

3 Ergebnisse

3.1 Expression von *Gsx1/2* im embryonalen Rückenmark der Maus

Die beiden Gene *Gsx1* und *Gsx2* kodieren für Homöobox-Transkriptionsfaktoren und werden während der Embryonalentwicklung der Maus im dorsalen Rückenmark exprimiert. Die Expression von *Gsx1* und *Gsx2* in der Ventrikularzone der Alarplatte erfolgt sowohl während der frühen Phase der Neurogenese um das Embryonalstadium E10.5 als auch während der späten Neurogenese um E12.5 in weitgehend überlappenden Expressionsmustern (Kriks et al., 2005; Mizuguchi et al., 2006). Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen erkennt man, dass sich die Expressionsmuster von *Gsx1* und *Gsx2* am Tag E10.5 noch stark unterscheiden (Abb. 3.1 A,B), allerdings

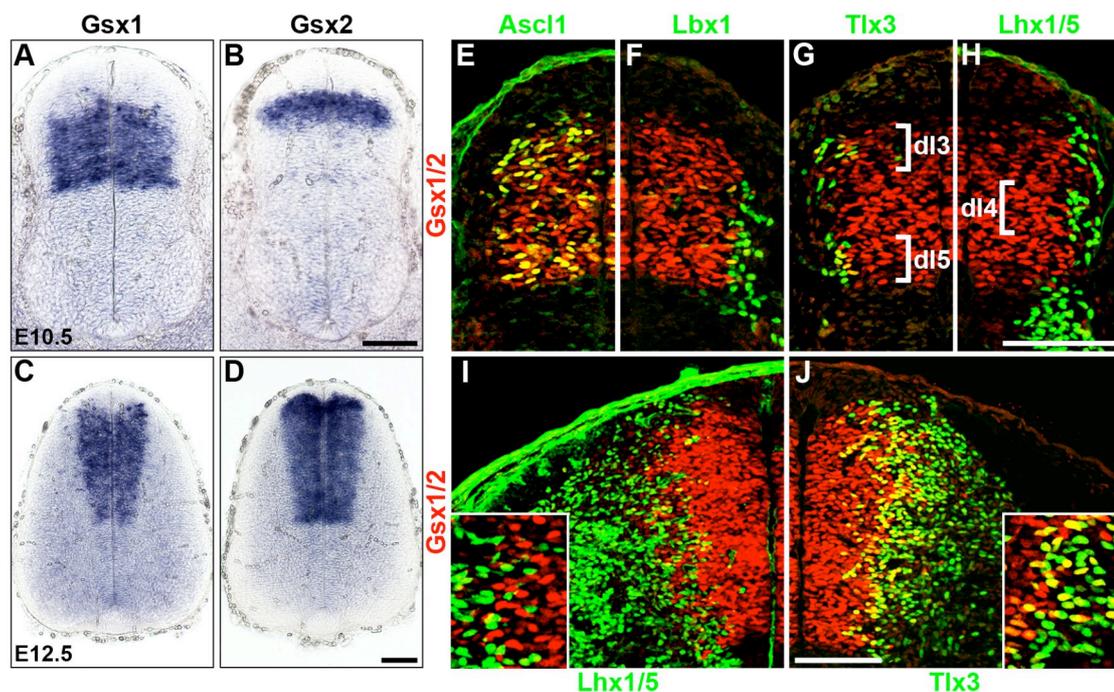


Abb. 3.1: *Gsx1* und *Gsx2* werden in dorsalen Vorläuferzellen exprimiert, aus denen dI3-, dI4-, dI5-, dILA- und dILB-Neurone entstehen. *In situ*-Hybridisierungen auf Wildtyp-Embryonen mit Sonden, die spezifisch für *Gsx1* (A,C) bzw. *Gsx2* (B,D) sind. (A,B) Am Tag E10.5 werden *Gsx1* und *Gsx2* in aneinandergrenzenden Expressionsdomänen in der Ventrikularzone des dorsalen Rückenmarks exprimiert. (C,D) Am Tag E12.5 überlappen die Expressionsdomänen von *Gsx1* und *Gsx2* im dorsalen Rückenmark weitgehend, wobei die Expressionsdomäne von *Gsx2* dorsal etwas weiter ausgedehnt ist. (E-H) Immunhistologische Analyse der Expression von *Gsx1/2* (rot), *Ascl1*, *Lbx1*, *Tlx3* und *Lhx1/5* (alle grün) am Tag E10.5. Einige der *Gsx1/2*-positiven Vorläuferzellen exprimieren auch *Ascl1* (E). In postmitotischen *Lbx1*+ dI4- und dI5-Interneuronen werden *Gsx1/2* kaum noch exprimiert (F). Aus den *Gsx1/2*-positiven Vorläuferzellen entstehen die früh geborenen dI3-, dI4- und dI5-Neurone, die mit Antikörpern gegen *Tlx3* und *Lhx1/5* gefärbt wurden (G,H). (I,J) Immunhistologische Analyse der Expression von *Gsx1/2* (rot), *Lhx1/5* und *Tlx3* (beide grün) am Tag E12.5. Sowohl die spät geborenen *Lhx1/5*+ dILA-Neurone (I) also auch die *Tlx3*+ dILB-Neurone (J) entstehen aus *Gsx1/2*+ Vorläuferzellen. Die vergrößerten Ausschnitte in (I) und (J) verdeutlichen die vorübergehende Koexpression von *Gsx1/2* mit *Tlx3*, während *Gsh1/2* und *Lhx1/5* nicht koexprimiert werden. Maßstab: 100 μ m.

expandiert die Expression von *Gsx2* zwischen E10.5 und E11 bis zur ventralen Grenze der *Gsx1*-Expressionsdomäne, so dass die Expressionsdomänen der beiden Gene E11 weitgehend übereinstimmen (Daten nicht gezeigt). Die immunhistologische Expressionsanalyse mit einem Antikörper, der sowohl *Gsx1* als auch *Gsx2* erkennt, verdeutlichte, dass die Expressionsdomäne von *Gsx1/2* mit der Expressionsdomäne von *Ascl1* weitgehend übereinstimmt (Abb. 3.1 E). Immunhistologische Analysen mit Antikörpern gegen die postmitotisch exprimierten Transkriptionsfaktoren *Lbx1*, *Tlx3* und *Lhx1/5* am Tag E10.5 zeigten, dass während der frühen Neurogenese dI3-, dI4- und dI5-Interneurone aus *Gsx1/2*-positiven Vorläuferzellen hervorgehen (Abb. 3.1 F-H). Der Großteil der Interneurone, die in der weiteren Entwicklung das dorsale Horn des Rückenmarks bilden, wird allerdings erst in der zweiten Phase der Neurogenese um E12.5 geboren (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). Die Analyse von Embryonen am Tag E12.5 mittels *in situ*-Hybridisierung verdeutlichte die fast vollständig überlappenden Expressionsdomänen von *Gsx1* und *Gsx2* in diesem Entwicklungsstadium. Allerdings ist die Expressionsdomäne von *Gsx2* im Vergleich zu *Gsx1* dorsal weiter ausgedehnt (Abb. 3.1 C,D). Schnitte durch das Rückenmark von E12.5 Embryonen wurden mit Antikörpern gegen *Gsx1/2* und die Proteine *Lhx1/5* und *Tlx3*, die spezifisch in postmitotischen dILA- bzw. dILB-Neuronen gebildet werden, immunhistologisch gefärbt. Sämtliche dILA- und dILB-Neurone, die in einem Salz- und Pfeffer-Muster gebildet werden, entstammen einer großen Vorläuferdomäne, in der *Gsx1/2* exprimiert werden (Abb. 3.1 I,J). *Gsx1/2* werden nur vorübergehend mit dem postmitotisch exprimierten Marker *Tlx3* koexprimiert, da die Expression von *Gsx1/2* in diesen Neuronen rasch abgeschaltet wird (siehe Vergrößerung in Abb. 3.1 J). Dagegen werden *Gsx1/2* zu keinem Zeitpunkt mit *Lhx1/5* koexprimiert (siehe Vergrößerung in Abb. 3.1 I).

