

1. Einleitung

Das dorsale Horn des Rückenmarks ist die erste Schaltstelle des zentralen Nervensystems für somatosensorische Informationen. Die Interneurone des dorsalen Rückenmarks empfangen sensorische Informationen aus der Peripherie und leiten diese an das Stammhirn, den Thalamus wie auch an ventrale spinale Interneurone weiter (Gillespie and Walker 2001; Hunt and Mantyh 2001; Julius and Basbaum 2001). Durch die Verschaltung der sensorischen Information wird ausserdem der Rückenmarksreflexbogen moduliert. Verschiedene Nervenzellen existieren, die unterschiedliche Reize, z.B. Schmerz-, Hitze- oder Berührungsreize erkennen und weiterleiten. Diese verschiedenen sensorischen Neurone projizieren dabei ihrerseits auf unterschiedliche Laminae im dorsalen Horn. Nervenzellen im dorsalen Horn sind also unterschiedlich, weil sie verschiedene Modalitäten sensorischer Informationen verarbeiten und diese auf verschiedene Art und Weise integrieren und weiterleiten. Diese Vielfalt ist auf elektrophysiologischer und morphologischer Ebene gut dokumentiert. Allerdings sind Nervenzellen im dorsalen Horn molekular schlecht charakterisiert. In den letzten Jahren sind prinzipielle Mechanismen, die zur Entstehung der neuronalen Vielfalt beitragen, erstmals aufgeklärt worden. Viele Aspekte der neuronalen Diversifikation sind aber noch immer unzureichend verstanden und nur wenig ist über die Entwicklung des dorsalen Horn bekannt.

Die neurale Musterbildung/Diversifikation beginnt mit der Anlage neuralen Gewebes in der frühen Embryonalentwicklung. Dabei wird das Neuralrohr etabliert und den neuronalen Vorläuferzellen wird ihre positionelle Identität zugewiesen. Dieser Vorgang kann in drei Prozesse unterteilt werden in: (i) Induktion der Neuralplatte; (ii) Ausbildung des Neuralrohrs (Neurulation); (iii) Etablierung der dorso-ventralen und anterior-posterioren Achse. Ich werde im Folgenden diese drei Prozesse und ihre molekularen Grundlagen kurz erläutern.

1.1 Neurale Induktion und Neurulation

Die neurale Induktion definiert sich als der Entwicklungsschritt, in dem ektodermale Zellen zu neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen werden. Die neuronalen

Vorläuferzellen differenzieren dann im weiteren Verlauf der Entwicklung in die verschiedenen Typen von neuronalen Zellen, d.h. in verschiedene Typen von Neuronen und Gliazellen.

An der neuralen Induktion sind eine Reihe von Signalkaskaden beteiligt (zur Übersicht s. (Wilson and Edlund 2001)). So haben Studien in *Xenopus* aufgezeigt, daß die Repression des BMP Signalwegs für die neurale Induktion essentiell ist (Hemmati-Brivanlou and Melton 1997). FGF wird in Zellen exprimiert, die ein neurales Schicksal annehmen, und ist notwendig, um BMP zu reprimieren. Zusätzlich übernimmt FGF auch eine instruktive Rolle in der neuralen Induktion (Wilson et al. 2000). Neuere Untersuchungen an Maus und Huhn weisen ausserdem auch dem Wnt Signalweg eine Schlüsselrolle in der neuralen Induktion zu (Wilson et al. 2001).

Durch die neurale Induktion formiert sich das Neuroektoderm (die Neuralplatte). Hat sich die Neuralplatte gebildet, gibt das Chordamesoderm Signale an die überliegende Neuralplatte, die die Zellproliferation, die Invagination und das Abschnüren vom Oberflächenektoderm kontrollieren. Dieser Prozess wird als Neurulation bezeichnet. Schließt sich die eingestülpte Neuralplatte, so ist das Neuralrohr entstanden, die embryonale Anlage des zentralen Nervensystems. Wenn Neuralplattenzellen durch die Injektion von fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden, kann ihr weiteres Zellschicksal bestimmt werden. Solche Experimente zeigten, daß der am weitesten anterior gelegene Anteil der Neuralplatte das Vorderhirn bildet, während die jeweils folgenden, weiter posterior gelegenen Abschnitte sich zum Mittelhirn, Stammhirn und Rückenmark entwickeln (Eagleson and Harris 1990; Schoenwolf and Sheard 1990).

1.2 Musterbildung im Neuralrohr durch Morphogene

In der weiteren Entwicklung des Nervensystems werden eine Vielzahl verschiedener Neurone aus pluripotenten Vorläuferzellen gebildet. Diese verlassen den Zellzyklus, wandern aus der Ventrikulärzone aus und differenzieren dabei zu postmitotischen Neuronen. Dieser Vorgang wird als Neurogenese bezeichnet. Neurogenese zieht sich über mehrere Tage hin und ist dadurch charakterisiert, daß eine Vielzahl verschiedener Nervenzelltypen, und mehrere Arten von Gliazellen an immer gleichen

Positionen im Nervensystem gebildet werden. Dabei ist die Anzahl der verschiedenen Nervenzelltypen, die gebildet werden, erstaunlich groß. Wie kann diese Vielfalt auf kontrollierte Art und Weise spezifiziert werden? Neurogenese ist am besten im Rückenmark verstanden, scheint aber in anderen Regionen des Nervensystems nach ähnlichen Prinzipien abzulaufen. Ich werde mich im weiteren auf die Diskussion dieses Prozesses im Rückenmark beschränken.

