

1 Einleitung

Das dorsale Rückenmark verarbeitet verschiedene Reize wie Schmerz, Temperatur oder mechanischen Druck, die von sensorischen Nervenzellen wahrgenommen werden. Außerdem verarbeitet das dorsale Rückenmark propriozeptive Informationen über die Position des Rumpfes und der Extremitäten und moduliert die aktive und unbewusste Steuerung der Muskeln (Gillespie und Walker, 2001; Julius und Basbaum, 2001). Das Rückenmark ist funktionell in verschiedene Bereiche unterteilt. Nervenzellen, die somatosensorische Informationen verarbeiten und zu höheren Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) weiterleiten, befinden sich in der dorsalen Hälfte des Rückenmarks, der so genannten Alarplatte. In der ventralen Hälfte des Rückenmarks, der Basalplatte, befinden sich dagegen Nervenzellen, welche die motorische Kontrolle der Muskulatur modulieren und ausführen (Jessell, 2000). Eine Voraussetzung für die korrekte Ausübung der vielfältigen Aufgaben des Rückenmarks ist die Spezifizierung einer Vielzahl von unterschiedlichen Neuronentypen während der Embryonalentwicklung. Die Position innerhalb des Nervensystems und der Zeitpunkt der Entstehung legen fest, welcher Neuronentyp entsteht, d.h. in verschiedenen Individuen einer Spezies wird am gleichen Ort im Nervensystem und im gleichen Stadium der Entwicklung immer der gleiche Neuronentyp gebildet. Im Rückenmark werden entlang der dorso-ventralen Achse viele verschiedene Nervenzellen gebildet, während entlang der rostro-kaudalen Achse weniger starke Varianz beobachtet wird. Die verschiedenen Neuronentypen wandern während der Differenzierung an bestimmte Positionen im Rückenmark, so dass das adulte Rückenmark aufgrund morphologisch und physiologisch unterschiedlicher Neuronen in zehn verschiedene Schichten unterteilt werden kann (Rexed et al., 1952; Brown und Fyffe, 1981).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich die Entwicklung des dorsalen Rückenmarks untersucht. Dabei konnte ich verschiedene Neuronentypen des dorsalen Rückenmarks anhand der Expression von Neuropeptiden unterscheiden, die ich inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen zuordnen konnte. Außerdem untersuchte ich die Funktion verschiedener Transkriptionsfaktoren in der Neuropeptid-Expression inhibitorischer Neurone.

1.1 Verarbeitung von sensorischen Reizen durch das dorsale Rückenmark

Die korrekte Spezifizierung und anschließende Reifung dorsaler Neurone und die Etablierung der verschiedenen Schichten des dorsalen Rückenmarks (Schicht I-V) ist wichtig für die Weiterleitung sensorischer Informationen. Sensorische Informationen werden von Neuronen des peripheren Nervensystems (PNS) aufgenommen. Die Zellkörper der sensorischen Neurone befinden sich in den dorsalen Wurzelganglien (*dorsal root ganglia*, DRG) und ihre Zellfortsätze projizieren sowohl ins Rückenmark als auch in die Körperperipherie (Hunt und Mantyh, 2001; Julius und Basbaum, 2001). Die primären afferenten Fasern wachsen ab Tag E12.5 in das Rückenmark ein, aber innervieren erst ab Tag E14.5 das dorsale Horn, nachdem sich bereits unterschiedliche Neuronenschichten im dorsalen Rückenmark gebildet haben (Mirnics et al., 1995; Ozaki und Snider, 1997). Verschiedene sensorische Neurone nehmen verschiedene sensorische Modalitäten wie Schmerz, Druck, Temperatur oder die Position der Muskulatur wahr, und projizieren in verschiedene Schichten des Rückenmarks (Caspary und Anderson, 2003). Sensorische Neurone, die mechanische Reize wahrnehmen, bilden Kontakte mit Neuronen in tieferen Schichten des dorsalen Horns aus (Schicht III, IV und V), propriozeptive Mechanorezeptoren projizieren dabei auch in den ventralen Bereich des Rückenmarks. Schmerz- und Temperaturreize werden dagegen in höhere Schichten des dorsalen Horns übertragen (Schicht I und II). Diese sensorischen Informationen werden im dorsalen Rückenmark integriert und moduliert, und von Projektionsneuronen des dorsalen Rückenmarks an höhere Zentren des ZNS wie den Thalamus und schließlich den cerebralen Cortex weitergeleitet (Peschanski et al. 1983; Dado et al., 1994; Katter et al., 1996).

Sensorische Neurone können durch anatomische und funktionelle Kriterien unterschieden werden. Mechanorezeptoren nehmen mechanische Reize wahr; ihre Projektionen sind sowohl stark myelinisierte A β -Fasern mit einem großen Durchmesser, als auch leicht myelinisierte A δ -Fasern mit einem mittleren Durchmesser. Zu den Mechanorezeptoren gehören auch die Propriozeptoren, welche die Stellung der Gelenke und Sehnen, und die Muskelspannung wahrnehmen. Die Projektionen der Propriozeptoren sind myelinisierte Ia- und II-Fasern, die einen großen Durchmesser aufweisen. Sensorische Neurone, die Schmerzreize wahrnehmen können, werden Nozizeptoren genannt, und werden durch Reize aktiviert, die Gewebe des Körpers

schädigen können. Nozizeptoren unterscheiden sich von anderen sensorischen Neuronen, da sie verschiedene Reize wie Temperatur, Druck und auch bestimmte Chemikalien wahrnehmen können; im Unterschied zu anderen sensorischen Neuronen liegt die Reizschwelle von Nozizeptoren aber wesentlich höher (Burgess und Perl, 1967). Projektionen von Nozizeptoren sind teilweise A δ -Fasern und vorwiegend unmyelinisierte C-Fasern mit einem kleinen Durchmesser (Snider und McMahon, 1998; Julius und Basbaum, 2001).