3.2 Verlust von dILB-Interneuronen in *Gsx1/2*-doppelt mutanten Embryonen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Mausstämme analysiert und für eine genomweite Expressionsanalyse genutzt, in denen die Gene *Gsx1* bzw. *Gsx2* durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mutiert wurden (Li et al., 1996; Szucsik et al., 1997). Durch die Verpaarung *Gsx1/2*-doppelt heterozygoter Tiere wurden *Gsx1/2*-doppelt homozygote Embryonen erhalten. Diese Mäuse wiesen eine Fehlspezifizierung der spät geborenen Interneurone des dorsalen Rückenmarks auf. Immunhistologische Färbungen auf Gewebeschnitten von Wildtyp-Embryonen des

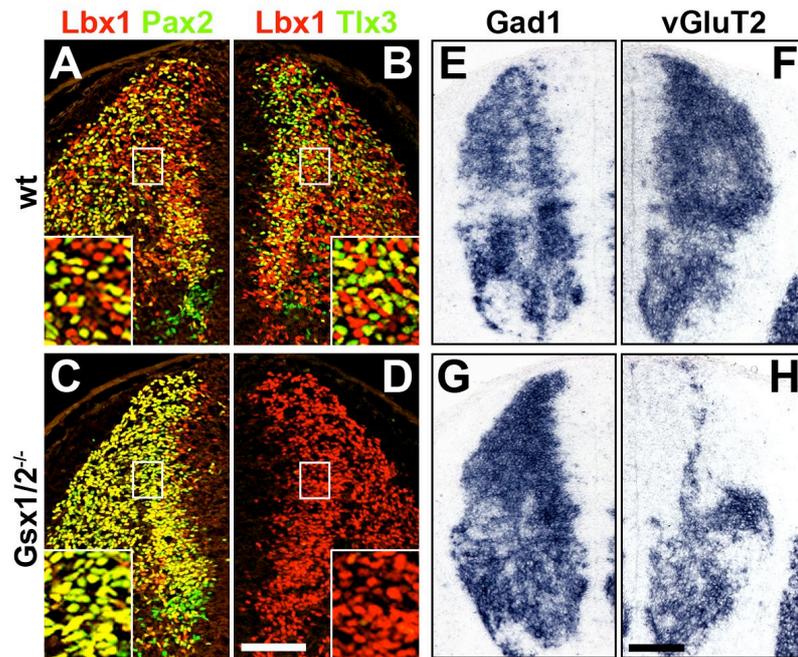


Abb. 3.2: Fehlspezifizierung von dILB-Neuronen in *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen. (A-D) Immunhistologische Analyse von dILA- und dILB-Neuronen im Rückenmark von E12.5 Embryonen mit Antikörpern gegen Lbx1 (rot), Pax2 (grün) und Tlx3 (grün). (A,B) Im dorsalen Rückenmark von Wildtyp-Embryonen entstehen Lbx1+/Pax2+ dILA-Neurone (A) und Lbx1+/Tlx3+ dILB-Neurone (B) in einem Salz-und-Pfeffer-Muster. (C,D) In *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen entstanden vermehrt Lbx1+/Pax2+ dILA-Neurone (C), aber keine Lbx1+/Tlx3+ dILB-Neurone (D). Die vergrößerten Ausschnitte verdeutlichen die Koexpression von *Lbx1* mit *Pax2* oder *Tlx3*. (E-H) *In situ*-Hybridisierungen auf Rückenmarksschnitten von E12.5 Embryonen mit spezifischen Sonden gegen *Gad1* (E,G) bzw. *vGluT2* (F,H). Im dorsalen Rückenmark von *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen wurden im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen vermehrt *Gad1*-exprimierende inhibitorische Neurone (E,G) und weniger *vGluT2*-exprimierende exzitatorische Neurone nachgewiesen (F,H). Maßstab: 100 μ m.

Stadiums E12.5 verdeutlichten die Entstehung von dILA- und dILB-Interneuronen in einem Salz-und-Pfeffer-Muster (Abb. 3.2 A,B und Gross et al., 2002; Müller et al., 2002). Im dorsalen Rückenmark *Gsx1/2*-doppelt mutanter Embryonen wurden keine Tlx3+ dILB-Interneurone gebildet (Abb. 3.2 D). Sämtliche zu diesem Zeitpunkt geborenen Interneurone exprimierten stattdessen Lbx1 zusammen mit Pax2 und entsprachen somit dILA-Interneuronen (Abb. 3.2 C). In *Gsx1/2*-mutanten Embryonen findet somit eine Fehlspezifizierung aller dILB- zu dILA-Interneuronen statt (siehe auch Mizuguchi et al., 2006). Um die Anzahl der spät geborenen dILA- und dILB-Neurone zu quantifizieren, wurde 24 Stunden vor der Präparation der Embryonen am Tag E12.5 BrdU in das trächtige Muttertier injiziert. In Wildtyp-Embryonen konnten insgesamt 252 ± 49 BrdU+/Lbx1+ Neurone nachgewiesen werden. Davon waren 81 ± 22 BrdU+/Pax2+ dILA-Neurone und 131 ± 24 BrdU+/Tlx3+ dILB-Neurone. In *Gsx1/2*-mutanten Embryonen konnten insgesamt nur 186 ± 47 BrdU+/Lbx1+ Neurone nachgewiesen werden. Davon waren 145 ± 29 BrdU+/Pax2+ dILA-Neurone. Zusätzlich

zur Fehlspezifizierung von dILB-Neuronen ist in diesen Tieren demnach auch die generelle Neurogenese, allerdings nur leicht, beeinträchtigt.

Cheng und Kollegen (2004) konnten zeigen, dass sich dorsale dILA- und dILB-Interneurone auch bezüglich des gebildeten Neurotransmitters unterscheiden. dILA-Interneurone benutzen den Neurotransmitter GABA und sind somit inhibitorische Neurone, während dILB-Interneurone den Neurotransmitter Glutamat benutzen und exzitatorisch sind. Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen konnte die Verteilung von GABAergen und glutamatergen Neuronen beobachtet werden (Abb. 3.2 E-H). GABAerge Neurone wurden mit einer spezifischen Sonde gegen das Gen *Glutamat Decarboxylase 1 (glutamic acid decarboxylase 1, Gad1)* nachgewiesen. *Gad1* katalysiert die Decarboxylierungsreaktion der Aminosäure Glutamat und vollzieht somit den entscheidenden Schritt im Stoffwechselweg der GABA-Synthese. Glutamaterge Neurone wurden dagegen mit einer spezifischen Sonde gegen das Gen des vesikulären Glutamattransporters *vGluT2* angefärbt, der in glutamatergen Neuronen exprimiert wird. In Wildtyp-Embryonen werden beide Gene in etwa gleichem Maße exprimiert (Abb. 3.2 E,F). In *Gsx1/2*-mutanten Embryonen war die *Gad1*-Expression in Neuronen des dorsalen Rückenmarks im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen deutlich verstärkt (Abb. 3.2 G), die Expression von *vGluT2* dagegen stark vermindert (Abb. 3.2 H). Diese Analysen verdeutlichen, dass der Verlust von dILB-Interneuronen in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen ebenfalls zum Verlust exzitatorischer Neurone und zur vermehrten Bildung inhibitorischer Neurone führt.

Der Verlust von exzitatorischen dILB-Neuronen in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen war nicht nur am Tag E12.5, wenn die spät geborenen Neurone entstehen, zu erkennen, sondern konnte über den gesamten Entwicklungszeitraum des dorsalen Rückenmarks bis zum Tag E18.5 nachgewiesen werden. Am Tag E18.5 exprimierte nur noch ein Teil der dILA- und dILB-Neurone den Transkriptionsfaktor *Lbx1*. dILA- und dILB-Neurone konnten aber weiterhin durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Pax2* bzw. *Tlx3* nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Die Anzahl der *Pax2*⁺ inhibitorischen dILA-Neurone war in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren weiterhin erhöht (Abb. 3.3 A,B). So konnten im dorsalen Horn von Wildtyp-Embryonen 263 ± 8 *Pax2*⁺ Neurone nachgewiesen werden, während die Anzahl in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen bei 386 ± 38 lag. Dagegen konnten in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen nur