Musterbildung im Nervensystem beinhaltet, daß Vorläuferzellen im Nervensystem positionelle Information zugewiesen wird. Das solche positionelle Information der Vorläuferzellen existiert, wurde erstmals durch eine Reihe von Transplantationsexperimenten gezeigt, in denen Segmente des Rückenmarks um ihre dorso-ventrale Achse gedreht oder an anderer anterior posteriorer Stelle wieder eingepflanzt wurden. Diese Experimente zeigten auch, daß ausserhalb des Nervensystems Signale produziert werden müssen, die entlang der anterior-posterioten und dorso-ventralen Achse operieren um die positionelle Identität einer Vorläuferzelle im Neuralrohr festzulegen (Roach1945, Jacobson1964, (Simon et al. 1995; Ensini et al. 1998). Die anfängliche Position einer neuralen Vorläuferzelle entlang der dorso-ventralen oder anterior-posterioren Achse beeinflusst, welchen Signalen diese Zelle ausgesetzt ist. Die positionelle Information bestimmt dann das spätere Schicksal der Zellen, die aus den Vorläuferzellen hervorgehen (Lumsden and Krumlauf 1996; Tanabe and Jessell 1996). Zusätzlich zur Position kann auch der Zeitpunkt, zu dem eine differenzierte Zelle aus einer Vorläuferzelle entsteht, ihr Schicksal bestimmen (siehe auch unten).

Sonic hedgehog (Shh) ist das primäre Signalmolekül, das die Musterbildung im ventralen Neuralrohr (das auch als Basalplatte bezeichnet wird, s.a Abb. 1.2) kontrolliert und dabei als Morphogen funktioniert (Jessell 2000). Sonic hedgehog wird anfänglich von der Chorda dorsalis produziert, und später in der Entwicklung auch von der Bodenplatte sekretiert. Danach bildet sich ein Gradient von Shh aus: am höchsten ist die Shh Konzentration in der Nähe der Chorda dorsalis und Bodenplatte; sie fällt dann mit zunehmender Entfernung von diesen Orten ab. Abhängig von der Sonic hedgehog Konzentration werden in neuralen Vorläuferzellen verschiedene Homöodomänen Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Diese Transkriptionfaktoren

werden in zwei Klassen eingeteilt: Faktoren der Klasse I werden reprimiert, während die der Klasse II induziert werden (Lee and Jessell 1999; Briscoe et al. 2000). Diese Transkriptionsfaktor-Gene werden auch Musterbildungsgene genannt. Die Faktoren der Klasse I und II können sich zudem gegenseitig reprimieren, und sie bilden durch diese gegenseitige Repression scharf definierte Streifen von Vorläuferzellen aus, die durch die Expression der jeweiligen Faktoren bzw. Faktorkombinationen gekennzeichnet sind (Muhr et al. 2001). So wird der Sonic hedgehog Konzentrationsgradient in fünf verschiedene Streifen von ventralen Vorläuferzellen übersetzt, die dadurch definiert sind, daß sie bestimmte Faktoren der Klasse I und II ausprägen (s. Abb. 1.1).

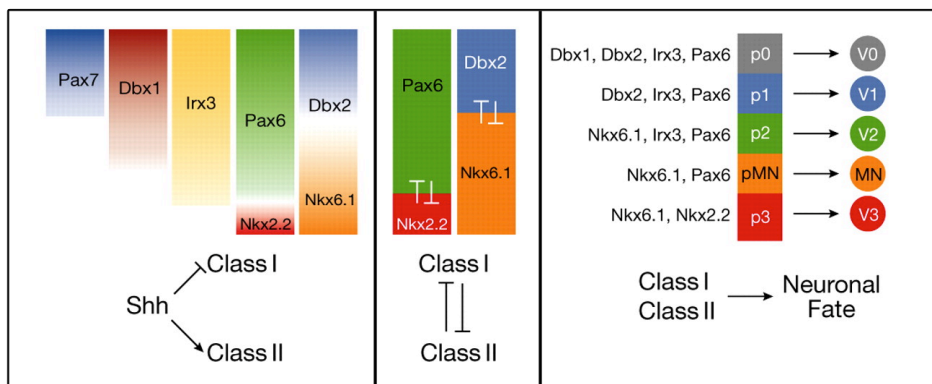


Abb. 1.1 (aus (Jacob and Briscoe 2003)) Die Identität von Vorläuferzellen des ventralen Rückenmarks wird durch sonic hedgehog bestimmt. Der von der Bodenplatte oder der Chorda dorsalis ausgehende Sonic hedgehog Gradient bestimmt die Expressionsdomänen einer Reihe von Musterbildungsgenen. Drei Kernpunkte sind für die Funktionalität dieses Modells entscheidend: Shh reprimiert Klasse I Gene oder induziert Klasse II Gene in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise (links). Die gegenseitige Regulation von Musterbildungsgenen, deren Expressionsdomänen angrenzend sind, definiert einzelne Vorläuferdomänen (mitte). Der neuronale Subtyp der aus einer bestimmten Vorläuferdomäne hervorgeht, wird durch die Kombination der in der Vorläuferdomäne exprimierten Musterbildungsgene bestimmt (rechts). Dbx, „developing brain homeobox“ Protein; Irx, „iroquois homeodomain“ Protein; MN, Motoneuron; Nkx, „Nkx homeodomain“ Protein; p, Vorläuferzelle; Pax, „paired homeodomain“ Protein; V0-V3, ventrale Interneurone 0-3