Die Verarbeitung von Schmerzreizen ist eine der wichtigsten Funktionen des dorsalen Rückenmarks und aufgrund der medizinischen Relevanz sehr gut untersucht. Mehrere Neuropeptide werden im dorsalen Rückenmark gebildet und modulieren Schmerzreize. Normale Schmerzreize werden als akuter Schmerz wahrgenommen, durch krankhafte Veränderungen kann es aber zu einer andauernden Überempfindlichkeit gegenüber Schmerzreizen kommen. Verletzungen und Entzündungsreaktionen in peripheren Geweben resultieren in Entzündungsschmerz, während die Schädigung von Nerven zu pathologischem Schmerz führt. Dies kann sich unter anderem in einer Überempfindlichkeit gegenüber normalerweise nicht schmerzhaften Reizen (Allodynie) oder durch eine erhöhte Reaktion auf schmerzhafte Reize (Hyperalgesie) bemerkbar machen (Walters et al., 1994; Woolf und Salter, 2000). Zwei verschiedene Mechanismen sind dafür verantwortlich: die zentrale und die periphere Sensibilisierung (Ji et al., 2003). Die periphere Sensibilisierung erhöht die Aktivierung von Rezeptormolekülen der sensorischen Neurone im peripheren Gewebe, während die zentrale Sensibilisierung die Weiterleitung der Schmerzreize an den Synapsen im dorsalen Rückenmark vereinfacht.

1.2 Modulation von sensorischen Reizen durch Neuropeptide

1.2.1 Biogenese und Regulation von Neuropeptiden

Die Informationsweiterleitung von einer Nervenzelle zur nächsten erfolgt mit Hilfe von Neurotransmittern. Neurotransmitter werden von präsynaptischen Neuronen gebildet, an den Axonenden in den synaptischen Spalt sezerniert und wirken depolarisierend oder hyperpolarisierend auf das Membranpotential der postsynaptischen Zelle. Als Neurotransmitter können verschiedene chemische Substanzen fungieren. Klassische

Neurotransmitter sind meist Moleküle mit einem geringen Molekulargewicht, zum Beispiel Aminosäuren und Aminosäurederivate oder biogene Monoamine, die vorwiegend an ionotrope Rezeptoren binden und somit direkt das Membranpotential der postsynaptischen Zelle beeinflussen. Zur Gruppe der Aminosäuren und Aminosäurederivate zählen die inhibitorischen Neurotransmitter Glycin und gamma-Aminobuttersäure (*gamma amino butyric acid*, GABA) und der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat. Zu den Monoaminen gehören unter anderem die bekannten Neurotransmitter Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin und Serotonin. Neben diesen klassischen Neurotransmittern werden auch Neuropeptide als Signalstoffe von Neuronen gebildet, die an metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden und somit einen eher indirekten Einfluss auf das Membranpotential der postsynaptischen Zelle ausüben.

Neuropeptide bestehen aus 3 bis 50 Aminosäuren und unterscheiden sich neben ihrem Molekulargewicht auch durch ihren Syntheseweg deutlich von klassischen Neurotransmittern. Klassische Neurotransmitter werden durch Enzyme in der Nähe der Synapsen synthetisiert, während Neuropeptide in einem komplexen Syntheseweg entstehen, der an den Ribosomen im Zellkörper der Neurone beginnt (siehe Abb. 1.1; Dockray, 1987; Hökfelt et al., 2000). Durch die Ribosomen wird ein inaktives Vorläuferpeptid (Präpropeptid) synthetisiert, das meist aus mehr als 90 Aminosäuren besteht. Dieses Vorläuferpeptid gelangt während der Synthese in das endoplasmatische Retikulum (ER) der Zelle, wo das Signalpeptid abgespalten wird und somit das ebenfalls noch inaktive Propeptid entsteht (Beinfeld, 2003). Das Vorläuferpeptid durchläuft anschließend das trans-Golgi-Netzwerk und wird zusammen mit Enzymen in Vesikel, so genannte *large dense-core* Vesikel (LDCV), verpackt (Fisher et al. 1988; Kelly, 1993; Loh et al., 2002). In diesen Vesikeln wird das Vorläuferpeptid zum Axonende transportiert. Im trans-Golgi-Netzwerk oder während des Transports in den *large dense-core* Vesikeln wird das aktive, kürzere Neuropeptid von spezifischen Peptidasen aus dem Vorläuferpeptid herausgeschnitten. Dabei entstehen aus einem Vorläuferpeptid meist mehrere, oft auch verschiedene, Neuropeptide (Rouillé et al., 1995; Steiner, 1991 und 1998; Seidah und Chrétien, 1999; Seidah und Prat, 2002), die anschließend noch posttranslational modifiziert werden können (Dockray, 1987; Beinfeld, 2003). An oder in der Nähe der Synapsen wird durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Cytosol der Zelle die Fusion der *large dense-core* Vesikel mit der