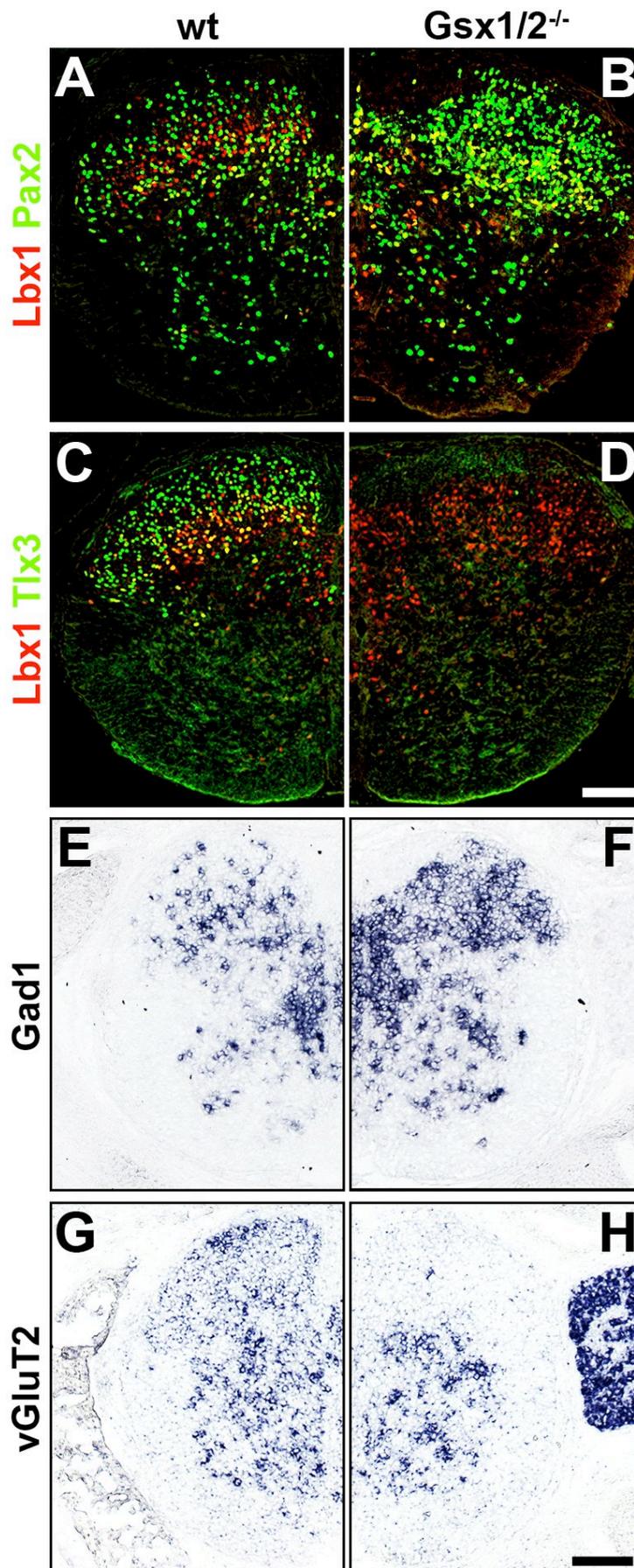


Abb. 3.3: Austausch von exzitatorischen gegen inhibitorische Neurone im dorsalen Horn von E18.5 *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen. (A-D) Immunhistologische Analyse von Pax2+ dILA- und Tlx3+ dILB-Neuronen im Rückenmark von E18.5 Embryonen mit Antikörpern gegen Lbx1 (rot), Pax2 (grün) und Tlx3 (grün). Im dorsalen Horn von *Gsx1/2*-mutanten Embryonen konnten im Vergleich zu Kontrolltieren vermehrt Pax2+ dILA-Neurone (A,B), aber keine Tlx3+ dILB-Neuronen nachgewiesen werden (C,D). (E-H) Nachweis von inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen durch *in situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden gegen *Gad1* (E,F) bzw. *vGluT2* (G,H). Im dorsalen Horn von *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen war die Expression von *Gad1* im Vergleich zu Kontrolltieren verstärkt (E,F), die Expression von *vGluT2* war dagegen nicht vorhanden (G,H). Maßstab: 100 μ m.

wenige exzitatorische dILB-Neurone nachgewiesen werden (Abb. 3.3 C,D). Während sich in Wildtyp-Embryonen 273 ± 16 Tlx3⁺ dILB-Neurone befanden, konnten in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen nur 3 ± 2 Tlx3⁺ dILB-Neurone nachgewiesen werden. Auch der direkte Nachweis von inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen durch *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden gegen *Gad1* und *vGluT2* ergab, dass sich im dorsalen Horn der *Gsx1/2*-mutanten Embryonen vermehrt inhibitorische Neurone befanden (Abb. 3.3 E,F), während keine exzitatorischen Neurone nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.3 G,H). Dies verdeutlicht, dass die Fehlspezifizierung von dILB- zu dILA-Neuronen in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen am Tag E12.5 während späterer Entwicklungsphasen nicht mehr kompensiert werden kann und somit auch den Aufbau des dorsalen Horns am Tag E18.5 entscheidend beeinflusst.

3.3 Genomweite Genexpressionsanalyse des dorsalen Rückenmarks von *Gsx1/2*-doppelt mutanten Embryonen

Das Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die eine entscheidende Funktion für den korrekten Ablauf der Differenzierung inhibitorischer dILA-Neurone besitzen. Zur Identifizierung solcher Gene stellen *Gsx1/2*-doppelt mutante Embryonen ein gutes Modellsystem dar, da im Rückenmark dieser Tiere nur einer der beiden Neuronentypen, nämlich dILA, entsteht. Gene, die spezifisch in dILA-Zellen exprimiert werden und somit möglicherweise eine dILA-spezifische Funktion in der neuronalen Differenzierung besitzen, sollten im dorsalen Rückenmark dieser Embryonen verstärkt exprimiert werden. Andererseits sollten dILB-spezifisch exprimierte Gene, die eine Funktion in der neuronalen Differenzierung der dILB-Neurone besitzen könnten, in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen schwächer als in Kontrolltieren exprimiert sein.

Daher habe ich eine genomweite Expressionsanalyse von dorsalem Rückenmarksgewebe *Gsx1/2*-mutanter Embryonen mit Hilfe von Affymetrix-Microarrays durchgeführt, und die Expressionsdaten von *Gsx1/2*-mutanten Embryonen und Wildtyp-Kontrolltieren verglichen. Ich habe das Rückenmark aus Kontroll- und *Gsx1/2*-doppelt mutanten Embryonen herauspräpariert, die Hirnhäute (Meningen) entfernt und den dorsalen Teil des Rückenmarks vom ventralen Teil getrennt. Aus dem dorsalen Rückenmarksgewebe wurde RNA isoliert und die RNA von mindestens fünf

Embryonen wurde zu einem Ansatz vereinigt. Darauf wurde die mRNA mit Hilfe von Oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als Grundlage für die Herstellung von Biotin-markierter cRNA benutzt, und anschließend die cRNA fragmentiert und mit Microarrays hybridisiert. Die Signalintensitäten der hybridisierten cRNA-Fragmente ergaben die Expressionsstärken der auf den Microarrays repräsentierten Transkripte. Gene wurden dabei als differenziell exprimiert betrachtet, wenn ihr Transkriptionsniveau in *Gsx1/2*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtypen signifikant verändert war ($p < 0,05$). Die Expressionsanalyse wurde an drei verschiedenen Embryonalstadien (E12.5, E14.5 und E18.5) durchgeführt, um Gene identifizieren zu können, die während verschiedener Phasen der Differenzierung von Neuronen des dorsalen Rückenmarks differenziell exprimiert werden.

Der größte Teil der im dorsalen Rückenmark exprimierten Gene wurde in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen und in Kontrolltieren mit einer ähnlichen Intensität exprimiert (Daten nicht gezeigt). Diese Gene werden also wahrscheinlich sowohl während der Differenzierung inhibitorischer als auch exzitatorischer Neurone ausgeprägt. Allerdings konnte durch die Expressionsanalyse auch eine große Anzahl von differenziell exprimierten Genen identifiziert werden (siehe Abb. 3.4 und 3.6). Darunter befanden sich Gene, die in *Gsx1/2*^{-/-}-Tieren verstärkt exprimiert wurden und somit wahrscheinlich spezifisch in dILA-Neuronen ausgeprägt sind. Eine zweite Gruppe von differenziell exprimierten Genen zeigte in *Gsx1/2*^{-/-}-Tieren ein im Vergleich zu Kontrolltieren schwächeres Expressionsniveau, was auf eine spezifische Expression dieser Gene in dILB-Neuronen hinweist.

Wegen der großen Anzahl differenziell exprimierter Gene, die mit Hilfe der Microarray-Expressionsanalyse identifiziert werden konnten, habe ich mich im weiteren Verlauf der Analyse auf zwei Gruppen von Genen beschränkt. Dies waren zum einen Neuropeptide, von denen sowohl dILA- als auch dILB-spezifische Gene identifiziert werden konnten (siehe 3.3.1). Außerdem habe ich Transkriptionsfaktoren weitergehend analysiert, die spezifisch in dILA-Neuronen exprimiert wurden (siehe 3.3.2), da diese Gene eine Funktion in der transkriptionellen Kontrolle der Differenzierung inhibitorischer Interneurone des dorsalen Rückenmarks besitzen könnten.