1.3 Musterbildungsgene bestimmen das weitere Entwicklungsschicksal

Die Musterbildungsgene werden im Allgemeinen nur in den Vorläuferzellen exprimiert, während die neuronalen Zellen, die aus den Vorläufern entstehen, diese Faktoren nicht mehr ausprägen. Dennoch bestimmen die Musterbildungsgene, welche Transkriptionsfaktoren in den neuronalen Zellen exprimiert werden (Briscoe and Ericson 1999; Pierani et al. 1999; Sander et al. 2000; Vallstedt et al. 2001). Zum

Beispiel ist der Transkriptionsfaktor *Dbx1* in neuronalen Vorläuferzellen der Basalplatte exprimiert, die V0 Neurone produzieren; V0 Neurone sind Interneurone im ventralen Rückenmark, die durch die Expression von *Evx1* charakterisiert sind (Pierani et al. 2001). Die sequentielle Aktivität beider Homöobox-Faktoren ist für die Bildung der V0 Interneurone notwendig. Wenn das *Dbx1* Gen mutiert ist, werden zwar Neurone von den Vorläuferzellen gebildet; diese Neurone exprimieren aber kein *Evx1* und entsprechen demnach nicht V0 Interneuronen. Stattdessen nehmen sie das Schicksal eines V1 Neurons an. Auch wenn das *Evx1* Gen mutiert ist, können V0 Interneurone nicht gebildet werden (Moran-Rivard et al. 2001; Pierani et al. 2001). Insgesamt existieren fünf Streifen von Vorläuferzellen im ventralen Rückenmark, aus denen jeweils fünf Neuronentypen hervorgehen, vier unterschiedliche Typen von Interneuronen (V0-V3) und Motorneurone (Mn).

1.4 Entwicklung des dorsalen Rückenmarks

Der dorsale Anteil des Rückenmarks wird als Alarplatte bezeichnet. Auch die Identität von dorsal geborenen Neuronen wird durch Morphogene beeinflusst, wobei auch dort die morphogenen Signale den Vorläuferzellen positionelle Identität zuweisen. Proteine der BMP und Wnt Familie werden anfänglich vom Oberflächenektoderm und später in der Entwicklung auch von dorsalen Strukturen des Rückenmarks, z.B. von der Deckplatte sekretiert und kooperieren bei der Musterbildung in der Alarplatte (s. Abb1 (Casparly and Anderson 2003; Helms and Johnson 2003)). Wenn in Mäusen, aufgrund einer Mutation oder der lokalisierten Expression von Toxinen, die Deckplatte fehlt oder sich nicht korrekt entwickelt, geht dies mit einem partiellen bzw. totalen Verlust von dorsalen Neuronentypen einher (Lee et al. 2000; Chizhikov and Millen 2004). Die Überexpression von stabilisiertem β -Catenin führt zur konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs; dies bewirkt eine Veränderung der Expression von Musterbildungsgenen in den Vorläufern des dorsalen Rückenmarks, und induziert ektopische dorsale Neurone (unpublizierte Daten von Dietmar Zechner). Das Ausschalten von *Wnt1* und *Wnt3a* oder des Bmp Faktors *Gdf7* bewirkt ebenfalls eine veränderte Expression von Musterbildungsgenen und wird von der reduzierten Bildung von dorsalen Neuronentypen begleitet (Muroyama et al. 2002).

Wie die dorsalen Morphogene interpretiert werden, ist noch nicht völlig geklärt. Transkriptionsfaktoren aus der Familie der basischen Helix loop Helix (bHLH) Faktoren (Math1, Ngn1 und Olig3) werden in Streifen in Vorläuferzellen im dorsalen Rückenmark exprimiert. Ihre Expression ist abhängig von Signalen, die von der Deckplatte gegeben werden. Der Verlust dieser bHLH Transkriptionsfaktoren führt zur Fehlspezifizierung der aus der jeweiligen Expressionsdomäne hervorgehenden Interneuronentypen (Bermingham et al. 2001; Gowan et al. 2001; Muller et al. 2005). Generell können innerhalb des dorsalen Neuralrohrs zwei Klassen von Neuronen unterschieden werden: Klasse A Neurone sind abhängig von Signalen, die von der Deckplatte gegeben werden, während Klasse B Neurone unabhängig von solchen Signalen gebildet werden (Muller et al. 2002). Während einer ersten Phase der Neurogenese entstehen sechs Typen von Neuronen im dorsalen Rückenmark (dI1-dI6), drei Typen von Klasse A Neuronen (dI1-dI3) und drei Typen von Klasse B Neuronen (dI4-6). Diese sechs Neuronentypen können anhand der Expression unterschiedlicher Kombinationen von Transkriptionsfaktoren definiert werden (s. Abb.1.2 und (Caspary and Anderson 2003; Helms and Johnson 2003)). Während einer zweiten Phase der Neurogenese entstehen fast keine Klasse A Neurone mehr, sondern hauptsächlich zwei Typen von Klasse B Neuronen (dILA und dILB Neurone, die in einem Salz und Pfeffer Muster gebildet werden (s. auch unten). Sowohl früh geborene dI1-3 als auch spät geborene dI1-dI2 Zellen wandern ventral und bevölkern die tiefen Schichten des dorsalen Horns (Ben-Arie et al. 1997). Die oberen Schichten des dorsalen Horns werden von dI4 und dI5, hauptsächlich aber von den spät geborenen Klasse B Neuronen gebildet (Gross et al. 2002; Muller et al. 2002).

