

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *Mash1* sowohl während der ersten als auch während der zweiten Phase der Neurogenese im dorsalen Rückenmark für die korrekte Entwicklung von dorsalen Neuronentypen essentiell ist. Die Funktion von *Mash1* verändert sich aber von der frühen zur späten Phase der Neurogenese. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß *Mash1* während der ersten Phase der Neurogenese eine instruktive Rolle in der Spezifizierung der *Tlx3+* neuronalen Subtypen spielt, aber keine essentielle Funktion in der Neurogenese hat. Während der zweiten Phase der Neurogenese ist *Mash1* sowohl für die Spezifizierung als auch für die Neurogenese der dILA Neurone essentiell. Dafür ist eine asymmetrische Funktion von *Mash1* notwendig. Nachfolgend werde ich die Funktion von *Mash1* mit Bezug auf die jeweilige Phase der Neurogenese diskutieren.

4.1 Die frühe Funktion von *Mash1*

4.1.1 *Mash1* ist für die Spezifizierung der *Tlx3+* dI3 und dI5 Zellen notwendig

Während der ersten Phase der Neurogenese werden drei der sechs dorsalen Neuronentypen aus dem *Mash1+* Domäne gebildet (dI3-dI5) und die Analyse von Mäusen, die ein *Mash1^{GFP}* Allel besitzen, zeigte, daß wahrscheinlich alle, aber auf jeden Fall die Mehrheit aller dI3-dI5 Neurone in ihrer Entwicklung *Mash1* exprimierten. Im dorsalen Anteil der Alarplatte werden in den *Mash1* mutanten Embryonen dI3 Neurone in verminderter Anzahl gebildet. Das geht mit einer Expansion der dorsalen *Ngn1* Expressionsdomäne und mit der Bildung von dI3* Neuronen einher, die molekulare Charakteristika von dI2 Neuronen zeigen und aus der verbreiterten *Ngn1* Domäne stammen. Im ventralen Anteil der Alarplatte werden dI5 Neurone (*Tlx3+* und *Lmx1b+*) in *Mash1*^{-/-} Embryonen misspezifiziert, und stattdessen werden dI5* Neurone gebildet die *Pax2* und *Lhx1/5* exprimieren. Auch in diesem Fall expandiert angrenzende *Ngn1* Expressionsdomäne.

Während der ersten Phase der Neurogenese könnte *Mash1* somit primär *Ngn1* reprimieren. Eine gegenseitige Repression der dorsal exprimierten proneuralen bHLH Gene (*Math1*, *Ngn1* und *Mash1*) konnte bereits von anderen gezeigt werden (Gowan

et al. 2001). Das Mash1 auch eine aktive Rolle in der Spezifizierung von Neuronen spielt, zeigen die durch Überexpression gewonnen Befunde. So ist Mash1 in der Lage, Tlx3 und Lmx1b in der gesamten Alarplatte zu induzieren. Das weist auf eine instruktive Rolle von Mash1 in der Spezifizierung von Tlx3+ Neuronen hin. Mash1 ist also während der ersten Phase der Neurogenese notwendig um 1) die Grenze zu der Expressionsdomänen von Ngn1 festzulegen und 2) die Expression von Tlx3 zu induzieren (s. Abb. 4.1).