Die differenziell exprimierte Gene, die für Neuropeptide kodieren, wurden aufgrund ihres Expressionsniveaus in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen in zwei Kategorien aufgeteilt. dILA-spezifisch exprimierte Neuropeptid-Gene zeigten eine verstärkte Expression in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen und wurden als Kategorie A-Neuropeptide definiert. dILB-spezifisch exprimierte Neuropeptid-Gene mit einer geringeren Expressionsstärke in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen wurden dagegen als Kategorie B-Neuropeptide definiert.

3.3.1 Differenzielle Expression von Neuropeptiden im dorsalen Rückenmark

3.3.1.1 Identifizierung dILA-spezifisch exprimierter Kategorie A-Neuropeptide

Mehrere Gene, die für Neuropeptide kodieren, zeigten eine differenzielle Expression im dorsalen Rückenmark *Gsx1/2*-mutanter Embryonen. Die Signalintensitäten der Neuropeptide *NPY*, *Nociceptin*, *Enkephalin* und *Dynorphin* waren in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen erhöht, was auf eine spezifische Expression dieser Neuropeptid-Gene in inhibitorischen dILA-Neuronen hinweist (Abb. 3.4 A,B). Auch die Signalintensitäten der beiden Gene *Gad1* und *Slc32a* (*VGAT/Viaat*), die bekanntermaßen in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden (Erlander et al., 1991; McIntire et al., 1997; Cheng et al., 2004), waren in *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen verstärkt (Abb. 3.4 A,B). Am Tag E18.5 wurden alle identifizierten dILA-spezifischen Neuropeptide im dorsalen Rückenmark exprimiert, der Beginn der Expression erfolgte allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. Deshalb konnten die Neuropeptide in Gruppen unterteilt werden, die durch einen frühen oder späten Beginn der Expression charakterisiert wurden. Die Expression der Neuropeptide *NPY* und *Nociceptin* wurde wie die Expression von *Gad1* schon am Tag E12.5 nachgewiesen (Abb. 3.4 A), während die zwei Neuropeptide *Enkephalin* und *Dynorphin* wie auch *Slc32a* erst ab Tag E18.5 exprimiert wurden (Abb. 3.4 B).

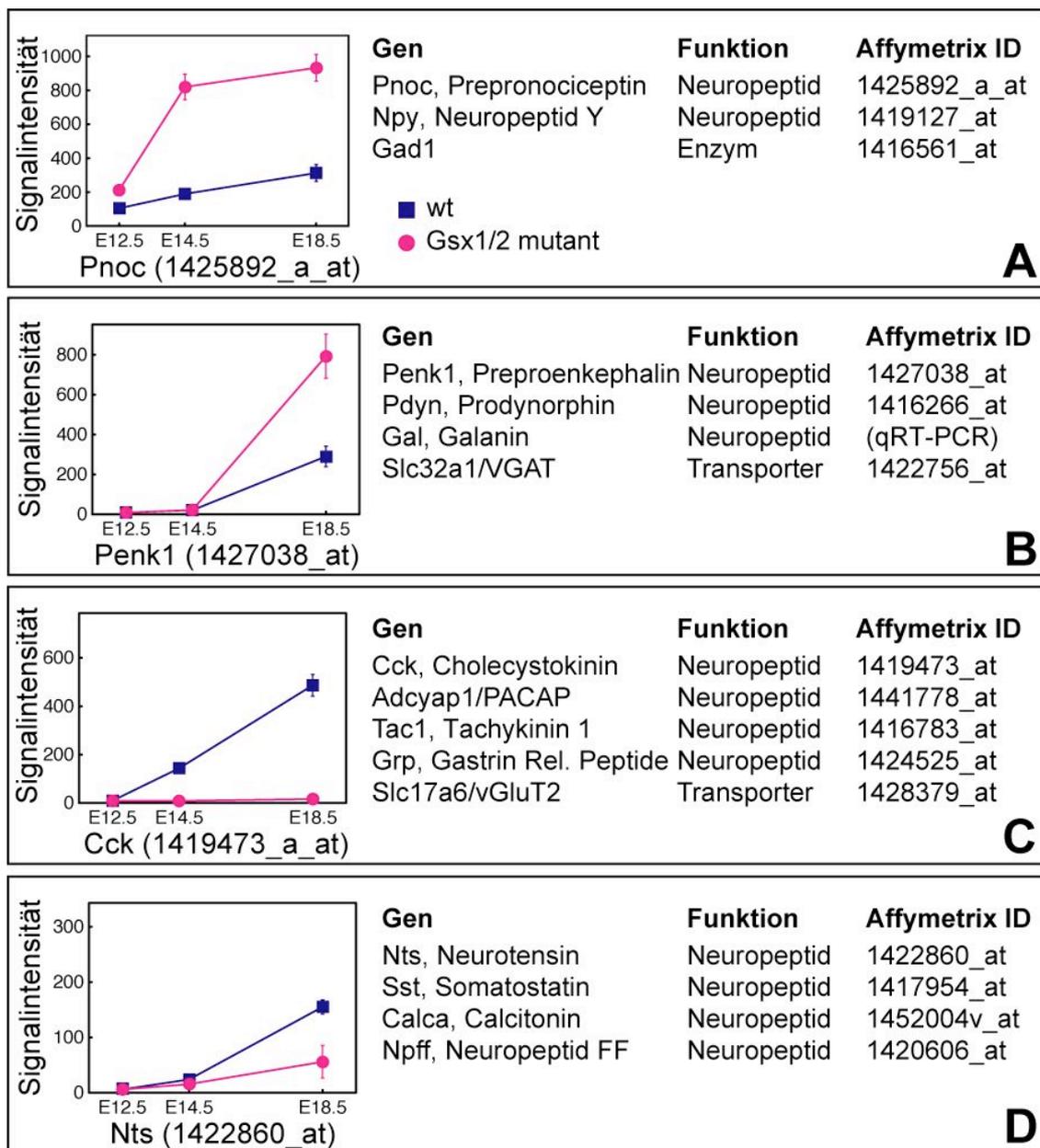


Abb. 3.4: Im dorsalen Rückenmark von *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen differenziell exprimierte Neuropeptid-Gene. Im dorsalen Rückenmark von Kontrolltieren und *Gsx1/2*-mutanten Mäusen differenziell exprimierte Neuropeptide wurden mit Hilfe von Microarrays und quantitativer RT-PCR identifiziert. Die identifizierten Gene wurden in Gruppen mit ähnlichen Expressionsprofilen eingeteilt und ein repräsentatives Expressionsprofil jeder Gruppe ist links dargestellt. (A,B) Kategorie A-Neuropeptide, die in *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren höhere Signalintensitäten zeigten und potenziell in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden. (C,D) Kategorie B-Neuropeptide, deren Signalintensitäten in *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen geringer als in Kontrolltieren waren und potenziell in exzitatorischen Neuronen exprimiert werden. Die identifizierten Gene der Kategorie A- und B-Neuropeptide wurden zusätzlich in Untergruppen mit frühem bzw. spätem Beginn der Expression eingeordnet (A,C bzw. B,D). Zum Vergleich enthalten die Gruppen auch Gene, die nicht für Neuropeptide kodieren, aber deren Expression in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen bekannt ist. Die Einordnung des Neuropeptid-Gens *Galanin* erfolgte aufgrund von Expressionsdaten, die mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) gewonnen wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Das Neuropeptid *Galanin* konnte mit Hilfe der Expressionsanalyse mittels Microarray-Hybridisierungen nicht als differenziell exprimiertes Gen nachgewiesen werden. Zudem war das Expressionsniveau von *Galanin* sowohl in Wildtyp- als auch in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen sehr gering. Dies widersprach früheren Analysen, die eine Expression von *Galanin* in GABAergen Neuronen des dorsalen Rückenmarks nachgewiesen haben (Todd et al. 1992; Simmons et al., 1995). Deshalb habe ich die Expression von *Galanin* zusätzlich durch quantitative RT-PCR untersucht. Für diese Analyse wurde cDNA verwendet, die auch zur Herstellung von cRNA für die Microarray-Expressionsanalyse diente. Die quantitative RT-PCR ergab eine Erhöhung der *Galanin*-Expressionsstärke in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (Abb. 3.5). Das Expressionsniveau von *Galanin* war in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren des gleichen Entwicklungsstadiums 2-fach (E12.5), 27-fach (E14.5) bzw. 15-fach (E18.5) erhöht. Dies sprach für eine spezifische Expression von *Galanin* in inhibitorischen dILA-Neuronen des dorsalen Rückenmarks. Da die Expressionsstärke von *Galanin* in Wildtyp-Embryonen erst am Tag E18.5 stark anstieg, wurde *Galanin* den dILA-spezifischen Neuropeptiden mit spätem Expressionsbeginn zugeordnet.