Klasse A Vorläuferzellen sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Olig3 gekennzeichnet (Muller et al. 2005). Zusätzlich exprimieren die Vorläuferzellen von dI1 Zellen Math1, die von dI2 Zellen Ngn1/2 und die von dI3 Zellen Mash1; Math1 kontrolliert die Spezifikation von dI1 Zellen, d.h. in Math1 mutanten Mäusen werden keine dI1 Zellen gebildet, und Math1 Überexpression alleine reicht aus, um die Produktion ektopter dI1 Neurone zu induzieren. Ngn1 und Ngn2 sind für die Spezifizierung von dI2 Zellen essentiell und Mash1 ist an der Spezifizierung von dI3 Zellen beteiligt (Bermingham et al. 2001; Gowan et al. 2001; Helms et al. 2005).

Welche in Vorläufern exprimierte Faktoren für die Spezifizierung von Klasse B Neuronen eine Rolle spielen ist, weitgehend unverstanden. Im Rahmen dieser Arbeit, wie auch durch Helms und Kollegen konnte gezeigt werden, daß Mash1 für die Spezifizierung einer Klasse B Subpopulation wichtig ist (Helms et al. 2005). Der postmitotisch exprimierte Transkriptionsfaktor Lbx1 ist für die Determinierung des Klasse B Schicksals essentiell.

