

1. Einleitung

Während der Ontogenese entsteht ein komplexer Organismus aus einer einzigen befruchteten Eizelle. Die Prozesse während der Entwicklung eines Organismus, insbesondere des Nervensystems, weisen eine hohe Komplexität auf. Allein das menschliche Gehirn besteht aus geschätzten 10^{11} Nervenzellen (Neuronen). Dabei geht man von einigen tausenden neuronalen Zelltypen aus, die mit mehr als 10^{12} Gliazellen in Verbindung stehen (Kandel *et al.*, „Principles of Neural Science“, 1991). Es stellt sich die Frage, wie die Vielfalt an Zellen entsteht und worauf die Unterschiede zwischen ihnen beruhen. Mehrere grundlegende Prozesse tragen zur zellulären Vielfalt bei: Zellproliferation, Musterbildung, Morphogenese, Zelldifferenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod). Während der Musterbildung wird innerhalb des Embryos ein räumliches und zeitliches Muster von Zellaktivitäten aufgebaut, das durch differentielle Genexpression erzeugt wird. Spezifische Expressionsmuster von Faktoren sind sowohl entlang der antero-posterioren als auch der dorso-ventralen Achse beobachtbar. Durch die differentielle Genexpression erhalten Zellen ihre jeweilige Identität, die ihr zukünftiges Verhalten festlegt und zu ihrer endgültigen Differenzierung führt. Dabei können Zellen das Schicksal anderer Zellen beeinflussen, indem sie Signale geben oder beantworten (Wolpert: Entwicklungsbiologie, 1999). Für die Entwicklung sind diejenigen Faktoren besonders wichtig, die bei der Aktivierung oder Repression von Genen eine entscheidende Rolle spielen. Dazu gehören sowohl Transkriptionsfaktoren als auch Signalübertragungsmoleküle. Ihre Identifizierung und Charakterisierung – zum Beispiel durch gezielte Mutagenese – hat unter anderem zum besseren Verständnis von erblich bedingten neurologischen Defekten beigetragen (George *et al.*, „Neuroscience“, 2001).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die funktionelle Analyse des Helix-Schleife-Helix Transkriptionsfaktors Olig3 in der Neurogenese, speziell in der Spezifizierung von Neuronen, im embryonalen Rhombencephalon.

Darüber hinaus wird die Einführung einer gezielten Mutation in das *c-Maf*-Gen dargestellt. Mithilfe von zwei genetisch veränderten Mauslinien soll in der Zukunft die Funktion von *c-Maf* in der Neurogenese des dorsalen Rückenmarks aufgeklärt werden.

Zum besseren Verständnis der durchgeführten Experimente und deren Ergebnisse wird im Folgenden ein Einblick in die Entwicklung und Struktur des zentralen Nervensystems, insbesondere des Rhombencephalons der Maus, gegeben. Überdies werden die Prozesse

Neurogenese und Zellwanderung genauer betrachtet und die für diese Arbeit relevanten Transkriptionsfaktoren vorgestellt.

1.1 Entwicklung des Nervensystems

In den folgenden Ausführungen werde ich mich auf Vertebraten, speziell den in dieser Arbeit verwendeten Modellorganismus Maus, beschränken und hauptsächlich Aspekte der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) darstellen.

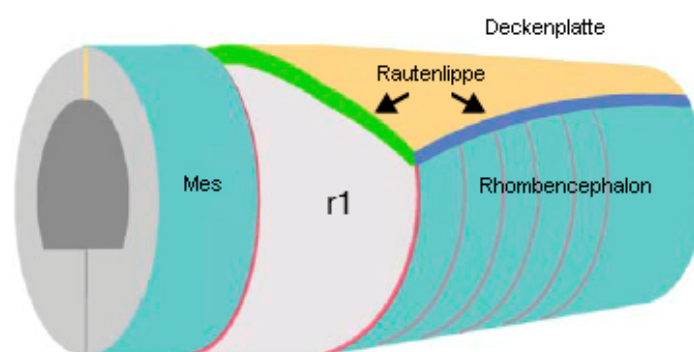
Während der Embryogenese in der Maus wird das ZNS erstmals um den neunten Tag der Embryonalentwicklung (E9) sichtbar (Rossant und Tam, „Mouse development“, 2002). In allen Tieren entwickelt sich das Nervensystem aus dem Ektoderm. In Vertebraten stammt das Nervensystem hauptsächlich von Zellen des Neuralrohrs ab, einer Einstülpung des Ektoderms. Das zentrale Nervensystem umfasst das Rückenmark, das Gehirn und die Retina des Auges (Alberts *et al.*, Molekularbiologie der Zelle, 1995).

Anfangs wird das Ektoderm entlang der dorsalen Mittelachse des Embryos als Neuralplatte angelegt. Während der Neurulation faltet sich die Neuralplatte beiderseitig der Mittellinie auf und die Neuralwülste verschmelzen miteinander. Anschließend löst sich das Neuralrohr vom umliegenden Ektoderm. Entlang der dorso-ventralen Achse kann das Neuralrohr mithilfe anatomischer Merkmale gegliedert werden: Die ventrale Hälfte der Seitenwand wird als Bodenplatte, die dorsale Hälfte als Flügelplatte und der sie trennende Einschnitt als Sulcus limitans bezeichnet (Ju *et al.*, 2004). Bei Säugern beginnt die Neurulation nahe dem anterioren Ende des Embryos im Bereich des Mittelhirns und schreitet dann in anteriore und posteriore Richtung voran (Wolpert, Entwicklungsbiologie, 1999). Werden Neuralplattenzellen durch die Injektion von fluoreszierenden Farbstoffen markiert, kann ihr weiteres Zellschicksal verfolgt werden. Solche Experimente zeigten, dass der am weitesten anterior gelegene Teil der Neuralplatte das Vorderhirn bildet, während weiter posterior gelegene Abschnitte sich zum Mittelhirn, Stammhirn und Rückenmark entwickeln (Eagleson und Harris, 1990; Schoenwolf und Sheard, 1990). Die Neurulation wird durch Signale aus dem Mesoderm induziert. Induktion bezeichnet den Prozess, bei dem das Signal einer Zellgruppe die Entwicklung einer benachbarten Zellgruppe beeinflusst (Wolpert: Entwicklungsbiologie, 1999). An der Induktion des Neuralrohrs sind verschiedene Signalkaskaden beteiligt (Übersichtsartikel Wilson und Edlund, 2001). Studien in *Xenopus* zeigten, dass die