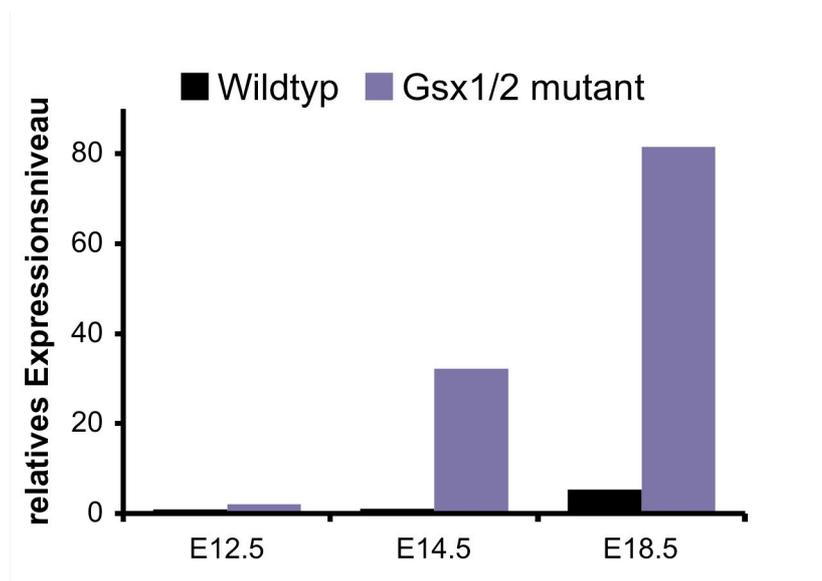


Abb. 3.5: Differenzielle Expression des Neuropeptids *Galanin*. Es ist das relative Expressionsniveau von *Galanin* im dorsalen Rückenmark der Entwicklungsstadien E12.5, E14.5 und E18.5 dargestellt, das in Gewebe von Wildtyp- und *Gsx1/2*-mutanten Embryonen mit Hilfe der quantitativen RT-PCR bestimmt wurde. Die Expressionswerte von *Galanin* wurden auf die Expressionswerte von *beta-Aktin* normalisiert und sind relativ zum Expressionsniveau von E12.5 Wildtyp-Embryonen dargestellt. Das Expressionsniveau von *Galanin* steigert sich in Wildtyp-Embryonen vom Tag E12.5 bis E18.5 5-fach. Das Expressionsniveau von *Galanin* lag in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen zu allen drei gemessenen Zeitpunkten über dem Expressionsniveau der Wildtyp-Embryonen, was auf eine spezifische Expression von *Galanin* in dILA-Neuronen hinweist. Das Expressionsniveau von *Galanin* in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen war im Vergleich zu den Kontrolltieren 2-fach (E12.5), 27-fach (E14.5) bzw. 15-fach (E18.5) erhöht.

3.3.1.2 Identifizierung dILB-spezifisch exprimierter Kategorie B-Neuropeptide

Gene, die für die Neuropeptide *Cholecystokinin (Cck)*, *Adcyap1 (PACAP)*, *Tachykinin1*, *Gastrin Releasing Peptide (GRP)*, *Neurotensin*, *Somatostatin*, *Calcitonin* und *Neuropeptid FF (NPFF)* kodieren, wurden in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen schwächer als in Kontrolltieren exprimiert, was auf eine spezifische Expression dieser Gene in dILB-Neuronen hindeutet (Abb. 3.4 C,D). Das Gen *Slc17a6 (vGluT2)*, das für einen vesikulären Glutamattransporter kodiert und von exzitatorischen Neuronen exprimiert wird (Fremeau et al., 2001; Kaneko und Fujiyama, 2002), wurde in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen ebenfalls in geringerer Menge als in Wildtyp-Embryonen exprimiert (Abb. 3.4 C). Die Expression der dILB-spezifischen Neuropeptide begann zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Rückenmarksentwicklung, was eine Unterteilung in Neuropeptid-Gene mit frühem bzw. spätem Expressionsbeginn ermöglichte. Die Gene *Cck*, *PACAP*, *Tachykinin1* und *GRP* wurden wie das Gen *vGluT2* ab Tag E14.5 exprimiert (Abb. 3.4 C), eine Expression der Gene *Neurotensin*, *Somatostatin*, *Calcitonin* und *NPFF* konnte dagegen erst ab Tag E18.5 nachgewiesen werden (Abb. 3.4 D).

Mit Hilfe der genomweiten Expressionsanalyse konnten somit Neuropeptid-Gene aufgrund ihrer spezifischen Expression in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Interneuronen in zwei Kategorien unterteilt werden. Die Neuropeptide *NPY*, *Nociceptin*, *Enkephalin*, *Dynorphin* und *Galanin*, die von inhibitorischen dILA-Neuronen exprimiert wurden, wurden als Kategorie A-Neuropeptide definiert, während die Neuropeptide *Cck*, *PACAP*, *Tachykinin1*, *GRP*, *Neurotensin*, *Somatostatin*, *Calcitonin* und *NPFF*, die von exzitatorischen dILB-Neuronen exprimiert wurden, als Kategorie B-Neuropeptide definiert wurden.

3.3.2 Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in dILA-Neuronen exprimiert werden

Auch differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren konnten durch die Microarray-Expressionsanalyse *Gsx1/2*-mutanter Embryonen identifiziert werden (Abb. 3.6). Aufgrund ihrer spezifischen Expression in dILA-Neuronen könnten diese Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone

des dorsalen Rückenmarks haben und auch die Expression der zuvor identifizierten Kategorie A-Neuropeptide kontrollieren. Unter den dILA-spezifischen Genen befanden sich die Transkriptionsfaktoren *Pax8*, *Lhx1*, *Lhx5* und *Gbx1*, deren Expression in inhibitorischen Neuronen beschrieben war (Pillai et al., 2007; John et al., 2005). Der ebenfalls identifizierte Transkriptionsfaktor *Bhlhb5* ist zumindest vorwiegend in inhibitorischen Neuronen exprimiert (Liu et al., 2007). Die Expression der Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2* und *6* im dorsalen Rückenmark wurde bisher noch nicht genauer analysiert. Alle identifizierten Transkriptionsfaktoren wurden über den gesamten Zeitraum der Differenzierung der dILA-Neurone von E12.5 bis E18.5 exprimiert, allerdings veränderten sich die Expressionsstärken der Gene innerhalb dieses Zeitraums. Dies ermöglichte eine Einteilung der dILA-spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren in früh bzw. spät exprimierte Gene. Früh exprimierte Transkriptionsfaktoren wie *Pax8*, *Lhx1* und *Lhx5* zeigten schon zum Zeitpunkt E12.5 eine hohe Transkriptionsstärke, die sich dann im weiteren Verlauf der Entwicklung abschwächte (Abb. 3.6 A), während die Expressionsstärke spät exprimierter Transkriptionsfaktoren wie *Neurod1*, *2*, *6*, *Bhlhb5* und *Gbx1* zu Beginn der Entwicklung noch anstieg und erst ab E14.5 wieder schwächer wurde (Abb. 3.6 B).