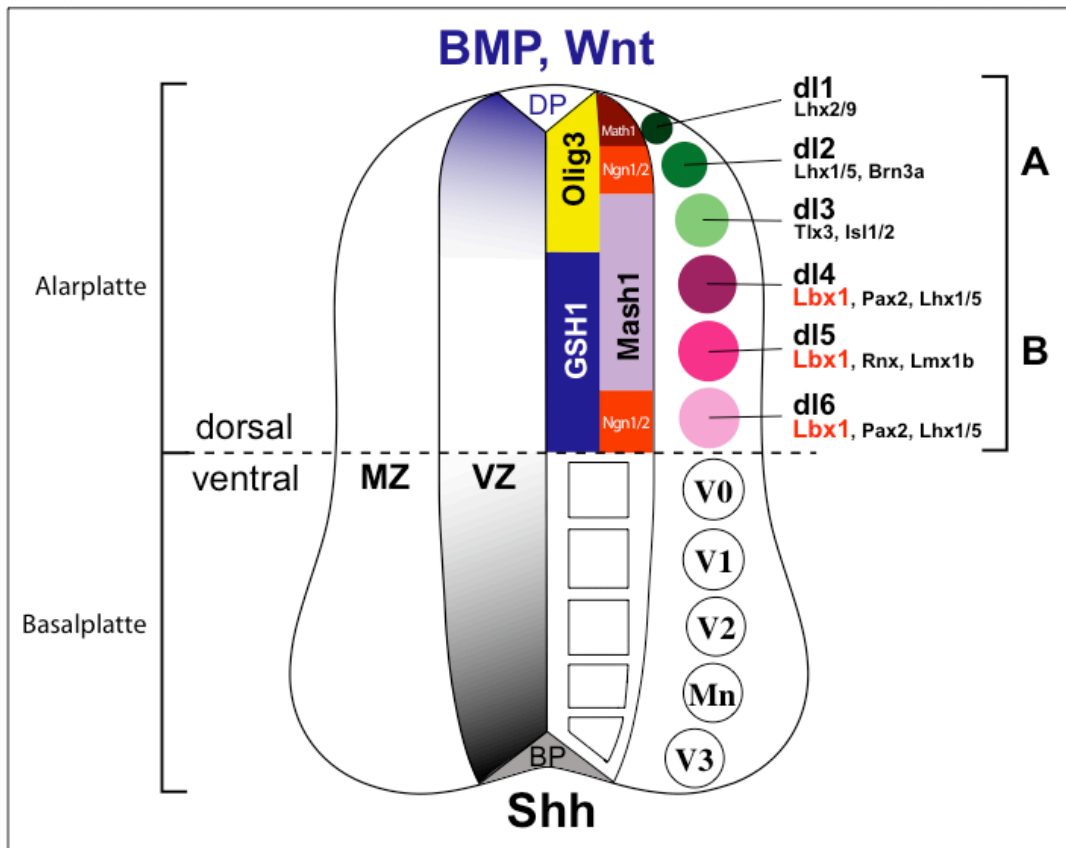


Abb.1.1: Schematische Darstellung der Entwicklung neuronaler Vorläuferzellen und postmitotischer Neurone im Rückenmark des Stadiums E10,5 in der Embryogenese der Maus. Die neuronalen Vorläuferzellen werden in der Ventrikularzone (VZ) gebildet und wandern im Verlauf der Neurogenese lateral in die Mantelzone (MZ), wo sie sich zu postmitotischen Neuronen (dorsal farbige bzw. ventral schwarz umrandete Kreise) entwickeln. Graduelle BMP/Wnt (blauer Gradient) - und Shh-Signale (grauer Gradient) induzieren die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren in der Vorläuferdomäne entlang der dorsoventralen Achse. Gezeigt sind Expressionsdomänen der bHLH Faktoren Math1, Ngn1/2, Olig3 und Mash1 sowie des homöobox Faktors Gsh1, aus denen die dorsalen postmitotischen Neuronentypen d1-d6 hervorgehen (ventral entstehen fünf Neuronentypen: V0-V3 und Mn). Die dorsalen Neurone der Klassen A und B exprimieren jeweils charakteristische Kombinationen von Transkriptionsfaktoren. Klasse A Neurone entstehen abhängig von Deckplatten-Signalen, während Lbx1 Neurone Signale der Deckplatte nicht benötigen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze zwischen der ventralen Basalplatte und der dorsalen Alarplatte. A = Klasse A, B = Klasse B, BMP = „Bone Morphogenetic Proteins“, DP = Deckplatte, BP = Bodenplatte, Mn = Motorneurone, Shh = „Sonic hedgehog“, dl= „dorsale Interneurone“.

Lbx1 definiert Klasse B Neurone, in Lbx1 Mutanten werden keine dorsalen Klasse B Neurone gebildet, sondern stattdessen Klasse A Neurone. Die Bildung von überzähligen Klasse A Neuronen führt dazu, daß die meisten fehlspezifizierten Neurone absterben, und hat zur Konsequenz, daß das dorsale Horn nicht gebildet wird. Die genaue Untersuchung der Mutanten zeigt, daß Olig3 und Lbx1 eine gegensätzliche Funktion haben und sich gegenseitig beeinflussen. Dieses ‚Ying-Yang‘ zwischen Olig3 und Lbx1 reflektiert sich in folgenden Beobachtungen: In Olig3 mutanten Mäusen werden keine Klasse A Neurone gebildet, die dI1-dI3 Neurone nehmen stattdessen den Charakter von Klasse B Neuronen an: In Lbx1 mutanten Mäusen werden keine Klasse B Neurone gebildet. Die dI4-dI6 Neurone nehmen stattdessen den Charakter von Klasse A Neuronen an. Ausserdem ist die Überexpression von Olig3 bzw. Lbx1 ausreichend, um Klasse B in Klasse A bzw. Klasse A in Klasse B Neurone zu transformieren (Muller et al. 2002; Muller et al. 2005).

1.5 Dorsale Rückenmarksinterneurone werden in zwei Phasen der Neurogenese geboren

Im dorsalen Neuralrohr kann die Neurogenese in zwei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase der Neurogenese (E10 - E11.5) werden Interneurone in sechs Streifen in immer gleichen Positionen entlang der dorsoventralen Achse geboren. Dieses Muster geht in der zweiten Phase der Neurogenese (E11.5 – E14) verloren, und es werden kaum noch Klasse A Neurone gebildet. In der zweiten Phase der Neurogenese dehnt sich der Bereich, welcher Klasse B Neurone bildet, nach dorsal aus und es entstehen hauptsächlich zwei Typen spät geborener Interneurone in einem Salz-und-Pfeffer-Muster: dILA und dILB (*dorsal interneurons late A, B*). Welche Moleküle den Übergang von der ersten Phase in die zweiten Phase der Neurogenese kontrollieren, ist ungeklärt.

Die späten dILA und dILB Neurone exprimieren ebenfalls Lbx1, und sie werden in Lbx1 mutanten Mäusen nicht korrekt spezifiziert, d.h. sie nehmen in den Mutanten die Charakteristika von Klasse A Neuronen an. Dies ist vergleichbar mit der

Veränderung, die in den früh geborenen Klasse B Neuronen beobachtet wird (Gross et al. 2002; Muller et al. 2002).

