 in der Entwicklung des Nervensystems	17
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Abkürzungsverzeichnis	20
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	21
2.1.3 Bakterienstämme	21
2.1.4 Vektoren	21
2.1.5 Antikörper	22
2.1.6 Zelllinie	22
2.1.7 Hühnerstamm	22
2.1.8 Mausstämme und transgene Mauslinien	22
2.1.9 Nährmedien	23
2.1.10 Zellkulturmedien	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren und Ribonucleinsäuren	24
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	24
2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen	24
2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrlöchern bzw. Schwanzstücken	24
2.2.1.4 Isolierung von total RNA aus embryonalem Gewebe	25
2.2.2 Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren, Ligationen von DNA Fragmenten und Transformation kompetenter Bakterien	25
2.2.2.1 Klonierung der Hühnchenexpressionsvektoren	26
2.2.3 Rekombination in Bakterien	26
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.4.2 RT-PCR	29
2.2.5 Sequenzierung	29
2.2.6 Radioaktive Markierung von Desoxyribonukleinsäuren	30
2.2.7 <i>In vitro</i> -Transkription	30

2.2.8 Southern-Hybridisierung	31
2.2.9 Zellkultur	31
2.2.9.1 Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten	31
2.2.9.2 Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen	32
2.2.10 Etablierung von „Knockout“-Mäusen	33
2.2.11 Manipulation am Hühnerembryo	34
2.2.11.1 Kultivierung-Inkubation	34
2.2.11.2 Elektroporation von Hühnerembryonen	34
2.2.11.3 Zellschicksals-Analyse durch die Injektion replikationsdefizienter Retroviren	35
2.2.12 Histologische Methoden	36
2.2.12.1 Herstellung von Methacrylatschnitten	36
2.2.12.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Methacrylatschnitten	36
2.2.12.3 Toluidin Blau O-Färbung von Methacrylatschnitten	37
2.2.12.4 Herstellung von Gefrierschnitten	37
2.2.12.6 Immunhistologie auf Gewebeschnitten	38
2.2.12.7 Detektion von Zellproliferation und Apoptosen	38
2.2.12.7 Herstellung von Paraffinschnitten	38
2.2.13 <i>In situ</i> -Hybridisierung	39
2.2.13.1 <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefriergewebeschnitten	39
2.2.13.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Paraffinschnitten	40
2.2.13.3 Präparation von Embryo-Pulver	41
2.2.14 Elektrophysiologie	41
3. ERGEBNISSE	43
3.1 Mash1/Cash1 Expression im Rückenmark von Maus- und Hühner-embryonen	43
3.2 Mash1+ Vorläuferzellen bilden verschiedene Neuronentypen	45
3.2.1. Konstruktion des Mash1-GFP Allels	46
3.2.2 Mash1+ Vorläuferzellen bilden dI3-dI5, dILA und dILB Neurone	48
3.3 Mash1 ist ein essentielles proneurales Gen während der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks	49
3.4. Unterschiedliche Funktionen von Mash1 während der frühen und späten Neurogenese im dorsalen Rückenmark	52
3.4.1.1 Mash1 ist essentiell für die Bildung der früh geborenen Tlx3+ dI3 und dI5 Neurone	52
3.4.1.2 Mash1 induziert die Bildung von Tlx3+ Neuronen während der frühen Phase der Neurogenese	55
3.4.2.1 Die Funktion von Mash1 in der Bildung und Spezifizierung der spät geborenen dILA Neurone	56
3.4.2.2 dILA Neurone werden durch asymmetrische Teilungen gebildet	59
3.4.2.3 Elektroporation von Mash1 ist für die Bildung von dILA Neuronen nicht ausreichend	61
3.5 Auswirkungen der Mash1 Mutation auf die Funktion des dorsalen Rückenmarks	63
3.5.1 dILA Neurone bilden GABAerge dorsale Interneurone	63
3.5.2 Der spinale Reflexbogen in Mash1 ^{-/-} Tieren	65
4. DISKUSSION	69
4.1 Die frühe Funktion von Mash1	69
4.1.1 Mash1 ist für die Spezifizierung der Tlx3+ dI3 und dI5 Zellen notwendig	69
4.1.2 Kontextabhängige Funktion von Mash1	70
4.2 Die späte Funktion von Mash1	71
4.2.1 Asymmetrische Funktion von Mash1	71
4.2.2 Mash1 und die Spezifizierung von dILA Neuronen	73

4.3 Funktionelle Defizite in Mash1 mutanten Mäusen	75
5. ZUSAMMENFASSUNG	78
SUMMARY	80
6. LITERATUR	81

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Delbrück-Centrum durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Carmen Birchmeier (MDC) für die Betreuung, ihre stete Diskussionsbereitschaft und Ratschläge, die diese Arbeit begleitet haben.

Ich danke Francois Guillemot (NIMR, London) dafür, daß er mir die Mash1 mutante Mauslinie sowie Embryonen der Mash1^{Ngn2/Ngn2} Mauslinie zur Analyse zur Verfügung gestellt hat.

Bei Paul Heppenstall (Campus Benjamin Franklin, Berlin) und Gary Lewin (MDC) bedanke ich mich für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der elektrophysiologischen Experimente.

Bei Seo-Hee Cho und Connie Cepko (Harvard Medical School, Boston) bedanke ich mich für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der retroviralen Zellschicksalexperimente.

Bei Fritz Rathjen (MDC) bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die herzliche Atmosphäre in unserem Labor.