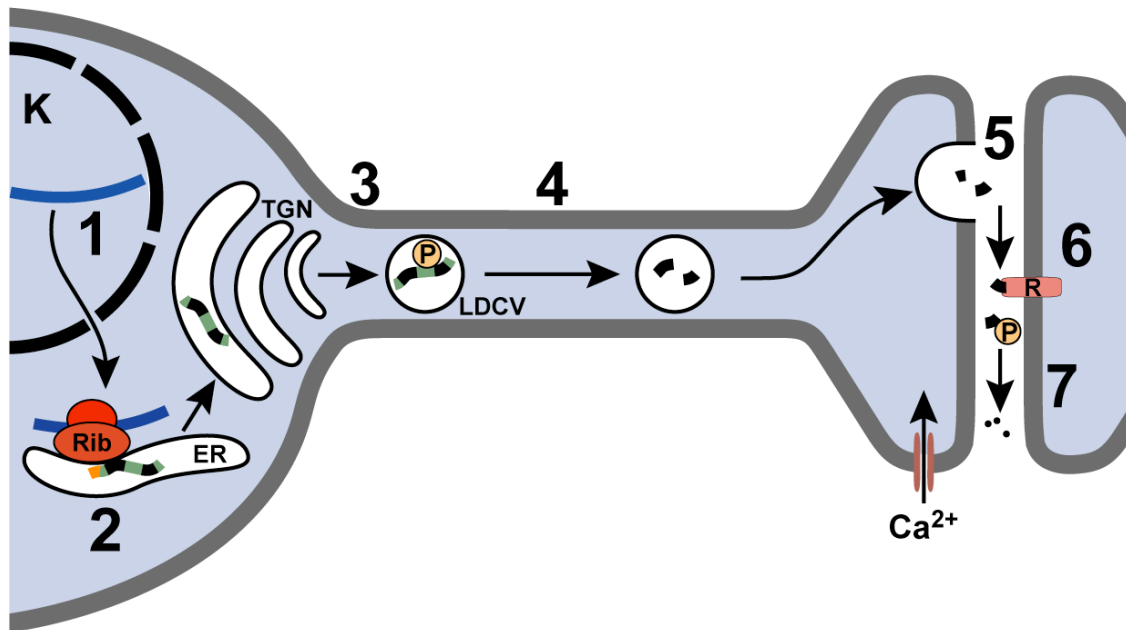


Abb. 1.1: Biosynthese und Prozessierung von Neuropeptiden. Schematische Darstellung des intrazellulären Verlaufs der Synthese, Prozessierung und Sezernierung und der anschließenden Rezeptorbindung eines Neuropeptids (modifiziert nach Siegel et al., 2006). (1) Das Transkript (blau) eines Neuropeptid-Gens entsteht während der Transkription im Zellkern (K) und wird anschließend ins Cytoplasma transportiert. (2) Durch die Translation der mRNA am Ribosom (Rib) entsteht ein Präpropeptid, das sofort ins endoplasmatische Retikulum (ER) gelangt. Im ER wird das Signalpeptid (orange) abgespalten und es entsteht das noch inaktive Propeptid (schwarz/grün). (3) Nach dem Durchlaufen des trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) wird das Propeptid zusammen mit Enzymen in *large dense-core* Vesikel (LDCV) verpackt. (4) Die Vesikel werden entlang des Axons transportiert. Im TGN oder in den LDCVs schneiden Peptidasen (P) aktive Neuropeptide (schwarz) aus dem Propeptid. Diese können zudem noch posttranslational modifiziert werden. (5) Neuropeptide werden nach Einstrom von Calcium-Ionen (Ca²⁺) sezerniert. (6) Das Neuropeptid bindet spezifisch an einen Rezeptor (R) in der Membran der Zielzelle und wird anschließend (7) von Peptidasen degradiert.

Zellmembran stimuliert, wodurch das Neuropeptid sezerniert wird. Klassische Neurotransmitter werden dagegen nach der Synthese an den Synapsen in so genannte *small secretory* Vesikel (SSV) verpackt, deren Fusion mit der Zellmembran erst bei deutlich höheren cytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen erfolgt (Verhage et al., 1991a und 1991b). Nach der Freisetzung binden die Neuropeptide an einen Rezeptor in der Zellmembran der Zielzelle und lösen eine Signalkaskade in der Zelle aus (Florén et al., 2000; Conner et al., 2007; Chiou et al., 2007). Während klassische Neurotransmitter vorwiegend von den präsynaptischen Neuronen wieder aufgenommen und erneut verwendet werden, werden Neuropeptide außerhalb der Zelle rasch von Peptidasen degradiert (Roques und Noble, 1995). Deutliche Unterschiede gibt es auch in der Regulation der Synthese von Neuropeptiden und klassischen Neurotransmittern. Dabei findet bei Neuropeptiden die wichtigste Regulation auf der Ebene der Transkription der Neuropeptid-Gene statt. Außerdem kann auch die Translation, Sekretion und anschließende Degradation reguliert werden (Zigmond und Sun, 1997; Loh et al., 2004;

Pritchard und White, 2007). Die Synthese der Neurotransmitter wird dagegen hauptsächlich über die Expressionskontrolle der Enzyme, die entscheidende Schritte in deren Synthese katalysieren, reguliert.

1.2.2 Funktion und Expression von Neuropeptiden

Neuropeptide werden meist nicht als alleinige Neurotransmitter benutzt, sondern werden zusammen mit einem oder mehreren klassischen Neurotransmittern produziert (Lundberg et al., 1983; Lindh und Hökfelt, 1990; Hökfelt, 1991; Kupfermann, 1991; Lundberg, 1996). Neuropeptide ergänzen somit die Funktion klassischer Neurotransmitter und modulieren die Informationsübertragung zwischen Neuronen (Otsuka und Yanagisawa, 1990; Wiesenfeld-Hallin und Xu, 1998; Fürst, 1999; Lecci und Maggi, 2001).

In der Maus werden mehrere Neuropeptide in sensorischen Neuronen exprimiert und sind somit auch in sensorischen Fasern, die das Rückenmark innervieren, vorhanden. Außerdem werden Neuropeptide von Neuronen in verschiedenen Schichten des dorsalen Horns gebildet, sowohl von inhibitorischen Neuronen, die GABA als Neurotransmitter einsetzen, als auch von exzitatorischen Neuronen, die Glutamat als Neurotransmitter nutzen (Todd et al., 1992; Rowan et al., 1993; Todd und Spike, 1993; Simmons et al., 1995; Hökfelt et al., 2000; Todd et al., 2003). Sie beeinflussen die Verarbeitung der sensorischen Informationen, die im dorsalen Horn stattfindet. Im Besonderen wurde experimentell die Funktion von Neuropeptiden in der Weiterleitung und Verarbeitung von Schmerzreizen in Mäusen und Ratten untersucht; in solchen Experimenten wurden exogene Neuropeptide appliziert oder Neuropeptid-Rezeptoren pharmakologisch inhibiert. Die gezielte Mutation einiger Neuropeptid-Gene in Mäusen erlaubte darüber hinaus die Analyse ihrer Funktion in der Modulation von sensorischen Reizen.