Repression des sezernierten Wachstumsfaktors BMP („bone morphogenic factor“) für die neurale Induktion entscheidend ist (Hemmati-Brivanlou und Melton, 1997). Der Wachstumsfaktor FGF („fibroblast growth factor“) gehört zu den Molekülen, die BMP hemmen und so die Bildung von Nervengewebe induzieren. Weitere induktive Funktionen übernehmen die Proteine noggin, chordin und der Wnt-Signalweg (Wolpert, Entwicklungsbiologie, 1999; Wilson *et al.*, 2001). Während der neuralen Induktion entstehen aus ektodermalen Zellen neurale Stamm- oder Vorläuferzellen. Die neuronalen Vorläuferzellen differenzieren im weiteren Verlauf der Entwicklung in verschiedene neurale Zellpopulationen: Es entstehen Nerven- und Gliazellen.

1.2 Das Rhombencephalon

Die frühe Hirnanlage wird in drei Abschnitte, so genannte Hirnbläschen, gegliedert: Das Prosencephalon (Vorderhirnbläschen), das Mesencephalon (Mittelhirnbläschen) und das Rhombencephalon (Rautenhirnbläschen) (Wolpert, Entwicklungsbiologie, 1999; Wilson *et al.*, 2001). Aus dem Rautenhirnbläschen gehen das Kleinhirn (Cerebellum), die Brücke (Pons) und das verlängerte Mark (Medulla oblongata) hervor. Durch das Abknicken des Neuralrohrs in der Brückenbeuge liegen die oberen und unteren Schenkel der Raute aufeinander und bilden eine Struktur, die an einen Mund erinnert. Daher wird der verdickte und „umgekreimte“ Rand dieser Struktur als „Rautenlippe“ bezeichnet (His, 1891).



1.1.1. Schematischer Überblick über das Mesencephalon und das Rhombencephalon während der Embryogenese (modifiziert nach Wingate, 2001). Die Rautenlippe entsteht an der Grenze zur Deckenplatte und erstreckt vom ersten Rhombomer (r1, grün) längs des Rhombencephalons (blau). Das erste Rhombomer grenzt rostral an das Mesencephalon (Mes).

Das Rhombencephalon unterteilt sich in sieben Rhombomere (van Baer, 1828; Vaage, 1969; Fraser *et al.*, 1990, Lumsden *et al.*, 1999). Diese Einschnürungen, die später wieder verloren gehen, stellen Barrieren dar. Nachdem die Einschnürungen sichtbar geworden sind, überschreiten Zellen die Grenzen eines Rhombomers im Allgemeinen nicht mehr (Fraser *et al.*, 1990; Marin und Puelles, 1995). Rhombomere sind paarweise organisiert: Rhombomere mit gerader Zahl ähneln sich in ihren molekularen und zellulären Eigenschaften. Dasselbe gilt für Rhombomere mit ungerader Zahl. Deutlich wird das am Beispiel der Expression des *Hox*-Gens *Krox-20*, das im dritten und fünften Rhombomer nachweisbar ist (Lumsden und Krumlauf, 1996). Die Expression von Rezeptor-Tyrosinkinasen und ihrer Liganden tritt ähnlich organisiert auf. So sind die Rezeptoren EphA4, EphB2 und EphB3 im dritten und fünften Rhombomer exprimiert, während die Liganden EphrinB1, EphrinB2 und EphrinB3 im zweiten, vierten und sechsten Rhombomer auftreten (Lumsden, 1999).

Das Rhombencephalon liegt zwischen Mesencephalon und Rückenmark und ist Teil des Hirnstamms (Peter Duus, Neurologisch-topische Diagnostik, 1990). Die Bestandteile und Funktionen des Hirnstammes können hier nicht vollständig dargestellt werden. Ich beschränke mich auf Aspekte, die zum Verständnis dieser Arbeit beitragen.

Es gehört zu den wesentlichen Aufgaben des Hirnstamms, Information aus dem Rückenmark über lange aufsteigende Nervenbahnen beispielsweise die sensiblen Hinterstrangbahnen aufzunehmen. Über Nervenzellverbände (Verschaltungskerne) wie den Nucleus cuneatus externus oder den Nucleus olivaris inferior gelangt die Information in Thalamus, Cerebellum oder andere Zentren des Gehirns. Im Hirnstamm wird sowohl motorische als auch sensorische Information verarbeitet und weitergeleitet. In der Flügelplatte terminieren zentrale Projektionen primärer sensorischer Nervenzellen, während motorische Nervenzellen vor allem in der angrenzenden Basalplatte lokalisiert sind.

Der Hirnstamm wichtige Funktionen bei der Erhaltung und Steuerung von lebensnotwendigen Prozessen wie der Atmung und des Herzkreislaufsystems (Übersichtsartikel Borday *et al.*, 2004). Dabei erhalten Nervenzellverbände im Hirnstamm über viszerale Afferenzen des Nervus vagus und Nervus glossopharyngeus viszerosensible Information aus den inneren Organen über Herzfrequenz, Blutdruck,

Sauerstoffgehalt des Blutes oder Atmung. Hierbei stellt der neuronale Zellverband des Nucleus tractus solitarii eine wichtige Schaltstelle dar.