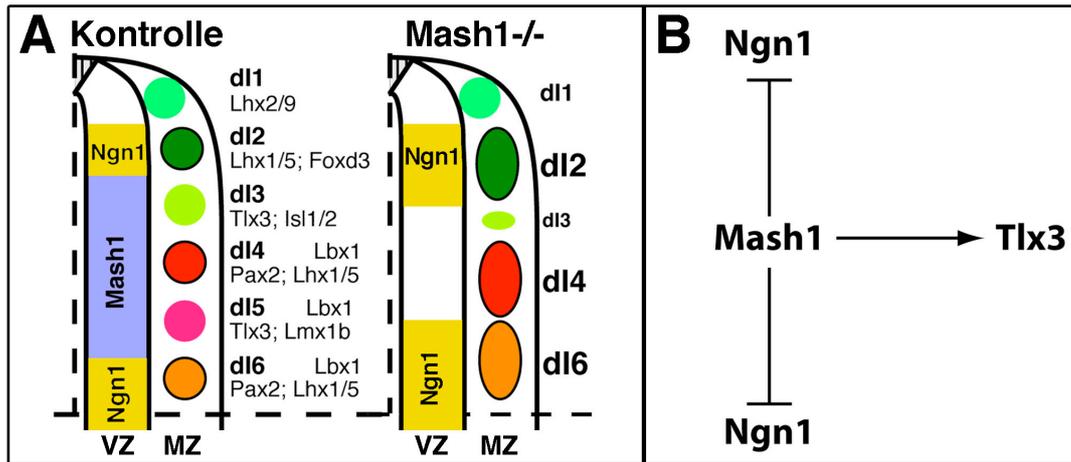


Abb. 4.1 Duale Funktion von Mash1 während der ersten Phase der Neurogenese (A) Schematische Darstellung der Veränderung von Zellschicksalen in Mash1 mutanten Mäusen (Mash1^{-/-}). Die bHLH Faktoren Mash1 und Ngn1 werden in angrenzenden Bereichen innerhalb der Vorläuferschicht (VZ) exprimiert. Aus den verschiedenen dorsalen Vorläuferbereichen gehen sechs Typen dorsaler Interneurone (d1-6) hervor, welche durch die Expression unterschiedlicher Kombinationen von Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet sind. In Mash1 mutanten Tieren expandieren die Ngn1+ Vorläuferbereiche, sowie die Anzahl der aus den Ngn1 hervorgehenden Neuronentypen. (B) Mash1 hat während der ersten Phase der Neurogenese eine duale Funktion: Die gegenseitige Repression von Mash1 und Ngn1 definiert die Grenze der Mash1/Ngn1 Expressionsdomänen. Mash1 ist außerdem für die Induktion von Tlx3 notwendig. Der Verlust von Mash1 führt daher zu einer reduzierten Anzahl von Tlx3+ Neuronen (d13 und d15) während der ersten Phase der Neurogenese (A).

4.1.2 Kontextabhängige Funktion von Mash1

Unterschiede in der Spezifizierung der Tlx3+ Neurone (d13 Neurone sind Isl1/2+/Tlx3+ und d15 Neurone sind Lmx1b+/Tlx3+) sind durch Kontext abhängige Interaktionen von Mash1 mit anderen Transkriptionsfaktoren zu erklären. So konnte z.B. durch Müller und Kollegen gezeigt werden, daß die gleichzeitige Überexpression von Olig3 und Mash1 zur Induktion von Isl1/2+/Tlx3+ Neuronen in der gesamten Alarplatte führt. Im Gegensatz dazu induziert Mash1 alleine die Bildung von

Isl1/2+/Tlx3+ Neuronen dort, wo endogenes Olig3 exprimiert wird (Muller et al. 2005).

Obwohl auch dI4 Neurone aus einer Mash1+ Vorläuferdomäne stammen, exprimieren diese Neurone kein Tlx3. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß eine Funktion von Mash1 in den Vorläuferzellen von dI4 unterdrückt ist. Erst nach Überexpression von *Mash1* können Tlx3+ Neurone auch von dI4 Vorläufern gebildet werden. Falls solch ein reprimierender Faktor existieren würde, wäre er also austitrierbar. Biochemische Untersuchungen zeigen, daß Mash1 Heterodimere mit den ubiquitär exprimierten bHLH Faktoren der E/Daughterless Familie bildet, und nur als Heterodimer DNA binden kann (Johnson et al. 1992). Id Proteine können ebenfalls E-Proteine binden, und Id und proneurale bHLH Faktoren konkurrieren um E-Proteine; falls kein E-Proteine für Mash1 vorhanden sind, funktioniert der Faktor nicht (Benezra et al. 1990; Garrell and Modolell 1990). *Id2* wird im dorsalen Vorläuferbereich des Rückenmarks exprimiert und könnte also solche eine Repression vermitteln (Dubreuil et al. 2002).