Unter den gut untersuchten Neuropeptiden befinden sich die beiden Opioiden, Dynorphin und Enkephalin, und die Neuropeptide Nociceptin, Galanin und NPY. Es existieren mehrere verschiedene Varianten von Dynorphin, die alle durch das Gen *Pdyn* kodiert werden. Transgene Mäuse mit einem mutierten *Pdyn*-Gen zeigen eine leicht verstärkte Sensitivität gegenüber schmerzhaften Reizen. Allerdings zeigten diese Studien auch,

dass Dynorphin für die Aufrechterhaltung von neuropathischem Schmerz notwendig ist, der durch Verletzung von Nerven hervorgerufen wurde (Wang et al., 2001). Diese Funktion beruht wahrscheinlich auf der spezifischen Bindung von Dynorphin an den Bradykinin-Rezeptor, die zur Anregung von Neuronen des dorsalen Rückenmarks durch Calcium-Einfluss mittels spannungssensitiver Calcium-Kanäle führt (Lai et al., 2006). Enkephalin hat dagegen einen analgetischen, also schmerzlindernden Einfluss auf neuropathischen Schmerz, wenn das Neuropeptid in sensorischen Neuronen überexprimiert wird (Hao et al., 2003). Durch Mutation des für Enkephalin kodierenden Gens *Penk1* konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Enkephalin durch experimentell ausgelösten neuropathischen Schmerz aktiviert wird und dass die vermehrte Freisetzung von Enkephalin zur Phosphorylierung des μ Opioid-Rezeptors führt. Dies ist möglicherweise ein Grund der Entwicklung von Toleranz gegenüber dem Opiat Morphin, die auch bei Schmerzpatienten mit einer langen Morphin-Medikation zu beobachten ist (Nitsche et al., 2002; Petraschka et al., 2007). Die Applikation des Neuropeptids Nociceptin, das durch das Gen *Pnoc* kodiert wird, führte im ZNS von Mäusen und Ratten sowohl zu pro- als auch antinozizeptiven Effekten (Henderson und McKnight, 1997; King et al., 1998; Grisel und Mogil, 2000; Rizzi et al., 2001). Die Mutation des *Pnoc*-Gens führte nicht zu einer veränderten Reaktion auf akuten Schmerz, allerdings zu einer stärkeren Reaktion auf länger anhaltende Schmerzreize (Koster et al., 1999). In Mäusen, in denen das Gen des Neuropeptids Galanin mutiert ist, konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Schmerzreizen gemessen werden. Die experimentelle Verletzung von Nerven, die in Mäusen neuropathischen Schmerz induziert, führt zur deutlichen Steigerung der *Galanin*-Expression. Wurde neuropathischer Schmerz in *Galanin*-mutanten Mäusen induziert, zeigten diese Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich verringerte Reaktionen auf Schmerzreize (Kerr et al., 2000). Auch Analysen der Funktion des Neuropeptids Tyrosin (NPY) konnten sowohl pro- als auch antinozizeptive Effekte belegen (Höckfelt et al., 2007). In transgenen Mäuse mit einer Mutation des *NPY*-Gens konnten dagegen kaum Veränderungen in der Schmerzempfindung beobachtet werden, allerdings war in diesen Tieren Selbstverletzung (Autotomie) häufiger zu beobachten, die auf eine veränderte Schmerzempfindung zurückzuführen sein könnte (Shi et al., 1998).

1.3 Differenzierung von Nervenzellen im Rückenmark

Das Rückenmark entwickelt sich aus dem Neuralrohr, das zu Beginn aus proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen besteht. Ab dem Entwicklungsstadium E9.5 bilden diese Vorläuferzellen verschiedenen Nervenzellen; bestimmte Typen von Nervenzellen entstehen dabei in invarianter Art und Weise zu bestimmten Zeitpunkten und an bestimmten dorso-ventralen Positionen. Dies wird dadurch erreicht, dass die Vorläuferzellen eine positionelle Information erhalten. Diese positionelle Information resultiert darin, dass Vorläuferzellen spezifische Transkriptionsfaktoren entsprechend ihrer Position exprimieren, die das zukünftige Schicksal der Zellen, die sie bilden werden, bestimmen. Aus den Vorläuferzellen entstehen sowohl Nerven- als auch Glia-Zellen, wobei die Bildung der Glia-Zellen zeitlich meist nach der Bildung der Neurone erfolgt (Kessarar et al., 2001; Cai et al., 2005; Vallstedt et al., 2005). Während die Vorläuferzellen sich in der Ventrikularzone befinden, wandern die Nerven- und Glia-Zellen radial aus der Ventrikularzone und bilden die Mantelzone. Mit der Differenzierung verlassen die neuronalen Vorläuferzellen den Zellzyklus und werden postmitotisch. Diesen Vorgang nennt man Neurogenese. Die Neurogenese wird durch den Notch-Signalweg und basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Die Aktivität des Notch-Signalwegs ist für die Aufrechterhaltung der Vorläuferzellen notwendig (Beatus und Lendahl, 1998; Nakamura et al., 2000; Hitoshi et al., 2002), während proneurale bHLH-Faktoren bewirken, dass Vorläuferzellen differenzieren, d.h. postmitotisch werden und in die Mantelzone einwandern (Bertrand et al., 2002). Die differenzierten Neurone in der Mantelzone durchlaufen noch zusätzliche Reifungsprozesse und wandern zu ihren endgültigen Positionen.

1.4 Musterbildung und Determinierung der neuronalen Identität

In der dorsalen und ventralen Mittellinie des frühen Rückenmarks bilden sich zwei Signalzentren. In der ventralen Mittellinie entsteht die Bodenplatte, die aus spezialisierten Glia-Zellen besteht und durch Signale der *Chorda dorsalis* induziert wird. In der dorsalen Mittellinie bildet sich aufgrund der Induktion durch Signale des überliegenden Ektoderms die Deckplatte (Roelink, 1996; Lee und Jessell, 1999). Sowohl Bodenplatte als auch Deckplatte dienen im weiteren Verlauf der Rückenmarksentwicklung als sekundäre Signalzentren, die Botenstoffe, so genannte

Morphogene, sezernieren (Yamada et al., 1991; Dickinson et al., 1995; Liem et al., 1995; Chiang et al., 1996). Sezernierte Morphogene bilden einen Konzentrationsgradienten aus und kontrollieren so das Schicksal von Zellen über eine gewisse Entfernung, da abgestufte Morphogen-Konzentrationen die Expression von Genen in den Zellen innerhalb des Konzentrationsgradienten induzieren oder reprimieren können. Die Morphogene diffundieren entlang der dorso-ventralen Achse und sind für die Musterbildung in neuronalen Vorläuferzellen verantwortlich (Jessell, 2000; Helms und Johnson, 2003).