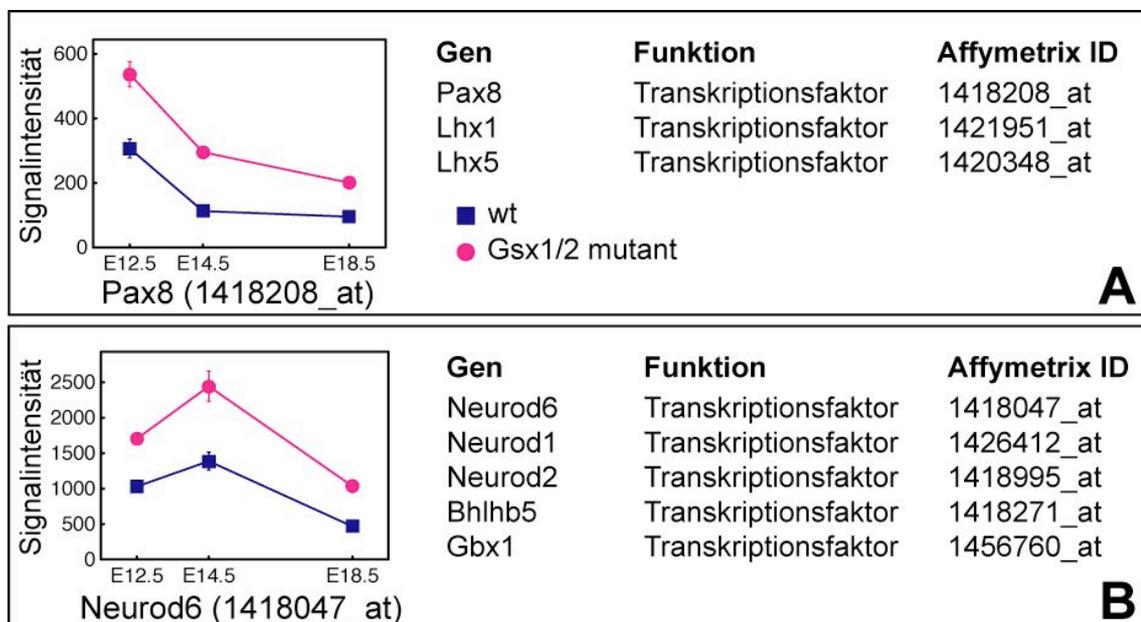


Abb. 3.6: Spezifische Expression von Transkriptionsfaktoren in inhibitorischen dILA-Neuronen. Im dorsalen Rückenmark von Kontrolltieren und *Gsx1/2*-mutanten Mäusen differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren wurden mit Hilfe von Microarrays identifiziert. (A,B) Transkriptionsfaktoren, die in *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren höhere Signalintensitäten zeigten und potenziell in inhibitorischen dILA-Neuronen exprimiert werden. Die identifizierten Transkriptionsfaktoren wurden aufgrund des zeitlichen Verlaufs des ermittelten Expressionsniveaus in Untergruppen eingeteilt, die früh bzw. spät exprimierte Gene beinhalten (A bzw. B). Für beide Gruppe ist links ein repräsentatives Expressionsprofil dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.4 Verifizierung der Expressionsdaten differenziell exprimierter Gene

Mit Hilfe der genomweiten Expressionsanalyse *Gsx1/2*-mutanter Embryonen konnten verschiedene Neuropeptide den inhibitorischen dILA- und exzitatorischen dILB-Interneuronen zugeordnet werden. Außerdem konnten mehrere Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die in dILA-Neuronen exprimiert werden und die Differenzierung dieser Neurone kontrollieren könnten. Um diese Daten zu verifizieren, musste die Expression der Neuropeptide und Transkriptionsfaktoren in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Interneuronen genauer charakterisiert und mit anderen Methoden nachgewiesen werden. Dazu wurden nun *in situ*-Hybridisierungen und immunhistologische Färbungen auf Gewebeschnitten von Wildtyp-Embryonen und verschiedenen Mausmutanten, in denen inhibitorische bzw. exzitatorische Neurone nicht gebildet werden, durchgeführt.

3.4.1 Verifizierung der Expression von Neuropeptid-Genen in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen

3.4.1.1 Verlust der Expression von Kategorie A-Neuropeptiden in *Ptfla*-mutanten Embryonen

Da in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen keine dILB-Neurone entstehen (siehe 3.2), kann die dILB-spezifische Expression von Kategorie B-Neuropeptiden durch den Verlust der Expression der Neuropeptid-Gene in diesen Embryonen direkt nachgewiesen werden. Der Nachweis der dILA-spezifischen Expression von Kategorie A-Neuropeptid-Genen durch eine verstärkte Expression in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen ist dagegen nur indirekt. Deshalb wurden zur Verifizierung der dILA-spezifischen Expression von Kategorie A-Neuropeptiden auch *Ptfla*-mutante Embryonen untersucht, in denen keine dILA-Neurone und stattdessen vermehrt dILB-Neurone gebildet werden (Glasgow et al., 2005). Der Nachweis der Expression erfolgte durch *in situ*-Hybridisierungen auf Gewebeschnitten von E18.5 Embryonen (Abb. 3.7). Die Fehlspezifizierung inhibitorischer Neurone in *Ptfla*-mutanten Embryonen wurde durch *in situ*-Hybridisierungen mit einer spezifischen Sonde gegen das Gen *Gad1*, das in inhibitorischen Neuronen exprimiert wird, bestätigt (Abb. 3.7 P,Q). Im dorsalen Horn *Gsx1/2*-mutanter Embryonen war die *Gad1*-Expression dagegen verstärkt (Abb. 3.7 R).

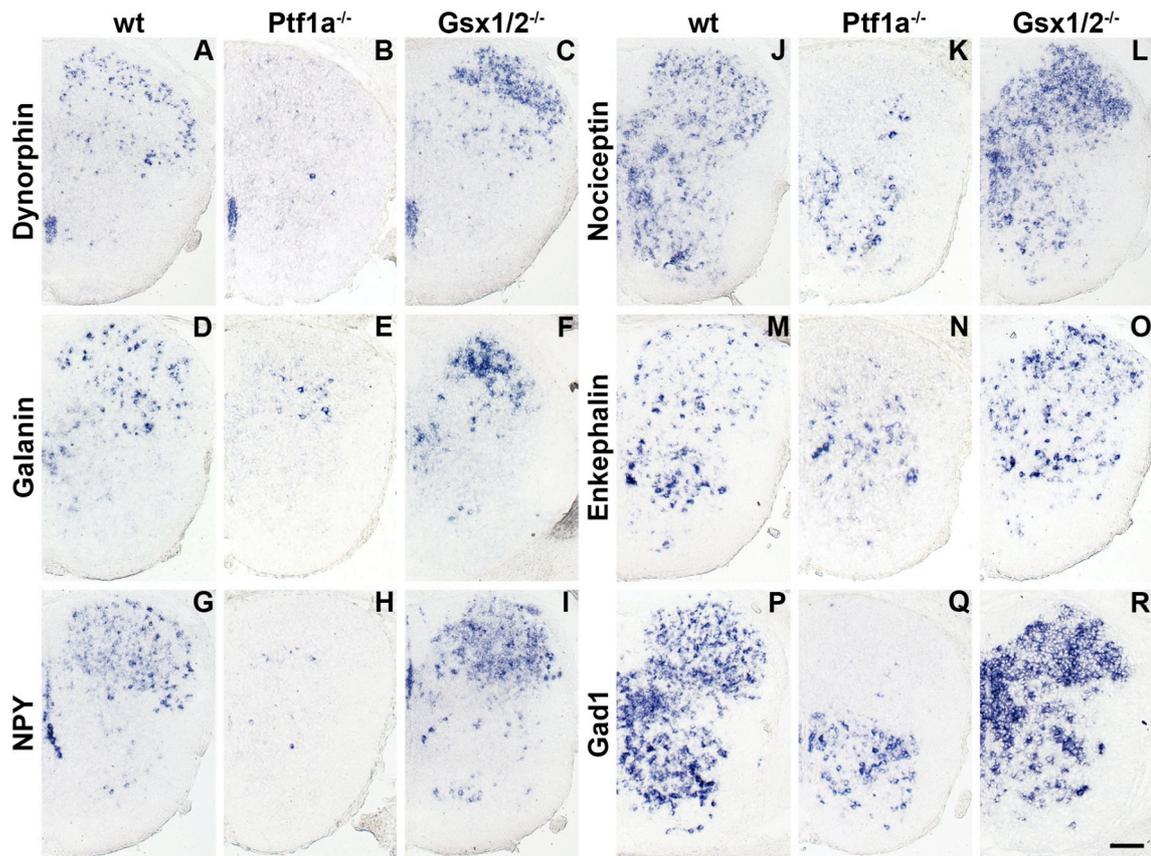


Abb. 3.7: Die Expression von Kategorie A-Neuropeptiden in inhibitorischen dILA-Neuronen. *In situ*-Hybridisierungen mit Sonden, die spezifisch für die Neuropeptide *Dynorphin* (A-C), *Galanin* (D-F), *NPY* (G-I), *Nociceptin* (J-L) und *Enkephalin* (M-O) und *Gad1* (P-R) sind. Die Hybridisierungen erfolgten auf Schnitten durch das Rückenmark von E18.5 Wildtyp-, *Ptf1a*^{-/-}- und *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen. Die Neuropeptide *Dynorphin*, *Galanin* und *NPY* werden vorwiegend im dorsalen Horn exprimiert, während die beiden Neuropeptide *Nociceptin* und *Enkephalin* wie auch *Gad1* im gesamten Rückenmark exprimiert werden. Die Anzahl aller Kategorie A-Neuropeptid+ und der *Gad1*+ Neurone war in *Ptf1a*-mutanten Embryonen deutlich reduziert, während sie im dorsalen Horn *Gsx1/2*-mutanter Embryonen erhöht war. Maßstab: 100 µm.