1.3 Musterbildung: Die Entstehung der neuronalen Vielfalt

Die Vielzahl neuronaler Zelltypen wird von Vorläuferzellen in Keimzonen (Neuroepithelien, Vorläuferzellschichten) des Nervensystems gebildet. Das Besondere hierbei ist, dass die große Anzahl unterschiedlicher neuraler Zellen zu genau definierten Zeitpunkten und an begrenzten Orten im Nervensystem entsteht. Die Bildung von Nervenzellen, Neurogenese genannt, stellt sich daher als eine komplexe Abfolge von Entwicklungsschritten dar, die ausgehend von einer neuralen Vorläuferzelle zu einem reifen, funktionsfähigen und integrierten Neuron führt. In den vergangenen Jahren haben sich viele Arbeiten damit beschäftigt, unterschiedliche neuronale Zelltypen zu identifizieren, ihren entwicklungsbiologischen Ursprung genauer zu bestimmen und die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die zur Spezifizierung von Neuronen führen. Grundlegend für die Entstehung der Vielfalt ist der als Musterbildung bezeichnete Vorgang, bei dem Zellen im Embryo ihre Identität erhalten und der zu einer räumlich gegliederten Anordnung verschiedener Vorläuferzellen führt (Wolpert, Entwicklungsbiologie, 1999). Zukünftige Nervenzellen durchlaufen die letzte Zellteilung nahe dem Lumen des Neuralrohrs und wandern dann als postmitotische Zellen in andere Bereiche des Nervensystems. Zu diesem Zeitpunkt handelt es sich um unreife neuronale Zellen. Während der Migration vom Geburtstort in andere Bereiche des Nervensystems differenzieren sie und bilden am Zielort Axone und Dendriten aus. Die Zelldifferenzierung ist daher für die Entstehung von strukturell und funktionell verschiedenen Zelltypen entscheidend.

Das Entwicklungsschicksal einer Vorläuferzelle wird bereits in der Keimzone festgelegt und beschreibt, in welche Richtung sich eine Zelle im Normalfall differenziert. In der Keimzone besitzt jede Zelle einen so genannten Positionswert. Er ergibt sich aus der Position der Vorläuferzelle entlang der antero-posterioren und der dorso-ventralen Achsen und dem Zeitpunkt, zu dem sie sich zu differenzieren beginnt. Die Position einer Vorläuferzelle bestimmt dabei, welchen Signalen sie ausgesetzt ist und steuert daher ihr späteres Schicksal sowie die zu bildenden Verbindungen (Lumsden und Krumlauf, 1996; Tanabe und Jessell, 1996). Auf molekularer Ebene zeichnet sich die Position einer

Vorläuferzelle dadurch aus, dass sie eine charakteristische Kombination von Genen exprimiert (Musterbildungsgene).

In zahlreichen Arbeiten am Rückenmark wurde gezeigt, dass unter anderem die Zelltyp-spezifische Kombination von Transkriptionsfaktoren in Vorläuferzellen darüber entscheidet, welche Nervenzellen sie bilden. Der molekulare Transkriptionsfaktor-Code ist daher für die Identifizierung unterschiedlicher Vorläuferzellen und neuronaler Zellpopulationen hilfreich (Chen *et al.*, 2001; Moran-Rivard *et al.*, 2001; Novitch *et al.*, 2001; Vallstedt *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002, Takebayashi *et al.*, 2002a; Zhou und Anderson, 2002).

Besonders gut untersucht sind basische Helix-Schleife-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des Nervensystems (Massari und Murre, 2000). Sie können die Neurogenese sowohl aktivieren als auch reprimieren. In *Drosophila* gehören die proneuralen Gene *Achaete*, *Scute*, *Atonal* und „*Daughterless*“ zu den Aktivatoren, die das neurale Zellschicksal im Ektoderm determinieren. Im Gegensatz dazu reprimiert beispielsweise das Gen „*hairy and enhancer of split1*“ die Neurogenese (Jan und Jan, 1993). In Vertebraten wurden zu den *bHLH*-Genen in *Drosophila* homologe Gene charakterisiert, welche ebenfalls die neurale Entwicklung steuern. Zu ihnen zählen *Mash1*, *Ngn1*, *NeuroD* und *Hes1* (Johnson *et al.*, 1990; Guillemot *et al.*, 1993; Bartholomä und Nave, 1994; Sasai *et al.*, 1992) (siehe weiterer Text). Das Gleichgewicht zwischen den bHLH-Faktoren, die aktivieren oder reprimieren, ist für die Entwicklung des Nervensystems entscheidend.

Die Induktion von Transkriptionsfaktoren ist im Rückenmark intensiv untersucht worden. Im ventralen Rückenmark reguliert das Molekül Sonic hedgehog (Shh) verschiedene Transkriptionsfaktoren Zelltyp-spezifisch in Vorläuferzellen entlang der dorso-ventralen Achse. Zwei Klassen von Genen, die Transkriptionsfaktoren kodieren, werden unterschieden: Klasse I wird durch Shh reprimiert und Klasse II wird durch Shh aktiviert. Dabei wirkt Shh in Form eines Gradienten, dessen höchste Konzentration nah der Chorda dorsalis und der Bodenplatte entsteht und der sich mit zunehmender Entfernung von diesen Orten verringert (Ericson *et al.*, 1995a, 1995b; Roelink *et al.*, 1995; Ericson *et al.*, 1996). Shh stellt daher ein Morphogen dar, das durch seine Verteilung zu unterschiedlichen Schwellenwerten führt. Dadurch entstehen definierte Streifen von Vorläuferzellen, die durch die Expression von Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet sind. Da ein Muster von Transkriptionsfaktoren entsteht, werden die induzierten Gene als Musterbildungsgene bezeichnet. Einige Transkriptionsfaktoren in der Vorläuferdomäne

reprimieren sich zusätzlich gegenseitig, wodurch das definierte Streifenmuster stabilisiert wird (Muhr *et al.*, 2001). Der Shh-Gradient erzeugt im ventralen Rückenmark fünf Streifen unterschiedlicher Vorläuferzellen, die wiederum fünf verschiedene Typen von Nervenzellen bilden (Lee und Jessell, 1999; Briscoe und Ericson, 1999, 2001; Briscoe *et al.*, 1999; Jessell, 2000; Mizuguchi *et al.*, 2001; Novitch *et al.*, 2001).

