

**Ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren kontrolliert die  
Expression von Neuropeptiden im dorsalen Rückenmark**

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

**Dominique Bröhl**

aus Bonn

April, 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier

2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am 08.09.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1-16</b>
<b>1.1 Verarbeitung von sensorischen Reizen durch das dorsale Rückenmark</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Modulation von sensorischen Reizen durch Neuropeptide</b>	<b>3</b>
1.2.1 Biogenese und Regulation von Neuropeptiden	3
1.2.2 Funktion und Expression von Neuropeptiden	6
<b>1.3 Differenzierung von Nervenzellen im Rückenmark</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Musterbildung und Determinierung der neuronalen Identität</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Spezifizierung von dorsalen Rückenmarksneuronen</b>	<b>10</b>
1.5.1 Früh geborene dorsale Interneurone	11
1.5.2 Spät geborene dorsale Interneurone	13
<b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17-37</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>17</b>
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	17
2.1.2 Bakterienstämme	17
2.1.3 Vektoren	17
2.1.4 Antikörper	17
2.1.5 Mausstämme und transgene Mauslinien	18
2.1.6 Nährmedien	19
<b>2.2 Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren und Ribonukleinsäuren	20
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	20
2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien	20
2.2.1.3 Isolierung von total RNA aus embryonalem Gewebe	20
2.2.2 Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren, Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter Bakterien	21
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.2.4 RT-PCR	27
2.2.5 Quantitative RT-PCR	27
2.2.6 Sequenzierung	28
2.2.7 <i>In vitro</i> -Transkription	28
2.2.8 Histologische Methoden	29
2.2.8.1 Herstellung von Gefrierschnitten	29
2.2.8.2 Herstellung von Vibratomschnitten	29
2.2.8.3 Immunhistologie auf Gefrierschnitten	30
2.2.8.4 Detektion von Zellproliferation	30
2.2.9 <i>In situ</i> -Hybridisierung	31
2.2.9.1 <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefrierschnitten	31
2.2.9.2 Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	32
2.2.9.3 Präparation von Embryo-Pulver	33
2.2.10 Microarray-Expressionsanalyse	34
2.2.10.1 RNA-Isolierung und -Aufreinigung	34
2.2.10.2 cDNA-Synthese	34
2.2.10.3 <i>In vitro</i> -Transkription und Biotin-Markierung von cRNA	35

2.2.10.4	Microarray-Hybridisierung	36
2.2.11	Datenanalyse	36
2.2.11.1	Dokumentation histologischer Daten	36
2.2.11.2	Expressionsanalyse	36
<b>3 ERGEBNISSE</b>		<b>38-68</b>
<b>3.1</b>	<b>Expression von <i>Gsx1/2</i> im embryonalen Rückenmark der Maus</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Verlust von dILB-Interneuronen in <i>Gsx1/2</i>-doppelt mutanten Embryonen</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Genomweite Genexpressionsanalyse des dorsalen Rückenmarks von <i>Gsx1/2</i>-doppelt mutanten Embryonen</b>	<b>43</b>
3.3.1	Differenzielle Expression von Neuropeptiden im dorsalen Rückenmark	45
3.3.1.1	Identifizierung dILA-spezifisch exprimierter Kategorie A-Neuropeptide	45
3.3.1.2	Identifizierung dILB-spezifisch exprimierter Kategorie B-Neuropeptide	48
3.3.2	Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in dILA-Neuronen exprimiert werden	48
<b>3.4</b>	<b>Verifizierung der Expressionsdaten differenziell exprimierter Gene</b>	<b>50</b>
3.4.1	Verifizierung der Expression von Neuropeptid-Genen in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen	50
3.4.1.1	Verlust der Expression von Kategorie A-Neuropeptiden in <i>Ptfla</i> -mutanten Embryonen	50
3.4.1.2	Verlust der Expression von Kategorie B-Neuropeptiden in <i>Gsx1/2</i> -mutanten Embryonen	52
3.4.1.3	Immunhistologischer Nachweis der Expression von Kategorie A-Neuropeptiden in inhibitorischen dILA-Interneuronen	54
3.4.1.4	Die Expression von Kategorie A-Neuropeptiden im dorsalen Rückenmark beginnt zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung	56
3.4.2	Verifizierung der Expression der Transkriptionsfaktoren <i>Neurod1, 2 und 6</i> in inhibitorischen Neuronen	57
3.4.2.1	Expression von <i>Neurod1, 2 und 6</i> in der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks	57
3.4.2.2	Expression von <i>Neurod1, 2 und 6</i> in <i>Lhx1/5+</i> inhibitorischen Neuronen	59
<b>3.5</b>	<b>Kontrolle der Expression von Kategorie A-Neuropeptiden</b>	<b>60</b>
3.5.1	Gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren <i>Pax2, Lhx1, 5, Neurod1, 2 und 6</i>	61
3.5.2	<i>Pax2</i> kontrolliert die Migration dorsaler Interneurone des Rückenmarks	62
3.5.3	Differenzierung von Dynorphin+ und Galanin+ Neuronen	63
3.5.3.1	<i>Pax2</i> und <i>Neurod1/2/6</i> sind essenziell für die Expression von <i>Dynorphin</i> und <i>Galanin</i>	63
3.5.3.2	Redundante Funktion der <i>Neurod</i> -Faktoren	65
3.5.4	Differenzierung von Enkephalin+, NPY+ und Nociceptin+ Neuronen	67

---

<b>4 DISKUSSION</b>	<b>69-79</b>
4.1 <b>Veränderte Genexpression im dorsalen Rückenmark <i>Gsx1/2</i>-mutanter Embryonen</b>	<b>70</b>
4.2 <b>Spezifische Expression von Neuropeptiden in Subtypen von inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen</b>	<b>71</b>
4.3 <b>Die Expression von verschiedenen Neuropeptiden erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung</b>	<b>73</b>
4.4 <b>Zellautonome Regulation der Differenzierung</b>	<b>74</b>
4.5 <b>Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden</b>	<b>75</b>
4.6 <b>Ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren kontrolliert Neuropeptid-Expression und Differenzierung</b>	<b>76</b>
4.7 <b>Koordinierte Mechanismen kontrollieren Neurotransmitter-Spezifität und Neuropeptid-Expression</b>	<b>78</b>
4.8 <b><i>Pax2</i> und <i>Lhx1/5</i> beeinflussen die Migration von inhibitorischen Neuronen</b>	<b>79</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY</b>	<b>80-83</b>
<b>6 LITERATUR</b>	<b>84-94</b>
<b>ANHANG</b>	<b>95-96</b>
Danksagung	95
Erklärung	96

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bHLH	“basic Helix-Loop-Helix”
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-Uridin
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	embryonale Stamm (-zellen)
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
loxP	“Locus of Crossover in P1”
M	Molar
mA	Miliampere
MDC	Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Neo	Neomycin
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	“revolutions per minute”
RT	Raumtemperatur
SSC	“Standard Saline Citrate”
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	“Tris Buffered Saline”
TBST	TBS-Tween 20
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	“unit” (= Enzymeinheit)
V	Volt
W	Watt