4.2 Die späte Funktion von Mash1

4.2.1 Asymmetrische Funktion von Mash1

Ich konnte zeigen, daß Mash1 erst ab dem Stadium E11.5, also mit dem Beginn der zweiten Phase der Neurogenese, essentiell für die normale Neurogenese im dorsalen Rückenmark ist. Mash1 gewinnt also mit dem Fortschreiten der Entwicklung als proneuraler Faktor an Bedeutung. Notchsignale bewirken, daß Vorläuferzellen nicht in Neurone differenzieren, und während der Entwicklung steigt die Notchaktivität an (Wu et al. 2003). Mash1 könnte also zunehmend wichtig werden, um der Notch Aktivität entgegen zu wirken. Mash1 und Ngn2 wirken beide als proneurale Faktoren (Parras et al. 2002), und beide induzieren die Expression des Notchliganden DLL1. Die Analyse der Mash1^{Ngn2/Ngn2} mutanten Mauslinie zeigte, daß der Neurogenesedefekt in Mash1^{-/-} Embryonen nicht durch Ngn2 gerettet werden kann, während die Expressionen von *Dll1* und von *Hes5* wieder hergestellt wird. Dies reicht aber nicht aus, um den Neurogenesedefekt zu beheben. Im Gegensatz dazu kann im Stammhirn oder im Telencephalon Ngn2 die Rolle von Mash1 in der Neurogenese übernehmen

(Parras et al. 2002; Pattyn et al. 2004). Im dorsalen Rückenmark sind die proneuralen Funktionen von Mash1 und Ngn2 aber nicht äquivalent.