Die Expression der Musterbildungsgene ist nur innerhalb eines begrenzten Zeitfensters und in der Regel ausschließlich in Vorläuferzellen beobachtbar. Die meisten der bekannten Musterbildungsgene sind Homeodomain Transkriptionsfaktoren (Briscoe *et al.*, 2000; Jessell, 2000; Briscoe und Ericson, 2001; Rowitch *et al.*, 2002). Auch wenn Musterbildungsgene meist nicht in postmitotischen Neuronen exprimiert werden, bestimmen sie deren weiteres Entwicklungsschicksal entscheidend, indem sie die Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren in den neuronalen Zellen steuern (Briscoe und Ericson, 1999; Pierani *et al.*, 1999; Sander *et al.*, 2000; Vallstedt *et al.*, 2001). Ein gut untersuchtes Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor *Dbx1*, der in neuronalen Vorläuferzellen der Basalplatte im ventralen Rückenmark exprimiert wird und an der Bildung von Interneuronen des Typs V0 beteiligt ist (Pierani *et al.*, 2001). In Mäusen, die eine homozygote Mutation im *Dbx1*-Gen tragen, entstehen keine V0-Nervenzellen, sondern stattdessen V1-Zellen, die normalerweise aus einer angrenzenden Vorläuferpopulation generiert werden. Die Arbeiten am Rückenmark haben zum besseren Verständnis von Mechanismen beigetragen, die der Entstehung der neuronalen Vielfalt zu Grunde liegen (Tanabe und Jessell, 1996; Ericson, 2001; Helm und Johnson, 2003). Im Gegensatz dazu ist der entwicklungsbiologische Ursprung von neuronalen Zellen im dorsalen Rhombencephalon noch wenig untersucht und die molekularen Mechanismen, die neuronale Zellen in der Flügelplatte unterschiedlicher Rhombomere spezifizieren, werden nur unzureichend verstanden (Dauger *et al.*, 2003; Pattyn *et al.*, 2006; Sieber *et al.*, Manuskript eingereicht).

1.4 *Homöobox*-Gene

Die Gliederung des embryonalen Rhombencephalons in Segmente ist zusätzlich zu morphologischen durch molekulare und zelluläre Charakteristika gekennzeichnet. Dementsprechend unterliegt die Expression zahlreicher Gene im Rhombencephalon einem segmentalen Muster (Lumsden und Krumlauf, 1996). Dabei nehmen die *Hox*-Gene

eine besondere Rolle ein. Sie steuern die Entwicklung der Rhombomere, wobei jedes Rhombomer durch die Expression von spezifischen *Hox*-Genen charakterisiert ist (Carpenter *et al.*, 1993; Barrow *et al.*, 2000).

Die *Homöobox*-Genfamilie kodiert eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, denen eine ähnliche DNA-bindende Domäne, die Homöodomäne, gemeinsam ist. Ursprünglich wurde die Homöobox in Genen entdeckt, welche die Musterbildung bei der Tauflye *Drosophila* steuern und die Segmentidentität festlegen. Während bei *Drosophila* nur ein einziger Komplex von *Hox*-Genen bekannt ist, besitzen Wirbeltiere vier ähnliche Komplexe auf vier Chromosomen: *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* und *Hoxd* (McGinnis und Krumlauf, 1992).

Werden Rhombomere innerhalb des Rhombencephalons transplantiert, so nimmt das Transplantat das *Hox*-Expressionsmuster an, das typisch für Zellen der neuen Position ist - es findet ein Identitätswechsel statt. Dass *Hox*-Gene die Identität bestimmen, wurde zum Beispiel durch Experimente gezeigt, in denen *Hoxb1* im zweiten Rhombomer ektopisch exprimiert wurde. Dadurch kommt es zu einem Identitätswechsel: Das zweite Rhombomer nimmt die molekulare Identität von Rhombomer vier an und bildet Neurone, die typisch für das vierte statt das zweite Rhombomer sind (Bell *et al.*, 1999). „Knock-out“-Experimente in Mäusen belegen, dass die Expression der *Homöobox*-Gene sowohl durch lösliche Signale (FGF8, Wnt und Retinsäure) als auch durch Transkriptionsfaktoren (*Krox-20*, *Gbx2* und *MafB*) reguliert wird. *Krox-20* und *MafB* regulieren beispielsweise im fünften Rhombomer die Expression des *Hoxb3*-Gens und tragen so zur Spezifizierung der antero-posterioren Achse bei (Frohman *et al.*, 1993; Schneider-Maunoury *et al.*, 1993; McKay *et al.*, 1994; Wasserman *et al.*, 1997; Manzanares *et al.*, 1999, 2001).

1.5 Musterbildung im Rhombencephalon entlang der dorso-ventralen Achse

Nur wenige Moleküle sind bisher bekannt, welche die Identität von Vorläuferzellen entlang der dorso-ventralen Achse im embryonalen Rhombencephalon bestimmen. Die Etablierung der Positionsinformation entlang dieser Achse ist daher nur wenig verstanden. Die Rautenlippe wurde in diesem Kontext bereits im Rhombencephalon untersucht (siehe weiterer Text). Seit die Struktur der Rautenlippe 1891 anhand morphologischer Kriterien beschrieben worden ist (His, 1891), beschäftigten sich zahlreiche Arbeiten damit, die aus ihr hervorgehenden neuronalen Populationen und deren Entwicklungsschicksal genauer

zu analysieren (Übersichtsartikel Bloch-Gallego *et al.*, 2005; Wingate, 2001, 2005). Dazu wurden verschiedene experimentelle Herangehensweisen genutzt. Von histologischen Untersuchungen (Essick, 1912) und experimentellen Manipulationen (Harkmark, 1954; Tan und LeDouarin, 1991) über Autoradiografie (Miale und Sidman, 1961; Pierce, 1966, 1967; Altman und Bayer, 1987a-d) bis zu Abstammungsanalysen mit Farbstoffen oder Viren (Wingate und Hatten, 1999) und konditionaler Mutagenese (Rodriguez und Dymecki, 2000; Fünfschilling und Reichardt, 2002).