Die Prozesse der Musterbildung sind am besten in der Basalplatte untersucht worden (Abb. 1.2). Die *Chorda dorsalis* und die Bodenplatte produzieren das Morphogen *Sonic hedgehog* (*Shh*). Das sezernierte Shh-Protein diffundiert entlang der dorso-ventralen Achse und soll somit einen Gradienten mit abgestuften Shh-Konzentrationen ausbilden, d.h. die Shh-Konzentration soll mit zunehmender Entfernung von der Bodenplatte geringer werden. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Konzentrationsgradient zur Bildung von streifenförmigen Expressionsdomänen von Musterbildungsgenen innerhalb der Ventrikularzone dient (Roelink et al., 1995; Briscoe et al., 2000 und 2001; Hynes et al., 2000; Jessell, 2000; Briscoe und Ericson, 2001). Musterbildungsgene, die im

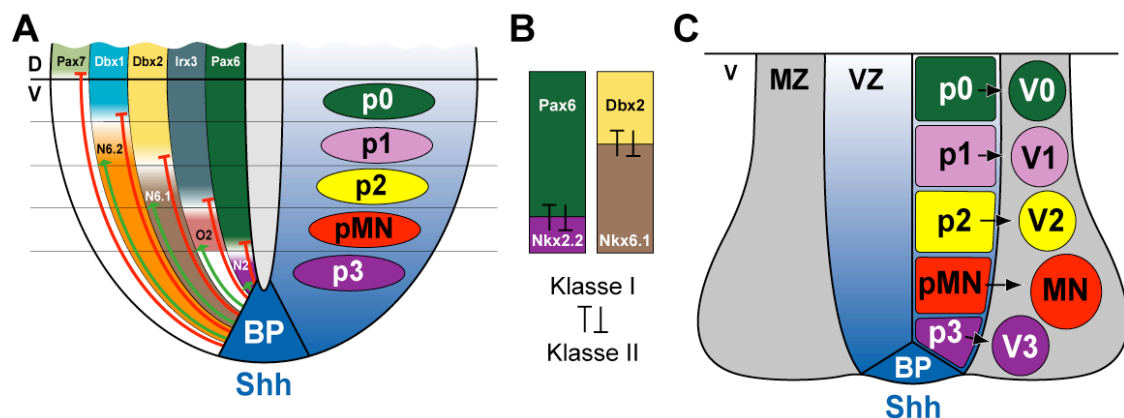


Abb. 1.2: Modell der Spezifizierung von neuronalen Grundtypen im ventralen Rückenmark. Schematische Darstellung der drei Phasen der Musterbildung im ventralen Rückenmark (modifiziert nach Jessell, 2000). (A) Das Morphogen *Sonic hedgehog* (*Shh*) wird in einem frühen Entwicklungsstadium von der *Chorda dorsalis* und der Bodenplatte (BP) sezerniert und bildet durch Diffusion einen dorso-ventralen Konzentrationsgradienten (blau) aus. Abgestufte Shh-Konzentrationen reprimieren (roter Balken) die Expression von Klasse I-Musterbildungsgenen (*Pax7*, *Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3* und *Pax6*) und induzieren (grüner Pfeil) die Expression von Klasse II-Musterbildungsgenen (*Nkx6.2*, *Nkx6.1*, *Olig2* und *Nkx2.2*). Die Expression der Musterbildungsgene bestimmt die Ausbildung von fünf Vorläuferdomänen (p0-p3 und pMN). (B) Durch die gegenseitige Repression von Klasse I- und Klasse II-Musterbildungsgenen schärfen sich die Grenzen der Expressionsdomänen. (C) Ab Tag 9.5 der Embryogenese (E9.5) wandern differenzierte Neurone aus den Vorläuferdomänen der Ventrikularzone (VZ) in die Mantelzone (MZ) des Rückenmarks und bilden ventrale Interneurone (V0-V3) und Motorneurone (MN). Abkürzungen: D, dorsal; V, ventral; N6.2, *Nkx6.2*; N6.1, *Nkx6.1*; O2, *Olig2*; N2, *Nkx2.2*.

ventralen Rückenmark exprimiert werden, sind meist Homöobox-Transkriptionsfaktoren (Briscoe et al., 1999 und 2000; Pierani et al., 1999). Die Expression von Klasse I-Musterbildungsgenen wie *Pax6*, *Pax7*, *Irx3*, *Dbx1* und *Dbx2* wird von Shh reprimiert, während die Expression von Klasse II-Musterbildungsgenen wie *Nkx6.1*, *Nkx6.2*, *Olig2* und *Nkx2.2* durch Shh induziert wird (Ericson et al., 1997; Briscoe et al., 2000; Sander et al., 2000). Die Induktion oder Repression verschiedener Musterbildungsgene erfolgt bei unterschiedlichen Shh-Konzentrationen, so dass die ventrale Ventrikularzone in fünf Streifen unterteilt wird, in denen bestimmte Kombinationen von Musterbildungsgenen exprimiert werden.

Eine Vorläuferzelle exprimiert somit gewisse Musterbildungsgene, je nach ihrer Position entlang der dorso-ventralen Achse. Vorläuferzellen, die sich innerhalb einer Expressionsdomäne befinden, durchlaufen ein ähnliches Zellschicksal und differenzieren zu einem Grundtyp von frühen Neuronen, die im weiteren Verlauf der Entwicklung noch zu verschiedenen neuronalen Subtypen maturieren können. Aus den ventralen Vorläuferdomänen entstehen fünf verschiedene postmitotische Grundtypen von Neuronen, die ventralen Interneurone V0 bis V3 und Motorneurone (Jessell, 2000; Briscoe und Ericson, 2001).