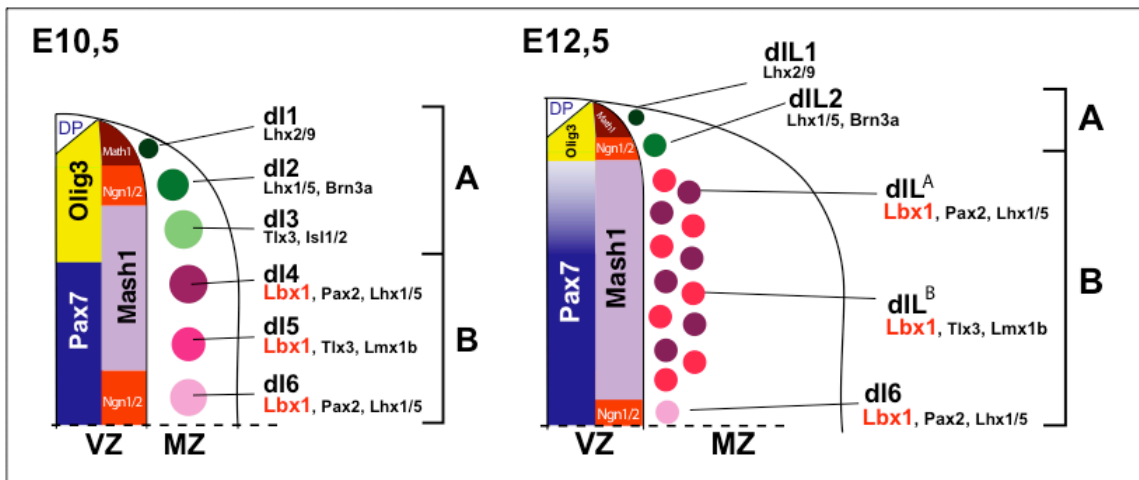


Abb.1.2: Schematische Darstellung der früh und spät geborenen Neurone im dorsalen Rückenmark. In der ersten Phase der Neurogenese (E10-E11.5) werden sechs Typen dorsaler Interneurone (dl1-dl6) an charakteristischen Positionen entlang der dorso-ventralen Achse geboren. In der zweiten Phase der Neurogenese werden nur noch wenige Klasse A (dIL1 und dIL2) Neurone gebildet. Stattdessen dehnt sich die Domäne, die Klasse B Neurone bildet, aus; die Vorläuferzell-Domäne, die Mash1 und Pax7 exprimiert, wird ebenfalls breiter. Die überwiegende Zahl aller Klasse B Neuronen wird in der späten Phase geboren, und entspricht den dILA und dILB Zellen. Sie werden von Mash1 positiven Vorläuferbereich in einem Salz und Pfeffer Muster gebildet. Die verschiedenen Neuronentypen werden durch die Expression der angegebenen Transkriptionsfaktoren definiert (Lbx1, Tlx3, Lmx1b, Lhx1/5, Pax2, Lhx2/9, Brn3a; A, B = Klasse A, B; MZ = Mantelzone; VZ = Ventrikulärzone, DP = Deckplatte).

dILA und dILB Neurone können anhand der Transkriptionsfaktoren, die sie exprimieren, unterschieden werden. dILA Neurone sind durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Lhx1/5 und Pax2 gekennzeichnet, während dILB Neurone die Transkriptionsfaktoren Lmx1b und Tlx3 exprimieren (s. Abb 1.2). Die Gruppen von Quifu Ma und Martin Goulding konnten zeigen, daß es sich bei dILA und dILB Interneuronen um funktionell unterschiedliche Neuronentypen handelt (Cheng et al. 2004). dILA Neurone nehmen in der weiteren Entwicklung einen GABAergen, also inhibitorischen Charakter an. Im Gegensatz dazu nehmen dILB Neurone einen glutamatergen, also exzitatorischen Charakter an. Pax2, ein Transkriptionfaktor der *paired box* Familie, ist essentiell für die Generation der GABAergen Interneurone. Das glutamaterge dILB Schicksal wird durch Tlx3 bestimmt. Tlx3 übernimmt in dILB Zellen nicht nur die Funktion eines Selektorgens, d.h. es induziert nicht nur

dILB Charakteristika sondern unterdrückt auch die Expression von Pax2. Werden Tlx3 und das nahverwandte und ähnlich exprimierte Gen Tlx1 mutiert, verlieren die Neurone ihren glutamatergen Charakter und nehmen einen dILA ähnlichen Charakter an, d.h. sie exprimieren z.B. Pax2 oder Gad67, ein essentielles Enzym der GABA Synthese (Cheng et al. 2004).

Die Differenzierung von dILB Neurone benötigt neben Tlx3 noch zwei weitere Transkriptionsfaktoren, den Lim Homöobox-Transkriptionsfaktor Lmx1b und den paired box Transkriptionsfaktor Drg11. Lmx1b beeinflusst die Expression von Tlx3, ist aber auch abhängig von der Tlx3 Expression (Ding et al. 2004). Desweiteren reguliert Lmx1b die Expression von Drg11. In Drg11 mutanten Mäusen ist das Einwachsen von TrkA positiven sensorischen Afferenzen in die ersten zwei Schichten (Laminae) des dorsalen Horns gestört (Chen et al. 2001).

Die bisher beschriebenen Mechanismen der neuronalen Spezifizierung, beruhen auf der Ausbildung von distinkten Vorläuferdomänen, welche dann jeweils einen bestimmten Neuronentypen produzieren. Die Frage, wie aus einer Domäne zwei verschiedene Neuronentypen in einem Salz und Pfeffer Muster gebildet werden können, wurde bisher nicht beantwortet.