Man unterscheidet die obere Rautenlippe im ersten Rhombomer von der unteren Rautenlippe im zweiten bis siebten Rhombomer (Übersichtsartikel Wingate, 2001, 2005). Zellen aus der oberen Rautenlippe im ersten Rhombomer sind an der Entwicklung des Cerebellums beteiligt, während Zellen aus der unteren Rautenlippe Kerne in der Pons und der Medulla oblongata generieren (Schaper, 1897; Essick, 1912; Harkmark, 1954; Miale und Sidman, 1961; Ellenberger, 1969; Altman und Bayer, 1980, 1987; Tan und LeDouarin, 1991; Gao und Hatten, 1994; Marin und Puelles, 1995; Ambrosiani *et al.*, 1996; Kawauchi *et al.*, 2006). Zahlreiche Kerngebiete, die aus der unteren Rautenlippe hervorgehen, sind im adulten Tier vor allem durch die afferenten Verbindungen zum Cerebellum gekennzeichnet und werden daher als präcerebellare Kerne zusammengefasst (Harkmark, 1954).

Wegen der ausgedehnten Zellmigrationen und der komplexen Morphogenese (Altman und Bayer, 1987) sowie der wenigen bekannten zellulären Marker ist die Analyse von Zellschicksalen im Rhombencephalon kompliziert (Qian *et al.*, 2001). Mithilfe neuer molekularer Techniken, insbesondere durch die Verwendung der Rekombinasen Cre oder Flp des Cre/ oder Flp/loxP-System, wurde das Verständnis des Zellschicksals erheblich verbessert (Gu *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 1995). In dieser Promotion wurde das Cre/loxP-System verwendet. Das *Cre*-Gen stammt aus dem Phagen P1 und kodiert für eine Rekombinase. In den verwendeten transgenen Mäusen steht das *Cre*-Gen unter der Kontrolle eines spezifischen Promoters. Kreuzt man diese Tiere mit Mäusen, in denen ein Reportergen mit *loxP*-Sequenzen flankiert ist, kommt es zur Eliminierung des durch die *loxP*-Sequenzen flankierten Genabschnitts. Ich nutzte die Cre-Rekombinase dazu, DNA-Kassetten zu eliminieren, welche die Translation eines transgenen *LacZ*-Reportergens verhinderte. Nach der Rekombination wird das Genprodukt von *LacZ*, das Enzym β -Galaktosidase, translatiert. Vorteilhaft ist, dass die Veränderung in der Struktur des Reportergens an die Tochterzellen vererbt wird. Dadurch ist die Translation von β -

Galaktosidase nicht nur in Zellen nachweisbar, die Cre exprimieren, sondern zusätzlich in den Tochterzellen. So lässt sich das Schicksal von Zellen über größere Zeiträume verfolgen (Fünfschilling und Reichardt, 2002) (Abb. 1.4.).

In Untersuchungen wurden bereits folgende Transgene verwendet, um die Derivate der Rautenlippe und der Keimzone in der Flügelplatte zu identifizieren: *Wnt1^{Cre}*, *Math1^{Cre}* und *Ptf1a^{Cre}* (Rodriguez und Dymecki, 2000; Machold und Fishell, 2005; Wang *et al.*, 2005; Landsberg *et al.*, 2005; Hoshino *et al.*, 2005; Nichols und Bruce, 2006). *Wnt1*, *Math1* und *Ptf1a* werden in der Embryogenese unter anderem in Vorläuferzellen der Flügelplatte im siebten Rhombomer exprimiert. *Math1⁺* und *Wnt1⁺* Vorläuferzellen generieren überlappende, jedoch nicht identische neuronale Populationen im Rhombencephalon. Die *Wnt1*-Vorläuferdomäne ist breit und umfasst unterschiedliche Vorläuferzellen, die *Gdf7*, *Math1* und *Ngn1* exprimieren. Die am weitesten dorsal gelegenen Vorläuferzellen, die unter anderem durch die Expression von *Gdf7* charakterisiert sind, bilden den Plexus choroideus (Millonig *et al.*, 2000; Millen *et al.*, 2004; Currie *et al.*, 2005). Daran grenzen *Math1⁺* Vorläuferzellen an. Im ersten Rhombomer gehen aus der *Math1⁺* Vorläuferdomäne Zellen hervor, die an der Bildung der äußeren Körnerzellschicht im Cerebellum und der tiefen cerebellaren Kerne beteiligt sind. In den Rhombomeren zwei bis sieben produziert die *Math1⁺* Domäne Zellen, die präcerebellare Kerne in der Pons und der Medulla oblongata bilden (Altman und Bayer, 1985, 1987c, 1987d; Rodriguez und Dymecki, 2000, Machold und Fishell, 2005; Wang *et al.*, 2005; Landsberg *et al.*, 2005; Nichols und Bruce, 2006). An die *Math1⁺* Domäne grenzen *Ngn1⁺* Vorläuferzellen an, die zur Entwicklung des Nucleus olivaris inferior beitragen (Landsberg *et al.*, 2005). Für die Bildung des Nucleus olivaris inferior sind außerdem weiter ventral gelegene Vorläuferzellen wichtig, die *Ptf1a* exprimieren (Hoshino *et al.*, 2005). Überdies wird *Mash1* in der dorsalen Keimzone des Rhombencephalons exprimiert. *Mash1⁺* Vorläuferzellen bilden den Nucleus tractus solitarii (Pattyn *et al.*, 2006).

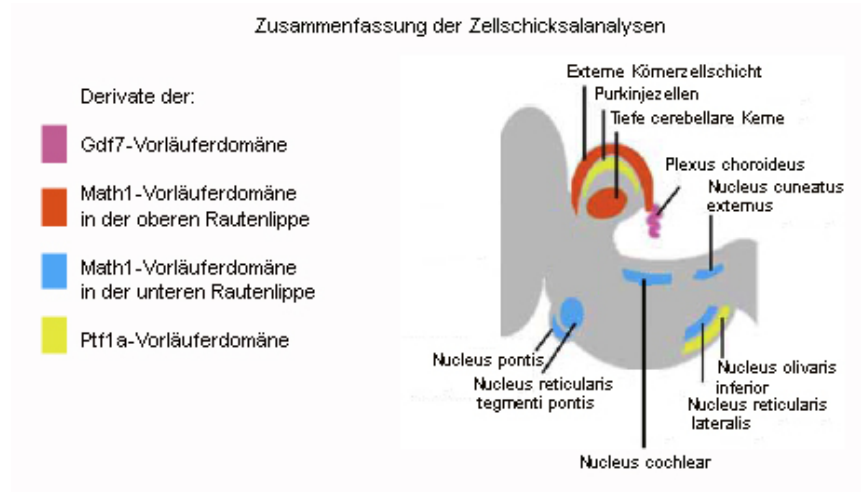


Abb. 1.4. Zellschicksalanalysen im Rhombencephalon (modifiziert nach Wingate, 2005). Die Keimzone des Rhombencephalons lässt sich mithilfe molekularer Marker in unterschiedliche Bereiche gliedern, aus denen räumlich und zeitlich koordiniert Nervenzellen entstehen. Sie bilden Nervenzellverbände, so genannte Kerne.