1.5 Spezifizierung von dorsalen Rückenmarksneuronen

Auch in der Alarplatte werden Expressionsdomänen innerhalb der Ventrikularzone ausgebildet, welche die Spezifizierung verschiedener dorsaler Neuronentypen bestimmen. Von der Deckplatte selbst, aber auch von Zellen in der direkten Umgebung der Deckplatte, werden Morphogene der BMP- (*bone morphogenetic protein*) und der Wnt-Familie sezerniert und diese beeinflussen die Spezifizierung der dorsalen Neuronentypen (Casparly und Anderson, 2003). In Mäusen ohne eine funktionelle Deckplatte werden dorsale Neuronentypen der Alarplatte nicht korrekt spezifiziert (Lee et al., 2000; Manzanares et al., 2000; Millonig et al., 2000). Die Mutation des *Gdf7*-Gens, eines Mitglieds der BMP-Familie, oder die gleichzeitige Mutation der beiden Gene *Wnt1* und *Wnt3a* führte ebenfalls zu einer veränderten Expression von Transkriptionsfaktoren in dorsalen Vorläuferzellen und zur Fehlspezifizierung von dorsalen Neuronentypen (Lee et al., 1998; Muroyama et al., 2002). Durch die Analyse von Mäusen mit einem künstlich aktivierten Wnt-Signalweg konnte zudem gezeigt werden, dass die Kontrolle der Spezifizierung von dorsalen Interneuronen durch

Mitglieder der Wnt- und BMP-Familie abhängig voneinander verläuft. So sind BMP-Signale für die Aktivität des Wnt-Signalwegs und somit die korrekte Expression von *Olig3* im dorsalen Rückenmark notwendig (Zechner et al., 2007).

Die Neurone des dorsalen Rückenmarks werden in zwei Phasen gebildet. In der ersten Phase von E9.5 bis E11 entstehen Neurone, die sowohl in den ventralen Bereich des Rückenmarks, als auch in tiefere Schichten des dorsalen Rückenmarks einwandern. Die Mehrheit der Neurone, die in den dorsalen Teil des Rückenmarks wandern und das dorsale Horn ausbilden, wird in einer zweiten Phase der Neurogenese, die zwischen E11.5 bis E14 abläuft, gebildet. Im dorsalen Rückenmark können zwei Klassen von Neuronen (Klasse A und Klasse B) aufgrund ihrer Abhängigkeit von dorsalen Signalen unterschieden werden. Die Spezifizierung von Klasse A-Neuronen benötigt Signale, die von der Deckplatte sezerniert werden, während Klasse B-Neurone unabhängig von diesen Signalen spezifiziert werden (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Cheng et al., 2004).

1.5.1 Früh geborene dorsale Interneurone

Während der frühen Phase der Neurogenese exprimieren die Vorläuferzellen des Rückenmarks verschiedene Transkriptionsfaktoren in einem streifenförmigen Muster. Dadurch werden die dorsalen Vorläuferzellen in verschiedene Domänen unterteilt, die der Spezifizierung von sechs Grundtypen von Neuronen, den dorsalen Interneuronen 1-6 (dI1-6), dienen. Die postmitotischen Neuronentypen können durch die Expression von Transkriptionsfaktoren unterschieden werden (Abb. 1.3).

Die dI1-dI3-Neurone sind Klasse A-Neurone und die dI4-dI6-Neurone sind Klasse B-Neurone (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). Die Vorläuferdomänen werden wie im ventralen Rückenmark durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren bestimmt, die der Familie der Homöobox- als auch der bHLH-Transkriptionsfaktoren angehören. In den Vorläuferdomänen des dorsalen Rückenmarks werden unter anderem die bHLH-Faktoren *Math1*, *Ngn1*, *Ngn2*, *Ascl1* (auch *Mash1* genannt) und *Olig3* sowie die Homöobox-Faktoren *Gsx1* und *Gsx2* (auch *Gsh1* und *Gsh2* genannt) exprimiert. Alle Vorläuferzellen der Klasse A-Neurone werden durch die Expression von *Olig3* gekennzeichnet und in *Olig3*-mutanten Mäusen werden dI1-Neurone in verringerter

Anzahl geboren sowie dI2- und dI3-Neurone zu Klasse B-Neuronen fehlspezifiziert (Müller et al., 2005). *Math1* wird nur von Vorläuferzellen der dI1-Neurone exprimiert und ist für deren Spezifizierung notwendig, was durch den kompletten Verlust der dI1-Neurone in *Math1*-mutanten Mäusen verdeutlicht wird (Birmingham et al., 2001; Gowan et al., 2001). *Ngn1* und *Ngn2* werden in Vorläufern der dI2-Neurone exprimiert und die gleichzeitige Mutation von *Ngn1* und *Ngn2* führte in transgenen Mäusen zum Verlust sämtlicher dI2-Neurone (Gowan et al., 2001). Vorläuferzellen der dI3-Neurone exprimieren sowohl *Ascl1* als auch *Gsx2*. In *Ascl1*-mutanten Mäusen werden deutlich weniger dI3-Neurone geboren, während in *Gsx2*-mutanten Mäusen diese Neurone komplett fehlen (Helms et al., 2005; Kriks et al., 2005).

Klasse B-Neurone werden durch die postmitotische Expression des Homöobox-Transkriptionsfaktors *Lbx1* gekennzeichnet, der auch für die korrekte Spezifizierung dieser Neurone notwendig ist. In *Lbx1*-mutanten Mäusen nehmen alle Klasse B-Neurone den Charakter von Klasse A-Neuronen an (Gross et al., 2002; Müller et al. 2002). Zudem werden *Ascl1*, *Gsx1* und *Gsx2* in den Vorläuferdomänen der dI4- und dI5-Neurone exprimiert und *Ptf1a* in der Vorläuferdomäne der dI4-Neurone. Sowohl in *Ascl1*- als auch in *Gsx1/2*-doppelt mutanten Mäusen werden keine dI5-Neurone geboren (Helms et al., 2005; Mizuguchi et al., 2006). Die Mutation von *Ptf1a* führt zur Fehlspezifizierung von dI4- zu dI5-Neuronen (Glasgow et al., 2005).