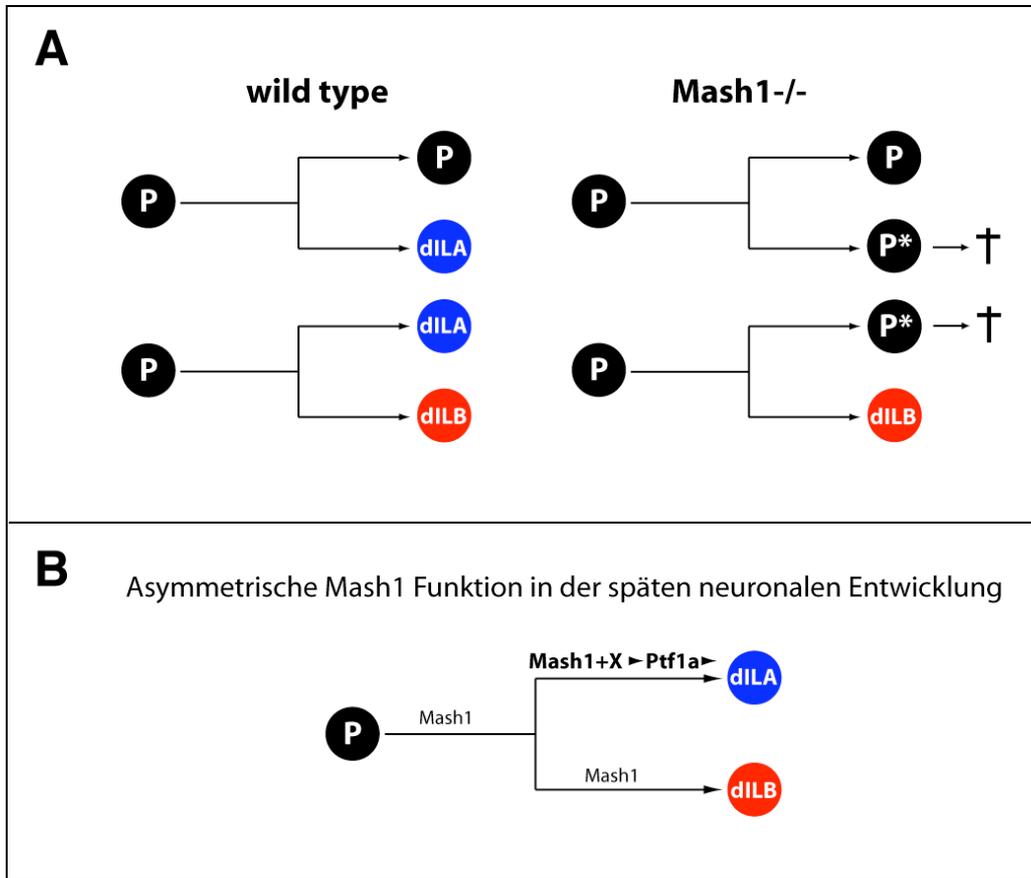


Abb. 4.2 Asymmetrische Mash1 Funktion in der Entwicklung von dILA Neuronen

Schematische Darstellung von Vorläuferteilungen die dILA Neurone produzieren (A) und der Funktion von Mash1 in der Entwicklung von dILA Neuronen (A und B). (A links) In den Kontrolltieren gingen dILA Neurone (blau) nur aus asymmetrischen Teilungen hervor. Diese Teilungen können nicht-terminal sein und produzieren dann ein Neuron und einen Vorläufer (P, schwarz), oder aber terminal und produzieren dann ein dILA und ein dILB (rot) Neuron. (A rechts) In Mash1^{-/-} Tieren werden überzählige Vorläufer (P*) statt dILA Zellen gebildet. Die überzähligen Vorläufer werden durch Apoptose (†) eliminiert. (B) Darstellung eines Modells der Funktion von Mash1 in asymmetrischen terminalen Teilungen. Mash1 wird in dem Vorläufer exprimiert der ein dILA und ein dILB Neuron produziert. Während der Entwicklung des dILA Neurons übt Mash1 eine essentielle Funktion in der Spezifizierung und der Neurogenese von dILA nicht aber dILB Neuronen aus und wirkt somit asymmetrisch. Die asymmetrische Funktion kommt durch die Interaktion mit einem noch nicht identifizierten Kofaktor (X) zustande.

Während der zweiten Phase der Neurogenese werden hauptsächlich zwei Typen dorsaler Neurone aus der Mash1+ Vorläuferdomäne geboren, die dILA und dILB Neurone. Interessanterweise ist in den Mash1^{-/-} und Mash1^{Ngn2/Ngn2} Mäusen nur die Bildung von dILA Neuronen beeinträchtigt, während die Anzahl der dILB Neurone in

etwa gleich bleibt. Retrovirale Zellschicksalexperimente zeigten, daß dILA Neurone nur aus asymmetrischen Zellteilungen hervorgehen (s. Abb. 4.1). Mash1 wird in den Vorläufern von dILA und dILB Neuronen exprimiert, wirkt also asymmetrisch während der Bildung von dILA Neuronen.

In den *Mash1* mutanten Tieren entstehen statt dILA Neuronen überzählige Vorläuferzellen. Der Vergleich des Proliferationsindex zeigt, daß die überzähligen Vorläuferzellen in *Mash1*^{-/-} Embryonen in der Lage sind, BrdU einzubauen. Viele Vorläuferzellen in *Mash1*^{-/-} Embryonen exprimieren Lbx1. Lbx1 markiert postmitotische Neurone und wird in Kontrolltieren nur von wenigen Zellen innerhalb der Vorläuferschicht exprimiert. Da außerdem die Apoptose in der Vorläuferschicht von *Mash1*^{-/-} Embryonen stark erhöht war, nehme ich an, daß die Vorläuferzellen die sich fälschlicherweise nicht zu dILA Neuronen entwickeln, trotz der Lbx1 Expression noch in die S-Phase eintreten, letztendlich aber durch Apoptose eliminiert werden (s. a. Abb. 4.2).

4.2.2 Mash1 und die Spezifizierung von dILA Neuronen

Ich habe oben bereits dargelegt, daß Mash1 während der ersten Phase der Neurogenese eine instruktive Funktion in der Spezifizierung von Tlx3 positiven Neuronen übernimmt. Außerdem konnte ich zeigen, daß Mash1 für die Neurogenese von dILA aber nicht von dILB Neuronen notwendig ist. Darüberhinaus ist Mash1 auch für die Spezifizierung der dILA Neurone notwendig. Ich konnte zeigen, daß Ptf1a weder in *Mash1*^{-/-} noch in *Mash1*^{Ngn2/Ngn2} Embryonen induziert wird. Ptf1a ist essentiell für die dILA Spezifizierung (Jane Johnson, persönliche Kommunikation und Development, im Druck). Ptf1a wird während der neuronalen Differenzierung nur transient in Vorläuferzellen sowie in neugeborenen Neuronen exprimiert. Der transiente Charakter der Ptf1a Expression, die Lokalisation der Ptf1a positiven Zellen in der lateralen Vorläuferschicht sowie der Umstand, daß einige dILA Neurone Ptf1a exprimieren, während dILB Neurone immer negativ für Ptf1a sind, weist darauf hin, daß Ptf1a nach der letzten M-Phase transient exprimiert wird und nur in den Tochterzellen erscheint, die zu dILA Neuronen differenzieren. Die Verwendung eines Ptf1a^{cre}-Allels zeigt, daß Ptf1a nur in den Vorläufern von dILA Neuronen im Rückenmark exprimiert wird (Glasgow et al. 2005), passend zu den Ergebnissen über

die Entwicklung des Cerebellums und Rhombenzephalons, wo *Ptf1a* nur in den Vorläufern von GABAergen Neuronen exprimiert wird (Hoshino et al. 2005). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß *Mash1* die Spezifizierung von dILA Neuronen kontrolliert, indem es *Ptf1a* Expression reguliert.