1.6 Zellwanderungen und die finale Position von Nervenzellen im Rhombencephalon

Wie bereits angesprochen, müssen Nervenzellen zwischen dem Ort ihrer Entstehung und ihrer endgültigen Position oft weite Strecken zurücklegen. Neuronale Zellwanderung wird als Verschiebung des neuronalen Zellkörpers von seiner Ausgangsposition in eine Endposition definiert (Rakic, 1990). Am Ende der Wanderung bilden die Nervenzellen definierte Verbände, die Kerne (Übersichtsartikel Wingate 2001, 2005). Die verschiedenen neuronalen Populationen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Keimzone geboren (Pierce, 1973). In diesem Zusammenhang existieren verschiedene Migrationswege im Rhombencephalon (Alcantara *et al.*, 2000). Hier wird die Zellwanderung im Kontext der Entstehung von sechs Strukturen des Hirnstamms dargestellt, die für diese Arbeit relevant sind.

Die Neurone des Nucleus reticularis lateralis und des Nucleus cuneatus externus entstehen aus Math1-Vorläuferzellen im siebten Rhombomer. Zwischen dem 10. und 12. Tag der Embryonalentwicklung werden sie geboren und können E13 als ein massiver Zellstrom beobachtet werden. Dieser Strom bewegt sich aus der Rautenlippe in ventraler Richtung fort. Die Neurone migrieren zwischen der weißen Substanz und der Pia mater zur ventralen Bodenplatte, überqueren die Mittellinie und siedeln sich contralateral an. Die

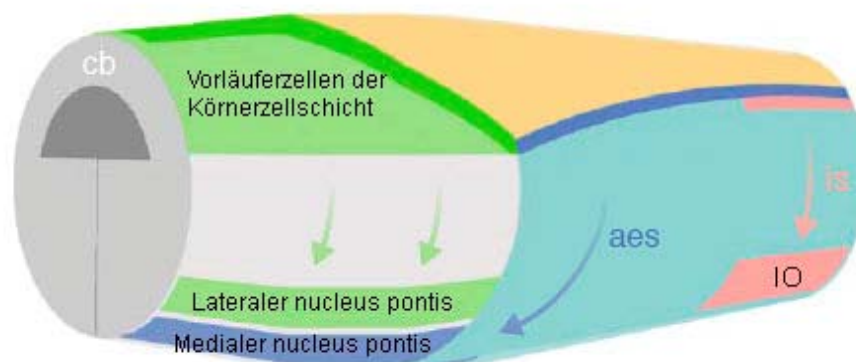
Mittellinie erreichen die Nervenzellen innerhalb eines Tages und zum Zeitpunkt E17 sind keine wandernden Neurone mehr subpial nachweisbar (Ono und Kawamura, 1989). Diese Form der Migration wird als „marginaler Migrationsstrom“ (Ellenberger, 1969) oder als „superfizielle Migration“ (Harkmark, 1954) bezeichnet. Der marginale Migrationsstrom bildet zwei Kerne, den Nucleus reticularis lateralis und den Nucleus cuneatus externus, die wichtige Verschaltungszentren zwischen dem Rückenmark und dem Cerebellum darstellen. Der Nucleus reticularis lateralis erhält afferente Nervenverbindungen vor allem aus dem Rückenmark. Seine efferenten Nervenfasern, die Moosfasern, terminieren im Cerebellum, wo sie unter anderem mit Golgi- und Körnerzellen synaptische Kontakte bilden (Altman und Bayer, 1987c; Trepel, 1999). Der Nucleus cuneatus externus steht über afferente Nervenverbindungen mit dem Rückenmark in Kontakt. Die vom Nucleus cuneatus externus ausgehenden efferenten Fasern enden ebenfalls im Cerebellum (Altman und Bayer, 1987c; Trepel, 1999).

Derivate der Math1-Vorläuferzellen im zweiten bzw. dritten Rhombomer sind die Brückenkerne (Nucleus pontis im Brückenfuß und Nucleus reticularis tegmenti pontis in der Brückenhaube). Zwischen E12,5 und E15,5 wandern sie entlang des anterioren extramuralen Migrationsstroms (aes, Brückenstrom) zwischen der weißen Substanz und der Pia mater zur ventralen Bodenplatte und terminieren ipsilateral, d.h. sie überqueren die Mittellinie nicht (Altman und Bayer, 1980). Der Strom bildet zwei Kerne, den Nucleus pontis und den Nucleus reticularis tegmenti pontis. Afferente Verbindungen aus dem Kortex innervieren den Nucleus pontis, dessen efferente Nervenfasern wiederum ins Cerebellum projizieren. (Altman und Bayer, 1987). Der Nucleus reticularis tegmenti pontis ist vom Nucleus pontis durch die Pyramidenfasern getrennt. Afferente Nervenverbindungen erhält der Kern aus dem Kortex, aus den tiefen cerebellaren Kernen und dem Nucleus vestibularis. Auch der Nucleus reticularis tegmenti pontis projiziert vor allem ins Cerebellum. Damit stellen die Brückenkerne wichtige Verschaltungszentren zwischen dem cerebralen Kortex und dem Cerebellum dar.

Die äußere Körnerzellschicht des Cerebellums wird von Math1⁺ Vorläuferzellen gebildet, die zwischen E13 bis E14 in der Rautenlippe im ersten Rhombomer geboren werden (Altman und Bayer, 1985; Wingate und Hatten, 1999). Das Cerebellum ist an der Koordination von Bewegungen, der Steuerung der Halte- und Stützmotorik, der Feinabstimmung von Augenbewegungen und am Lernen beteiligt.