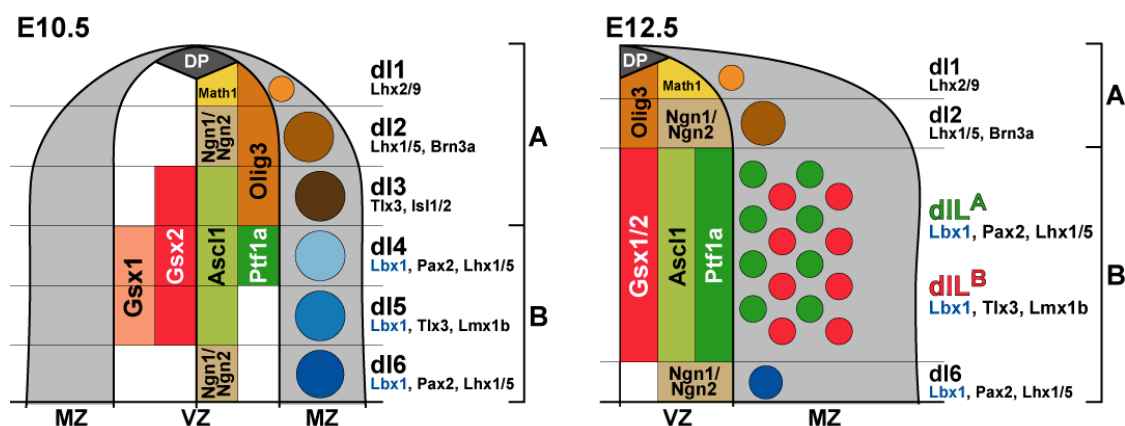


Abb. 1.3: Spezifizierung von Neuronenpopulationen im dorsalen Rückenmark. Schematische Darstellung der Spezifizierung von früh und spät geborenen Neuronen. In der ersten Phase der Neurogenese (E9.5-E11) bestimmt die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren die Ausbildung von sechs Vorläuferdomänen entlang der dorso-ventralen Achse und die Bildung von sechs Typen dorsaler Interneurone (dI1-dI6). In der zweiten Phase der Neurogenese (E11.5-E14) werden dILA- und dILB-Neurone, die später das dorsale Horn bilden, in einem Salz-und-Pfeffer-Muster gebildet. Die gemeinsame Vorläuferdomäne dieser beiden Neuronentypen exprimiert *Gsx1*, *Gsx2*, *Ascl1* und *Ptf1a*. Die verschiedenen Neuronentypen werden durch die Expression der angegebenen Transkriptionsfaktoren definiert. Abkürzungen: A, Klasse A; B, Klasse B; DP, Deckplatte; VZ, Ventrikularzone; MZ, Mantelzone.

1.5.2 Spät geborene dorsale Interneurone

Während der zweiten Phase der Neurogenese werden nur noch wenige Klasse A-Neurone, aber vermehrt Klasse B-Neurone gebildet. Die Klasse B-Neurone der zweiten Neurogeneseperiode bilden später das dorsale Horn und bestehen aus zwei Neuronentypen, dILA (*dorsal interneuron late A*) und dILB, die aus einer gemeinsamen Vorläuferdomäne in einem Salz-und-Pfeffer-Muster entstehen (Abb. 1.3). Postmitotische dILA- und dILB-Neurone können durch die Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren unterschieden werden: dILA-Neurone exprimieren *Lbx1* zusammen mit *Pax2* und *Lhx1/5*, während dILB-Neurone *Lbx1* zusammen mit *Tlx3* und *Lmx1b* exprimieren (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich dILA- und dILB-Neurone funktionell unterscheiden, da aus dILA-Neuronen inhibitorische Neurone und aus dILB-Neuronen exzitatorische Neurone hervorgehen (Cheng et al., 2004). Im Rückenmark benutzen die inhibitorischen dILA-Neurone die Neurotransmitter GABA und Glycin und exzitatorische dILB-Neurone den Neurotransmitter Glutamat.

Durch die Analyse von transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren für die Spezifizierung und korrekte Differenzierung der dILA- und dILB-Neurone notwendig sind. Dies betrifft sowohl Faktoren, die in den Vorläuferzellen exprimiert werden, als auch Faktoren, die von postmitotischen Neuronen exprimiert werden. In den Vorläuferzellen der dILA- und dILB-Neurone werden die Transkriptionsfaktoren *Gsx1*, *Gsx2*, *Ascl1* und *Ptf1a* exprimiert.

Gsx1/2 werden von allen Vorläuferzellen exprimiert, sind aber nur für die Bildung der dILB-Neurone essenziell. In *Gsx1/2*-doppelt mutanten Tieren werden keine dILB-Neurone gebildet, sondern stattdessen eine vermehrte Anzahl von dILA-Neuronen (Mizuguchi et al., 2006). *Ascl1* wird dagegen nur von einem Teil der Vorläuferzellen exprimiert, aus dem aber sowohl dILA- als auch dILB-Neurone hervorgehen (Wildner et al., 2006). *Ascl1* ist allerdings nur für die Entstehung der dILA-Neurone notwendig, was durch die Reduktion der Anzahl der dILA-Neurone in *Ascl1*-mutanten Mäusen deutlich wird (Mizuguchi et al., 2006; Wildner et al., 2006). *Ptf1a* wird von einem Teil der *Ascl1*+ Vorläuferzellen nach dem Verlassen des Zellzyklus exprimiert. *Ptf1a* bildet dabei einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor *Rbpj*, der für die Entstehung von

inhibitorischen dILA-Neuronen wichtig ist. Sowohl in *Ptf1a*- als auch in *Rbpj*-mutanten Embryonen werden keine dILA-Neurone gebildet, sondern stattdessen nur Tlx3+ dILB-Neurone (Glasgow et al., 2005; Hori et al., 2008).