1.6 Neurale Zell-Determinierung und Zellzyklus

1.6.1 Zellzyklus-Austritt und Zellschicksal

In der Entwicklung des Rückenmarks und anderen Regionen des ZNS können an einem Ort unterschiedliche neurale Zelltypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstehen. Im Rückenmark entstehen im ventralen Anteil der Alarplatte zuerst dI3-dI6 Zellen, dann dILA und dILB Zellen, und wieder später gliale Zellen (Gross et al. 2002; Muller et al. 2002; Vallstedt et al. 2005). Nicht nur der Ort der Lokalisation einer Vorläuferzelle bestimmt damit, welcher Zelltyp produziert wird, sondern auch der Zeitpunkt in der Entwicklung, an dem die Tochterzelle differenziert. Entwicklungsstadium und Position tragen also beide dazu bei, daß neurale Diversität entstehen kann.

Offensichtlich differenzieren also nicht alle Vorläuferzellen zum gleichen Zeitpunkt, sondern neurale Differenzierung zieht sich über viele Tage hin. In dieser Zeit können viele Nachkommen von einer Vorläuferzelle gebildet werden, und durch zeitliche Veränderungen der Genexpression in Vorläuferzellen verschiedene differenzierte Zelltypen geboren werden. In einer Domäne von Vorläuferzellen sind parallel Neurogenese fördernde (proneurale) und hemmende Faktoren aktiv, die eine Balance zwischen Neurogenese und Proliferation der Vorläuferzellen ermöglichen.

Eine Erklärung wie die Balance zwischen Neurogenese und Proliferation erreicht werden kann, liefert ein Modell, das als „laterale Inhibition“ bezeichnet wird. Essentielle Moleküle im Modell sind der Rezeptor Notch, sein Ligand Delta und die Moleküle des Notch Signalwegs. Gene, die von Notch kontrolliert werden, gehören zur *Hairy/Enhancer of Split* Familie (Hes; bHLH Transkriptionsfaktoren). Sie funktionieren als transkriptionelle Repressoren und regulieren z.B. proneurale bHLH Faktoren und Inhibitoren des Zellzyklus. Eine Zelle mit hoher Notch Aktivität behält den Vorläufercharakter (Beatus and Lendahl 1998; Hitoshi et al. 2002). Zellen mit niedriger Notch Aktivität exprimieren verstärkt proneurale bHLH Faktoren. Proneurale bHLH Faktoren induzieren die Expression panneuraler Gene, aber auch den Notch Liganden Delta. Die Induktion von Delta führt zu einem starken Notch Signal in den Nachbarzellen, die daraufhin weniger proneurale bHLH Faktoren oder Delta exprimieren. Eine Zelle mit hoher Delta Expression differenziert also, reprimiert aber gleichzeitig die Differenzierung ihrer Nachbarzellen. Dieses Modell wurde aufgrund genetischer Analysen der neuronalen Differenzierung in *Drosophila* entwickelt. Die Funktion von Notch ist auch in Säugern gut konserviert. In Mäusen, die eine Mutation im Notch1 Gen oder eine Doppelmutation von Hes1/5 tragen, wird eine vorzeitige Differenzierung aller neuralen Vorläuferzellen beobachtet. Dadurch wird der Vorläuferpool vorzeitig erschöpft, es werden insgesamt zu wenig Neurone gebildet, und die späten Zelltypen entstehen nicht (de la Pompa et al. 1997; Ohtsuka et al. 1999; Hatakeyama et al. 2004).

1.6.2 Die Verknüpfung von Zellteilung und Zellschicksal

In *Drosophila* spielt Notch nicht nur in der Neurogenese, sondern auch in der Spezifizierung von Zellen eine Rolle. So konnte beobachtet werden, daß die unterschiedlichen Zellen sensorischer Organe aus einer einzigen Vorläuferzelle, dem „*Sensory Organ Precursor*“ (SOP) hervorgehen. Die SOP durchläuft eine asymmetrische Zellteilung, und bildet unterschiedliche, teilungsfähige Tochterzellen, die sich wieder asymmetrisch teilen und verschiedene Zellen bilden. Während dieser Teilungen wird Notchaktivität asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt. Hohe oder niedrige Notchaktivität erlaubt es den Tochterzellen, unterschiedliche Zellschicksale anzunehmen. Das Molekül, das für die Asymmetrie verantwortlich ist, ist Numb. Numb ist ein negativer Regulator des Notchsignalwegs, und Numb wird in den Zellteilungen asymmetrisch verteilt (zur Übersicht s. (Lai and Orgogozo 2004)). Wird die Asymmetrie unterbunden und erhalten beide Zellen entweder eine hohe oder niedrige Notchaktivität, differenzieren alle SOP Nachkommen in einen Zelltyp. Diese Asymmetrie in der Zellteilung beeinflusst also das Zellschicksal.

Im Nervensystem von Vertebraten sind bisher drei Arten von Teilungen beschrieben; 1) symmetrische Teilungen, in denen aus einem Vorläufer wieder zwei Vorläufer entstehen, 2) symmetrisch terminale Teilungen, bei denen aus einem Vorläufer zwei neurale Zellen entstehen, 3) asymmetrische Teilungen in denen ein Vorläufer eine neurale Zelle und einen Vorläufer generiert (Wodarz and Huttner 2003). Auch in Vertebraten beeinflusst die asymmetrische Verteilung/Aktivität von Molekülen, ob sich eine Vorläufer- oder eine neuronale Zelle bildet. Ob solche asymmetrischen Zellteilungen auch unterschiedliche neurale Zellschicksale bestimmen, wurde bisher nicht untersucht.