Neurone des Nucleus olivaris inferior stammen nicht aus der Math1⁺ Vorläuferdomäne, sondern aus weiter ventral gelegenen Vorläuferzellen. Die Neurone des Nucleus olivaris

inferior beginnen ab dem neunten embryonalen Tag (E9) die Wanderung aus der unteren Rautenlippe der dorsalen Flügelplatte in der caudalen Medulla oblongata. Sie wandern zur ipsilateralen Zielregion nah der ventralen Bodenplatte. Dieser Migrationsstrom wurde mehrfach in der Literatur beschrieben und als Olivenstreifen (His, 1891), „tiefe Migration“ (Essick, 1912; Harkmark, 1954), „submarginale Migration“ (Ellenberger, 1969), „innere hintere präcerebellare Wanderung“ (Altman und Bayer, 1987a) und „parenchymale Migration“ bezeichnet (Bourrat und Sotelo, 1990). Der Nucleus olivaris inferior wird durch Nervenfasern innerviert, die aus dem Rückenmark, dem cerebralen Kortex, dem Nucleus caudatus und den tiefen Kernen des Cerebellums stammen. Die efferenten Fasern des Nucleus olivaris inferior projizieren auf die Purkinjezellen im Cerebellum. Damit ist der Nucleus olivaris inferior in das Steuerungssystem zur Planung von Bewegungen eingebunden (Harkmark, 1954; Altman und Bayer, 1987b, Ellenberger, 1969; Bourrat und Sotelo, 1990, Trepel, 1999).



1.5. Schematische Darstellung einer Auswahl von Zellwanderungen und Derivaten der Rautenlippe im Rhombencephalon (modifiziert nach Wingate, 2001). Die Rautenlippe entsteht an der Grenze zur Deckenplatte und erstreckt sich vom ersten Rhombomer (r1, grün) längs des Rhombencephalons (blau). Nachdem sich die segmentale Struktur des Hirnstamms zurückgebildet hat, treten spezifische Derivate der Rautenlippe längs der unterschiedlichen axialen Bereiche auf. Die Rautenlippe im ersten Rhombomer (grün) trägt zur Bildung der Körnerzellschicht im Cerebellum (cb) und des lateralen Nucleus pontis (grüne Pfeile) bei. Von der Rautenlippe im zweiten und dritten Rhombomer migrieren neuronale Zellen entlang des anterioren extramuralen Stroms (aes, blauer Pfeil), der den medialen Teil des Nucleus pontis erzeugt. Von der Rautenlippe im siebten Rhombomer migrieren Neurone entlang des intramuralen Stroms (roter Pfeil) und bilden den Nucleus olivaris inferior (IO).

1.7 Der Transkriptionsfaktor Olig3 wird in Vorläuferzellen exprimiert

Um die molekularen Mechanismen, die der Zelltyp-spezifischen Differenzierung zugrunde liegen, besser zu verstehen, wurden eine Reihe neuer *bHLH*-Gene gesucht (Takebayashi *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001, 2002). Das *Olig3*-Gen wurde als drittes Mitglied der Olig-Familie aufgrund seiner signifikanten Homologie im Bereich der bHLH-Domäne entdeckt (Takebayashi *et al.*, 2000). *Olig*-Gene sind in Vertebraten beispielsweise im Menschen, in Kaninchen, Hühnern oder *Zebrafischen*, jedoch nicht in *Drosophila* oder *Nematoden* konserviert (Takebayashi *et al.*, 2000).

Die Transkriptionsfaktoren Olig1 und Olig2 wurden bereits im Rückenmark untersucht. *Olig1*-„Knock-out“-Mäuse zeigen eine verspätete Entwicklung von Oligodendrozyten und eine verringerte Myelinisierung (Lu *et al.*, 2002). Olig2 wird von Vorläuferzellen im ventralen Rückenmark exprimiert, die erst Motorneurone und später in der Entwicklung Oligodendrozyten bilden. Olig2 ist demnach für die Spezifizierung beider Zelltypen notwendig (Novitsch *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002; Takebayashi *et al.*, 2002a; Zhou und Anderson, 2002; Mizuguchi *et al.*, 2001).

Der Transkriptionsfaktor Olig3 wird im Rückenmark und Rhombencephalon ab Tag 9,25 der Embryonalentwicklung (E9,25) exprimiert (Takebayashi *et al.*, 2002; Filippi *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2005). Im dorsalen Rückenmark ist die Expression von Olig3 auf Vorläuferzellen beschränkt. Hingegen ist Olig3 im ventralen Rückenmark zusätzlich in einer kleinen Population von postmitotischen Zellen nachweisbar. Das Expressionsprofil von Olig3 unterstützt die Hypothese, dass die Funktion von *Olig3* im Vergleich zu Olig1 oder Olig2 verschieden ist.

Im dorsalen Rückenmark entstehen sechs unterschiedliche neuronale Subpopulationen dI1-6. Sie werden mithilfe molekularer Marker unterschieden und zusätzlich in zwei größere Gruppen unterteilt: DI1-3 werden als Klasse A-Neurone und dI4-6 als Klasse B-Neurone bezeichnet (Gross *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002, 2005). Vorläufer der Klasse A-Neurone exprimieren Olig3, während Vorläufer der Klasse B-Neurone Olig3 nicht exprimieren.