Die Expression der in den Vorläuferzellen exprimierten Transkriptionsfaktoren wird in den postmitotischen dILA- und dILB-Neuronen rasch abgeschaltet. Stattdessen exprimieren diese Neurone andere Transkriptionsfaktoren. Sowohl dILA- als auch dILB-Neurone exprimieren *Lbx1*, wobei *Lbx1* für die korrekte Spezifizierung von dILA- und dILB-Neuronen notwendig ist (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Cheng et al., 2005). dILA-Neurone exprimieren außerdem die Transkriptionsfaktoren *Pax2*, *Lhx1* und *Lhx5*. Der *paired box*-Transkriptionsfaktor *Pax2* besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung von inhibitorischen dILA-Neuronen. In *Pax2*-mutanten Mäusen werden keine dILA-Neurone gebildet, diese Neurone werden aber nicht zu dILB-Neuronen fehlspezifiziert, da die Anzahl von dILB-Neuronen in diesen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert ist (Cheng et al. 2004). Die beiden Lim Homöobox-Transkriptionsfaktoren *Lhx1* und *Lhx5* sind für die Aufrechterhaltung der einmal festgelegten inhibitorischen Identität der dorsalen dILA-Neurone erforderlich. Sie sind für die Expression von *Pax2* notwendig und erhalten somit die GABAerge Identität. In *Lhx1/5*-doppelt mutanten Tieren reduziert sich ab Tag E13.5 die Expression von *Pax2* und die GABAerge Identität der dILA-Neurone geht verloren (Pillai et al., 2007).

dILB-Neurone exprimieren neben *Lbx1* die Transkriptionsfaktoren *Tlx1*, *Tlx3*, *Lmx1b* und später *Prrxl1* (auch *DRG11* genannt). Die Funktion von *Tlx1* und *Tlx3* ist dabei teilweise redundant und beide Faktoren sind für die Entstehung von dILB-Neuronen essenziell. In Mäusen, in denen *Tlx3* gemeinsam mit *Tlx1* ausgeschaltet wurde, werden dILB-Neurone zu dILA-Neuronen fehlspezifiziert (Cheng et al., 2004). Der Lim Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lmx1b* ist dagegen für die Aufrechterhaltung der Expression von *Tlx3* notwendig. In *Lmx1b*-mutanten Mäusen ist die Differenzierung und Migration der dILB-Neurone gestört, unter anderem geht die Expression des *paired box*-Transkriptionsfaktor *Prrxl1* in den beiden obersten Schichten des dorsalen Horns verloren (Ding et al., 2004). Dies führt sowohl bei *Lmx1b*- als auch bei *Prrxl1*-mutanten Mäusen zu einem veränderten Einwachsen von TrkA-positiven sensorischen Afferenzen (Chen et al., 2001; Ding et al., 2004).

Die dILA- und dILB-Neurone wandern nach ihrer Geburt in das sich bildende dorsale Horn des Rückenmarks ein. Dabei maturieren sie und die ursprünglich nur zwei verschiedenen Grundtypen dILA und dILB diversifizieren zu vielen verschiedenen Neuronentypen. Durch die Ausbildung dieser teilweise auch morphologisch distinkten Zelltypen wird unter anderem die charakteristische Schichtung des dorsalen Horns erkennbar. Die Diversifizierung der Neurone wird ab dem Entwicklungsstadium E14 auch durch die Analyse der postmitotisch exprimierten Transkriptionsfaktoren deutlich, da ab diesem Zeitpunkt mehr als nur zwei Neuronentypen im dorsalen Horn unterschieden werden können (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). Zudem beginnt in diesem Zeitraum die Expression von weiteren Genen, die für die Funktion der Neurone wichtig ist, z.B. von verschiedenen Neuropeptiden. Die Mechanismen, die diese Reifung und Diversifizierung der dorsalen Neurone steuern, sind bisher noch weitgehend unbekannt.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die molekularen Mechanismen, welche die Spezifizierung dorsaler Rückenmarksneurone kontrollieren, wurden in den letzten Jahren aufgeklärt. Wie die Maturierung und Diversifizierung von Neuronen des dorsalen Rückenmarks reguliert wird, ist allerdings noch offen. Um diese wichtigen Vorgänge besser zu verstehen, sollten im Rahmen dieser Arbeit Gene identifiziert werden, die als molekulare Marker verschiedene dorsale Neuronentypen charakterisieren oder die als Transkriptionsfaktoren die Mechanismen der Maturierung und Diversifizierung kontrollieren. Dazu wurden *Gsx1/2*-mutante Mäuse für eine genomweite Expressionsanalyse genutzt. Im dorsalen Rückenmark *Gsx1/2*-mutanter Mäuse werden keine glutamatergen, exzitatorischen dILB-Neurone, sondern stattdessen eine erhöhte Anzahl GABAerger, inhibitorischer dILA-Neurone geboren (Mizuguchi et al., 2006). Mit Hilfe der genomweiten Expressionsanalyse des dorsalen Rückenmarks *Gsx1/2*-mutanter Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung sollten Gene identifiziert werden, die in dILA- und dILB-Neuronen differenziell exprimiert werden und somit potenziell für deren Funktion und Entwicklung wichtig sind. Unter den vielen differenziell exprimierten Genen konnte ich unter anderem solche identifizieren, die für Neuropeptide und Transkriptionsfaktoren kodieren. Interessanterweise waren alle Neuropeptid-Gene spezifisch entweder in inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen exprimiert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit habe ich die Kontrolle der Expression von Neuropeptiden in inhibitorischen dILA-Neuronen untersucht. Durch die Analyse mehrerer transgener Mausstämme, in denen die vorher identifizierten dILA-spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren *Pax2*, *Neurod1*, *Neurod2*, *Neurod6*, *Lhx1* und *Lhx5* mutiert waren, wurde untersucht, welche Gene die Reifung der peptidergen, inhibitorischen Neurone des dorsalen Rückenmarks kontrollieren.