1.7 Die Rolle von Mash1 in der Entwicklung des Nervensystems

Mash1 (murine achaete scute homolog) ist ein proneuraler Transkriptionsfaktor der bHLH Familie und zeigt Sequenzähnlichkeiten mit Atonal (z.B. Math1) oder den Neurogeninen (Ngn1, Ngn2). Mitglieder dieser Transkriptionsfaktor-Familien wurden zuerst in *Drosophila* identifiziert und später als Homologe in Vertebraten gefunden. Mash1 wird wie Math1 und Ngn1 in Vorläuferzellen des Nervensystems ausgeprägt.

Diese Faktoren können sich gegenseitig reprimieren, und deshalb sind die Vorläuferdomänen, die unterschiedliche Faktoren ausprägen, oft klar getrennt (Gowan et al. 2001).

Das Mash1 Gen wurde bereits 1993 in der Maus mutiert (Guillemot et al. 1993), und seitdem wurden Funktionen von Mash1 in einer Reihe neuraler Gewebe charakterisiert. Zunächst konnten Guillemot und Kollegen zeigen, daß Mash1 die Entwicklung des autonomen Nervensystems kontrolliert und die Differenzierung der sympathischen Ganglien steuert. Die spätere Analyse des ventralen Telencephalon zeigte auf, daß Mash1 auch ein wichtiger Regulator der Neurogenese im zentralen Nervensystem ist. In den Mash1 mutanten Tieren wurden eine vorzeitiger Bildung der subventrikulären Zone beobachtet; dies ging mit der Bildung einer zu geringen Zahl von Neuronen einher (Casarosa et al. 1999). Dieser Defekt in der Neurogenese konnte mit einer Veränderung im Notch-Signalweg in Verbindung gebracht werden, da die Expression von Notch Liganden (Deltalike 1 und -3) und von Notch-regulierten Genen (Hes5) reduziert oder unterbunden war. Mash1 und Ngn1/2 sind für die Bildung verschiedener Neuronentypen im Telencephalon notwendig (Fode et al. 2000). Die Mash1-positiven Vorläuferdomäne im ventralen Telencephalon bildet GABAerge Neurone, die in Mash1 mutanten Mäusen nicht entstehen. Im Gegensatz dazu ist Ngn1 notwendig, um die Expression von dorsalen Markern aufrechtzuerhalten und die von ventralen Markern zu unterdrücken.

Parras und Kollegen konnten zeigen, daß der Verlust bestimmter Arten von Neuronen in Mash1 mutanten Tieren nicht nur von der proneuralen Funktion des Gens abhängt. Vielmehr übernimmt Mash1 auch eine Funktion in der Spezifizierung von bestimmten neuronalen Zelltypen (Parras et al. 2002). Um diese beiden Funktionen, die proneurale und die Spezifizierungs-Aktivität zu entkoppeln, wurden im Mash1 Locus die kodierenden Sequenzen durch Ngn2 cDNA ersetzt (Mash1^{Ngn2} und Ngn2^{Mash1} „knock in“ Allele). Da Mash1 und Ngn2 eine proneurale Funktion besitzen, konnte der generelle Neurogenesedefekt, der durch das Ausschalten des jeweiligen Gens entstand, durch den ausgetauschten Faktor gerettet werden. Das heißt, daß in den Mutanten- und Kontrolltieren die gleiche Anzahl von Neuronen geboren wurden. Allerdings kam es in beiden Linien zur einer Fehlspezifizierung von bestimmten

Neuronentypen, z.B. wurden die serotonergen Neuronen im Hirnstamm nicht korrekt spezifiziert (Pattyn et al. 2004). Auch hier konnte gezeigt werden, daß Mash1 sowohl als proneurales Gen als auch als Faktor für die Differenzierung wichtig ist. Neben der proneuralen Aktivität ist Mash1 für die korrekte Expression der Gene Lmx1b, GATA3 und Pet1 notwendig. Proneurale Gene wie Mash1 induzieren also neuronale Differenzierung, tragen aber auch zur Spezifizierung von bestimmten neuronalen Zelltypen bei.

Der bHLH Transkriptionsfaktor Mash1 wird in der Embryogenese ausschließlich in neuralen Vorläuferzellen exprimiert. Die breite Expression in der Vorläuferdomäne von dorsalen spinalen Interneuronen und die Verbreiterung der Mash1 Expressions-Domäne, die im Übergang von der ersten zur zweiten Phase der Neurogenese beobachtet wird, konnten als ein Indiz für eine wichtige Funktion von Mash1 in der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks interpretiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, eine Funktion von Mash1 im dorsalen Rückenmark zu untersuchen. Im Besonderen wurde untersucht:

- 1) Unterschiedliche Funktionen von Mash1 in der ersten und zweiten Phase der Neurogenese.
- 2) Die Funktion von Mash1 in der Bildung der dILA und dILB Neurone, die in einem Salz und Pfeffer Musters während der zweiten neurogenen Phase geboren werden; in der Mash1 Mutante ist hauptsächlich die Bildung von dILA Neuronen beeinträchtigt.
- 3) Funktionelle Konsequenzen, die durch das Fehlen von dILA Neuronen in neugeborenen Embryonen auftreten.