In Überexpressions-Experimenten war *Mash1*, im Gegensatz zu *Ptf1a*, nicht in der Lage dILA (*Pax2+*) Zellen zu induzieren. Vielmehr wurden durch die *Mash1* Überexpression überzählige *Tlx3+* Neurone induziert. *Mash1* ist für das dILA Schicksal also notwendig aber nicht ausreichend. Kofaktoren, die mit *Mash1* interagieren um *Ptf1a* Expression zu induzieren, müssen also existieren.

Die Funktion von *Mash1* ist offensichtlich auch während der zweiten Phase der Neurogenese vom zellulären Kontext abhängig. *Mash1* wird in den meisten, wahrscheinlich in allen dILA und dILB Vorläuferzellen exprimiert. Die Mutation des *Mash1* Gens beeinflusste aber ausschließlich die Bildung von dILA, aber nicht die Bildung von dILB Neuronen. Da nun ein dILA und ein dILB Neuron aus einer einzigen, sich teilenden Vorläuferzelle hervorgehen kann, muß *Mash1* asymmetrisch aktiv sein um die Neurogenese und Spezifizierung von dILA Zellen zu bestimmen. Allerdings sollte darauf hingewiesen werden, das *Mash1* alleine nicht ausreicht, um *Ptf1a* und dILA Zellen zu induzieren, und ein Kofaktor benötigt wird. *Mash1* müsste also nicht asymmetrisch verteilt werden. Stattdessen würde genügen, wenn der Kofaktor asymmetrisch verteilt wäre. Untersuchungen zur Spezifizierung des Pancreas haben gezeigt, das *Ptf1a* für die Spezifizierung des exokrinen Schicksals wichtig ist. Bei der Differenzierung von Pankreas Vorläuferzellen in exokrine- oder endokrine Zellen spielt der Notch-Signalweg eine Rolle. Die exokrine Linie (*Ptf1a+*) ist abhängig von Notch ((Habener et al. 2005)). Da eine asymmetrische Funktion von Notch bekannt ist (Wodarz and Huttner 2003; Lai and Orgogozo 2004), wäre es möglich, daß der postulierte Kofaktor einer asymmetrisch verteilten Notch-Signalkomponente entspricht, die zusammen mit *Mash1* die Spezifizierung von dILA Zellen reguliert.

4.3 Funktionelle Defizite in *Mash1* mutanten Mäusen

Der Überzahl der Neurone des dorsalen Horns wird während der zweiten Phase der Neurogenese gebildet, und entwickeln sich also aus dILA oder dILB Zellen. In den *Mash1*^{-/-} Tieren werden weniger dILA, aber eine korrekte Anzahl von dILB Zellen gebildet. Ich ging also davon aus, dass alle Derivate von dILA Neuronen in reduzierter Anzahl, aber Derivate von dILB Neuronen in etwa gleicher Anzahl in den *Mash1* mutanten Mäusen vorhanden sein sollten. *Mash1* mutante Mäuse weisen zum Zeitpunkt der Geburt eine starke Reduktion von Pax2⁺, GABAergen Neuronen im dorsalen Rückenmark auf. Demgegenüber ist die Anzahl der Neurone, welche in den Schichten des dorsalen Horns auftauchen, in *Mash1*^{-/-} und Kontroll-Tieren vergleichbar. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Cheng und Kollegen, die zeigen konnten, daß Pax2⁺ (dILA) Neurone sich zu GABAergen Neuronen differenzieren, während Tlx3⁺ (dILB) Neurone die glutamatergen Zellen in der obersten Schichten des dorsalen Horns bilden (Cheng et al. 2004). Meine Analyse zeigt darüber hinaus, das die Tlx3⁺ (dILB) Zellen nicht nur die Neurone in der obersten (Tlx3⁺) Schicht, sondern auch Neurone in der tieferliegenden Schicht bilden.