Die Expression der beiden Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin* beschränkt sich am Tag E18.5 weitgehend auf das dorsale Horn des Rückenmarks (Abb. 3.7 A,D), wobei sich *Dynorphin*⁺ Neurone überwiegend in den Schichten II und III befinden, während *Galanin*⁺ Neurone sowohl in den Schichten II und III als auch in tieferen Schichten (IV+V) vorkommen. Die Expression von *Galanin* war im Rückenmark *Ptf1a*-mutanter Embryonen stark vermindert (Abb. 3.7 E), während *Dynorphin*⁺ Neurone nicht vorhanden waren (Abb. 3.7 B). In *Gsx1/2*^{-/-}-Tieren war die Anzahl von *Dynorphin*⁺ und *Galanin*⁺ Neuronen dagegen stark erhöht und *Dynorphin*⁺ und *Galanin*⁺ Neurone waren vor allem vermehrt in den Schichten II und III des dorsalen Horns sichtbar (Abb. 3.7 C,F).

Das Neuropeptid *NPY* wird in allen Schichten des dorsalen Horns, aber nicht im ventralen Rückenmark exprimiert (Abb. 3.7 G), und in *Ptfla*^{-/-}-Embryonen waren nur wenige *NPY*⁺ Neurone zu erkennen (Abb. 3.7 H). Die Expression von *NPY* war in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen stark erhöht, und die verstärkte Expression erstreckte sich über sämtliche Schichten des dorsalen Horns (Abb. 3.7 I).

Nociceptin⁺ und Enkephalin⁺ Neurone können durch *in situ*-Hybridisierungen im gesamten Rückenmark von Wildtyp-Embryonen nachgewiesen werden. Dabei ist im dorsalen Horn die Anzahl der Enkephalin⁺ Neurone weit geringer als die Anzahl der Nociceptin⁺ Neurone (Abb. 3.7 J,M). Im dorsalen Horn *Ptfla*-mutanter Embryonen war die Anzahl sowohl der *Nociceptin*- als auch der *Enkephalin*-exprimierenden Neurone stark reduziert (Abb. 3.7 K,N), in *Gsx1/2*^{-/-}-Tieren dagegen vermehrt (Abb. 3.7 L,O). Die starke Reduktion von Kategorie A-Neuropeptid⁺ Neuronen in *Ptfla*-mutanten Tieren zusammen mit ihrer vermehrten Anzahl in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen verdeutlicht die präferenzielle Expression dieser Neuropeptide in inhibitorischen dILA-Neuronen. Trotz der unterschiedlichen Anzahl war die Lokalisierung der Neuropeptid⁺ Zellen in bestimmten Schichten des dorsalen Horns in Kontroll- und *Gsx1/2*-mutanten Embryonen ähnlich. Lediglich die Galanin⁺ Neurone schienen aus zwei verschiedenen Populationen zu bestehen, wobei die Zellzahl der *Galanin*-Population in den Schichten II und III in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen anstieg, während sich die Anzahl der Galanin⁺ Neurone in den Schichten IV und V nicht erhöhte.

3.4.1.2 Verlust der Expression von Kategorie B-Neuropeptiden in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen

Die Expression von Kategorie B-Neuropeptiden in exzitatorischen Neuronen wurde durch *in situ*-Hybridisierungen auf Gewebeschnitten von Wildtyp-, *Ptfla*- und *Gsx1/2*-mutanten Embryonen nachgewiesen (Abb. 3.8). Das Neuropeptid *Cck* wird nur in der dorsalen Hälfte des Rückenmarks von Wildtyp-Embryonen exprimiert und ist überwiegend auf Schicht III beschränkt (Abb. 3.8 A). In *Ptfla*-mutanten Embryonen zeigte sich eine erhöhte Anzahl von *Cck*⁺ Neuronen hauptsächlich in Schicht III des dorsalen Horns (Abb. 3.8 B), wohingegen *Cck* in *Gsx1/2*^{-/-}-Tieren nicht exprimiert wurde (Abb. 3.8 C). Tachykinin1⁺ Neurone können am Tag E18.5 nur in geringer Anzahl im dorsalen Horn nachgewiesen werden, und verteilen sich vorwiegend auf die

tiefere Schichten IV und V (Abb. 3.8 D). Die Anzahl der Tachykinin1+ Neurone war in *Ptf1a*-mutanten Embryonen ebenfalls erhöht und blieb auf die Schichten IV und V beschränkt (Abb. 3.8 E), während die Expression von Tachykinin1 in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen nicht vorhanden war (Abb. 3.8 F).

Die beiden Neuropeptide *GRP* und *PACAP* werden in Wildtyp-Tieren überwiegend in Schicht II des dorsalen Horns exprimiert (Abb. 3.8 G,J). Die Anzahl der GRP+ Neurone war in *Ptf1a*-mutanten Embryonen deutlich erhöht, und die GRP+ Neurone waren auch hier in Schicht II des dorsalen Horns lokalisiert (Abb. 3.8 H). Die Anzahl der PACAP+ Neurone war in *Ptf1a*-mutanten Embryonen erhöht, wobei in den *Ptf1a*-mutanten Embryonen viele PACAP+ Neurone nicht nur in Schicht II, sondern auch in tieferen Schichten nachgewiesen wurden (Abb. 3.8 K). Die Expression von *GRP* als auch von *PACAP* war im Rückenmark von *Gsx1/2*^{-/-}-Tieren nicht vorhanden (Abb. 3.8 I,L). Die vermehrte Anzahl von Kategorie B-Neuropeptid+ Neuronen in *Ptf1a*-mutanten Embryonen und ihre starke Reduktion in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen zeigt, dass diese Peptide präferenziell in exzitatorischen dILB-Neuronen exprimiert werden. Dabei sind

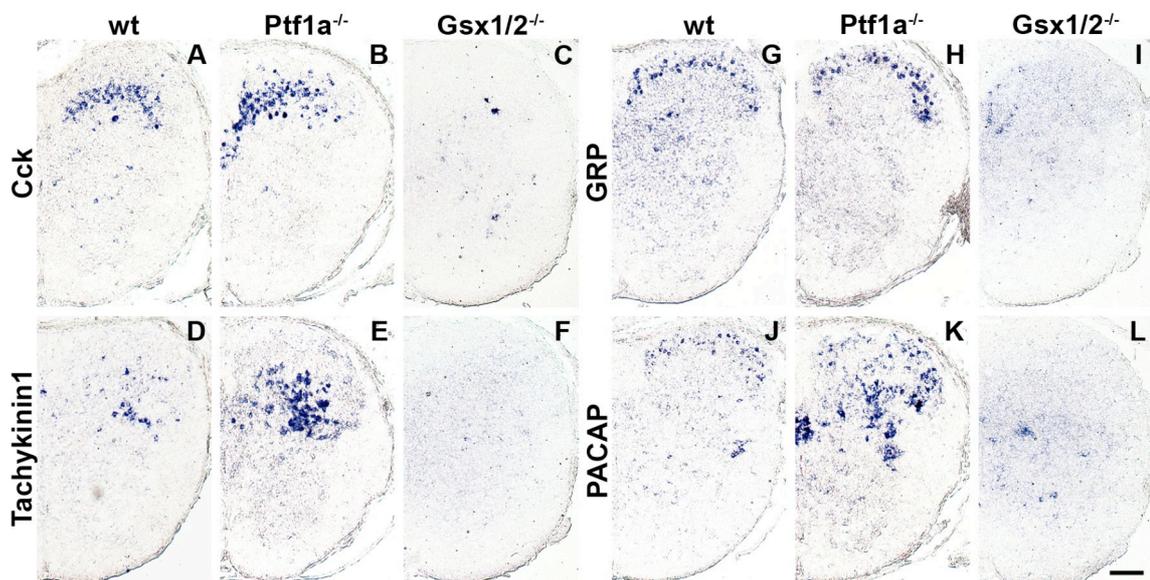


Abb. 3.8: Die Expression von Kategorie B-Neuropeptiden in exzitatorischen dILB-Neuronen. *In situ*-Hybridisierungen mit Sonden, die spezifisch für die Neuropeptide *Cck* (A,B), *Tachykinin1* (C,D), *GRP* (E,F) und *PACAP* (G,H) sind, auf Schnitten durch das Rückenmark von E18.5 Wildtyp-, *Ptf1a*^{-/-}- und *Gsx1/2*^{-/-}-Embryonen. Die Neuropeptide *Cck* und *Tachykinin1* werden in den Schichten III bzw. IV und V, *GRP* und *PACAP* dagegen in Schicht II des dorsalen Horns exprimiert (A,D,G,J). Die Anzahl der Neuropeptid+ Neurone war für alle Kategorie B-Neuropeptide in *Ptf1a*-mutanten Embryonen deutlich erhöht (B,E,H,K). Die Expression von *PACAP* weitete sich in *Ptf1a*-mutanten Embryonen auch auf tiefere Schichten des dorsalen Horns aus (K). Die Expression der vier Kategorie B-Neuropeptide war in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen nicht vorhanden (C,F,I,L). Maßstab: 100 μ m

diese Neurone in Kontroll- und in *Ptfla*-mutanten Embryonen ähnlich verteilt. Nur die Verteilung von *PACAP*⁺ Neurone ist in *Ptfla*-mutanten Embryonen nicht auf Schicht II beschränkt, sondern auf das gesamte dorsale Horn ausgedehnt.