Das *Olig3*-Gen wurde in ES-Zellen der Maus mutiert, indem kodierende Sequenzen des *Olig3*-Gens durch *EGFP*- („enhanced green fluorescent protein“) und *LacZ*-Reportergene ersetzt wurden (Müller *et al.*, 2005). Die Analyse von Mäusen, die eine homozygote Mutation des *Olig3*-Gens tragen, zeigte, dass Olig3 für die Spezifizierung der Klasse A-

Neurone im dorsalen Rückenmark wichtig ist. In den mutierten Tieren wird eine verringerte Anzahl von dI1-Neuronen gebildet, während dI2- und dI3-Neurone überhaupt nicht spezifiziert werden (Müller *et al.*, 2005). Experimente, in denen Olig3, im Rückenmark von Hühnerembryonen ektopisch exprimiert wurde, demonstrierten überdies, dass Olig3 die Bildung von Klasse B-Neuronen unterdrückt. Es wird postuliert, dass Olig3 für die Spezifizierung von Klasse A-Neuronen notwendig ist und mit anderen Faktoren kooperiert, um die Entstehung der einzelnen Subpopulationen zu gewährleisten. In dieser Arbeit verwendete ich diesen Mausstamm (*Olig3^{GFP}*-Mäuse), um die *in vivo*-Funktion von Olig3 in der Entwicklung des Rhombencephalons zu untersuchen. Meine Ergebnisse zeigen, dass Olig3 im embryonalen Rhombencephalon wichtige Funktionen in der Spezifizierung von Nervenzellen übernimmt.

1.8 Der Transkriptionsfaktor c-Maf wird in postmitotischen Neuronen exprimiert

Das virale Onkogen v-Maf („avian musculoaponeurotic fibrosarcoma“) und seine verwandten Proteine, die als Maf-Familie bezeichnet werden, gehören zu Transkriptionsfaktoren, die eine stark konservierte basische Leuzin-Sequenz (bZIP, „basic-leucine-zipper“) besitzen (Nishizawa *et al.*, 1989). *C-Maf* gehört zu den großen Maf-Proteinen, die im Vergleich zu den kleinen Maf-Proteinen eine N-terminale Transaktivierungsdomäne enthalten (Kataoka *et al.*, 1993, 1995; Fujiwara *et al.*, 1993). Große Maf-Proteine bilden sowohl Homo- als auch Heterodimere mit anderen Molekülen der bZip-Familie (Kerppola *et al.*, 1994). In Form eines Dimers können Maf-Proteine die Maf-Erkennungssequenz (MARE) binden (Matsushima-Hibiya *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 1994). In entwicklungsbiologischen Prozessen scheint c-Maf verschiedene Funktionen zu erfüllen, da es in unterschiedlichen Zellen exprimiert wird. Unter anderem tritt c-Maf in Zellen der Linse, des Immunsystems, in Chondrozyten und im Nervensystem auf. Bei der Bildung der Linse ist c-Maf für die Induktion von Crystallin-Genen wichtig (Kim *et al.*, 1999; Kawachi *et al.*, 1999; Ring *et al.*, 2000). Im Immunsystem reguliert c-Maf unter anderem die Expression von Interleukin-Genen und ist an der Differenzierung von T-Lymphozyten beteiligt (Ho *et al.*, 1996, 1998; Cao *et al.*, 2005). Überdies ist c-Maf für die Differenzierung von Knorpelzellen notwendig (Omoteyama *et al.*, 2005).

Expressionsanalysen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Carmen Birchmeier haben gezeigt, dass c-Maf in postmitotischen Zellen im dorsalen Rückenmark und im Rhombencephalon vorkommt. Diese Ergebnisse wurden kürzlich mithilfe der Affimetrix-Microarray-Methode bestätigt und zeigten, dass c-Maf neben zahlreichen anderen Genen im dorsalen Rückenmark exprimiert wird (Li *et al.*, 2006). Um in der Zukunft die *in vivo*-Funktion von c-Maf in der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks und des Rhombencephalons genauer zu untersuchen, habe ich zwei Mauslinien etabliert. Zum einen wurde die kodierende Sequenz des *c-Maf*-Gens durch das *LacZ*-Reporter gen ersetzt. Da Mäuse, welche die Mutation des *c-Maf*-Gens homozygot tragen, kurz nach der Geburt sterben (Kim *et al.*, 1999; Ring *et al.*, 2000), habe ich zum anderen eine zweite Mauslinie etabliert, in der das *c-Maf*-Gen mittels Cre/loxP-System (siehe oben) latent (konditionales Allel) mutiert ist. Mithilfe des konditionalen Allels lässt sich c-Maf im Zielgewebe ausschalten, ohne dass die Funktion von c-Maf in anderen Geweben beeinträchtigt wird. Damit kann die Funktion von c-Maf auch zu späteren Zeitpunkten während der Entwicklung untersucht werden. Die Analyse des Phänotyps dieser Tiere war jedoch nicht Gegenstand dieser Promotion.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Neurogenese, speziell die Spezifizierung von Neuronen, im embryonalen Rhombencephalon und Rückenmark der Maus.

Das *Olig3*-Gen kodiert für einen basischen Helix-Schleife-Helix Transkriptionsfaktor in Vorläuferzellen. Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Rolle von *Olig3* in der Entwicklung des Rhombencephalons zu untersuchen und damit die Entwicklung von Neuronen im Rhombencephalon besser zu verstehen. Dazu wurde das Expressionsmuster von *Olig3* im Rhombencephalon zu entscheidenden embryonalen Zeitpunkten untersucht. Weiterhin wurden Mäuse verwendet, in denen eine essentielle Domäne des *Olig3*-Gens durch ein *EGFP-LacZ*-Reporter gen ersetzt worden ist. Die Analyse von Mäusen, die diese Mutation homozygot tragen, zeigte wichtige Funktionen des *Olig3*-Gens in der Embryogenese des Rhombencephalons, speziell bei der Spezifizierung von neuronalen Subpopulationen. Die Tiere wiesen morphologische Fehlbildungen im Rhombencephalon

auf und starben nach der Geburt. Eine Anzahl von Kernen im Rhombencephalon wurde in verringerter Größe oder gar nicht ausgebildet.

Zusätzlich wurden zwei Mausstämme etabliert, in denen das *c-Maf*-Gen mutiert worden ist. Da *c-Maf* in postmitotischen Zellen des dorsalen Rückenmarks und des Rhombencephalons exprimiert wird, sollen die beiden Mauslinien in der Zukunft zur Analyse der *in vivo*-Funktion von *c-Maf*, speziell der Differenzierung von Neuronen, verwendet werden. Die Analyse dieser Mäuse wurde im Rahmen dieser Promotion nicht durchgeführt.