Meine Analysen von sensorischen Projektionen im dorsalen Horn zeigte, das die Reduktion der dILA Zellen und ihrer Derivate, der GABAergen Neurone, keinen Einfluß auf die Innervation des Rückenmarks hatte. Alle anderen, bisher analysierten Mausmutanten mit veränderter Entwicklung des dorsalen Horns zeigten eine abnorme Innervation. In diesen mutanten Tieren ist die Entwicklung von dILB Zellen in verschiedenem Ausmaß beeinträchtigt; dies deutet daraufhin, dass die Derivate von dILB, die Aufgabe übernehmen, das Einwachsen der sensorischen Nerven zu kontrollieren, während die Derivate der dILA Zellen zu diesem Entwicklungsschritt nicht weiter beitragen.

Der spinale Reflexbogen wurde mit Hilfe von Paul Heppenstall elektrophysiologisch untersucht. In solchen Untersuchungen wird die dorsale Wurzel stimuliert, und der elektrische Reiz wird an der ventralen Wurzel als sogenanntes ventrales Wurzelpotential elektrophysiologischen abgeleitet. Die elektrophysiologischen Ableitungen in der Gegenwart des GABA_A-Rezeptor Antagonisten Bicuculine zeigte, das GABAergen Neurone im Rückenmark der Neugeborenen Embryonen

bereits funktionell sind und inhibitorisch wirken. A-Faser vermittelte Potentiale werden durch dicke myelinisierte Fasern übertragen und z.T. direkt auf Motoneurone verschaltet, deshalb führt das A-Faser vermittelte Potential zu einer schnellen Reizantwort. C-Faser vermittelte Potentiale werden durch unmyelinisierte dünne Fasern übertragen und immer indirekt auf Motoneurone verschaltet, erreichen Motoneurone deshalb erst nach einer Latenzzeit, und bilden daher den langsam Anteil des ventralen Wurzel Potentials. Durch die Blockade der GABA_A-Rezeptoren kam es zu einer starken Erhöhung sowohl des A-Faser als auch des C-Faser vermittelten Potentials in Kontrolltieren. Repetitive Simulation bewirkt eine Steigerung des abgeleiteten Potentials an der ventralen Wurzel, die als *wind-up* bezeichnet wird, und diese Steigerung ist C-Faser- und Aktivitätsabhängig. Dieses Phänomen beschreibt und reflektiert eine einfache Form spinaler synaptischer Plastizität (Herrero et al. 2000). Durch die Blockade der GABA_A-Rezeptoren wird *wind-up* verhindert. Diese Ergebnisse zeigen, daß der GABAerge Schaltkreis mit hoher Intensität arbeitet, denn der Verlust der Inhibition durch die Applikation des GABA-Antagonisten führt zu einer starken Erhöhung der Reizantwort. Zudem beruht *wind-up* auf einer Abnahme der GABAergen Inhibition. Wenn die GABAerge Inhibition durch Bicuculine unterdrückt wird, induziert die erste Stimulation bereits eine maximalen Antwort, und wiederholte Stimuli können diese Antwort nicht weiter steigern (s. dazu auch (Reeve et al. 1998; Mascias et al. 2002)).

Die Reduktion in der Anzahl dorsaler GABAerger Interneurone in *Mash1*^{-/-} Tieren, hat keinen Einfluß auf die A-Faser vermittelte Antwort, da diese durch die direkte Verschaltung sensorischer Fasern auf die ventral gelegenen Motoneurone zustande kommt. Die C-Faser vermittelte Antwort hingegen beruht auf der Verarbeitung von sensorischen Signalen durch das dorsale Horn. Daher führt der Verlust von dorsalen GABAergen Neuronen in den *Mash1*^{-/-} Tieren zu einer reduzierten Inhibition der C-Faser-vermittelten Antwort. Da *wind-up* auf einer Abnahme der GABAergen Inhibition beruht, und diese Inhibition in *Mash1*^{-/-} Tieren aufgrund der verminderten Anzahl GABAerger Neurone bereits geringer als in Kontrolltieren ist, kommt es in *Mash1*^{-/-} Tieren zu einem verminderten *wind-up*.

Mit Paul Heppenstalls Hilfe konnte ich also zeigen, daß die von den dILA Zellen gebildeten inhibitorischen Interneurone essentiell für die Plastizität des spinalen

Reflexbogens sind. Der Verlust dieser Interneurone beeinträchtigt die normale Reflex-Verarbeitung sowie die Plastizität des Reflexbogens. Die Bildung des korrekten Anteils von dILA/dILB Neuronen ist also kritisch für die Funktionalität des dorsalen Rückenmarks.