3.4.1.3 Immunhistologischer Nachweis der Expression von Kategorie A-Neuropeptiden in inhibitorischen dILA-Interneuronen

Um die Expression von Kategorie A-Neuropeptiden weiter zu charakterisieren, wurden Färbungen für Neuropeptide mit immunhistologischen Analysen der Transkriptionsfaktoren Pax2 (dILA) bzw. Tlx3 (dILB) kombiniert (Abb. 3.9 A-O). Mit einem Antikörper gegen Prodynorphin, das Vorläuferpeptid des Neuropeptids Dynorphin, konnten am Tag E18.5 Zellkörper und Neuriten von Neuronen des dorsalen Horns angefärbt werden (Abb. 3.9 A-C). Alle Dynorphin⁺ Neurone koexprimierten Pax2, sind also inhibitorisch (Abb. 3.9 A,B); Dynorphin⁺/Tlx3⁺ Neurone konnten nicht beobachtet werden (Abb. 3.9 C). Die übrigen Kategorie A-Neuropeptide wurden mittels *in situ*-Hybridisierungen nachgewiesen (Abb. 3.9 D-O). Die Mehrzahl der Galanin⁺ Neurone koexprimierte Pax2 (Abb. 3.9 D,E), während keine Galanin⁺ Neurone gefunden wurden, die auch Tlx3 exprimierten (Abb. 3.9 F). Galanin⁺ Neurone bilden daher eine Subpopulation der inhibitorischen dILA-Neurone. Die Expression der Neuropeptid-Gene *Nociceptin*, *NPY* und *Enkephalin* war ebenfalls auf inhibitorische dILA-Neurone beschränkt. Bis auf wenige Ausnahmen exprimierten sämtliche dorsale Neurone, die mit Sonden für diese Neuropeptid-Gene angefärbt wurden, auch den dILA-spezifischen Transkriptionsfaktor Pax2 (Abb. 3.9 G,H,J,K,M,N). Dagegen konnten keine dorsalen *Nociceptin*⁺, *NPY*⁺ oder *Enkephalin*⁺ Neurone mit dem Antikörper gegen den dILB-spezifischen Transkriptionsfaktor Tlx3 angefärbt werden (Abb. 3.9 I,L,K). Diese Analysen auf zellulärer Ebene verdeutlichten, dass Kategorie A-Neuropeptide in Subpopulationen von inhibitorischen dILA-Interneuronen des dorsalen Horns exprimiert werden.

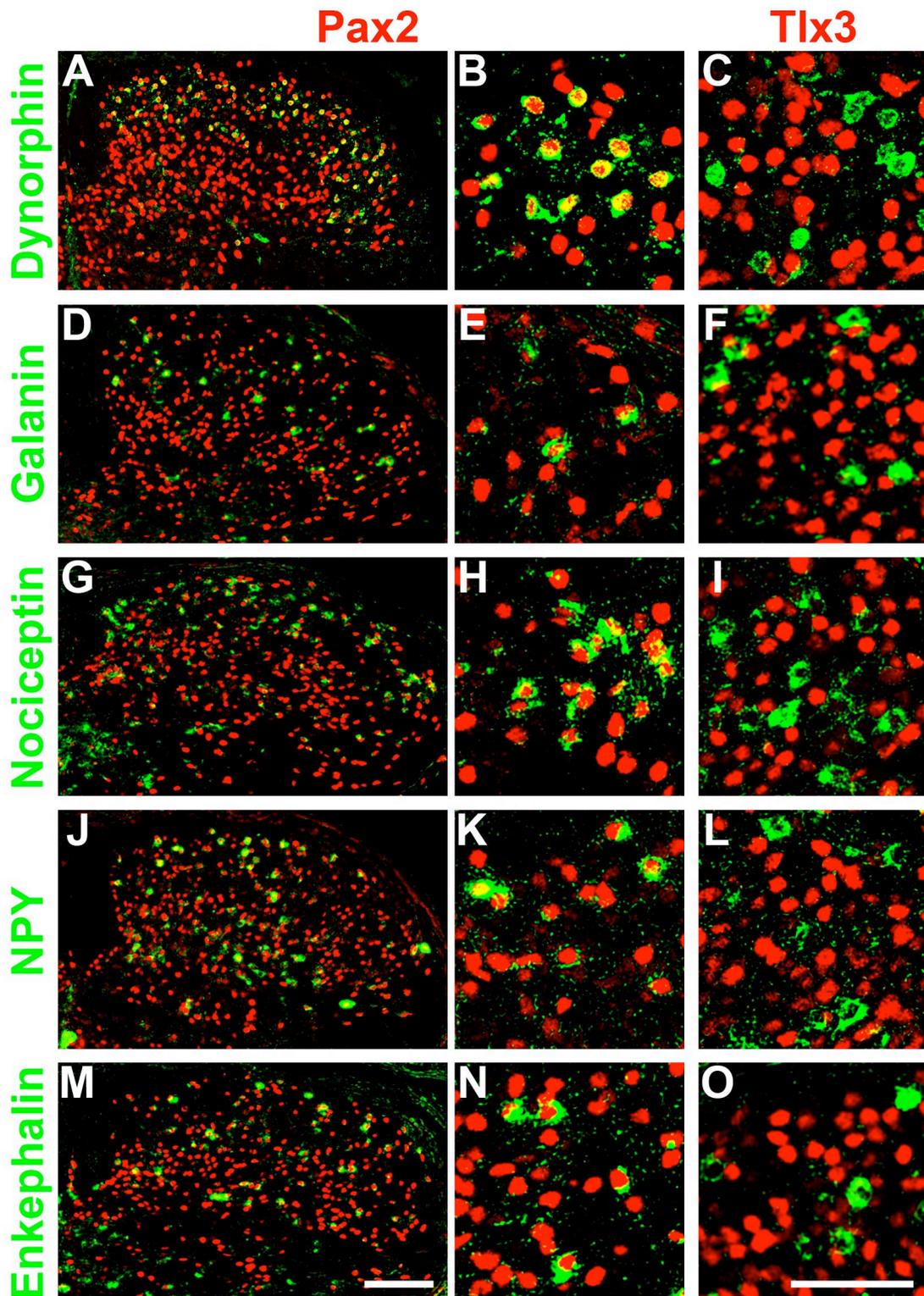


Abb. 3.9: Koexpression von Kategorie A-Neuropeptiden mit Pax2. (A-C) Immunhistologische Analyse des dorsalen Horns (E18.5) mit Antikörpern gegen Dynorphin (rot), Pax2 (grün) und Tlx3 (grün). Dynorphin+ Zellen koexprimieren den für inhibitorische Neurone spezifischen Transkriptionsfaktor Pax2 (A,B), aber nicht den für exzitatorische Neurone spezifischen Transkriptionsfaktor Tlx3 (C). (D-O) Kombination von *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden für die Neuropeptide *Galanin* (D-F), *Nociceptin* (G-I), *NPY* (J-L) und *Enkephalin* (M-O, alle grün) und immunhistologischen Färbungen der Proteine Pax2 und Tlx3 (beide rot) im dorsalen Horn (E18.5). Die Expression der vier Neuropeptide ist meist in Pax2+ inhibitorischen Neuronen und nicht in Tlx3+ exzitatorischen Neuronen zu erkennen. Maßstab: 100 μ m (M), 50 μ m (O).

3.4.1.4 Die Expression von Kategorie A-Neuropeptiden im dorsalen Rückenmark beginnt zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung

Die zuvor identifizierten Kategorie A-Neuropeptid-Gene wurden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt: solche mit frühem Expressionsbeginn, deren Expression direkt nach der Entstehung der dILA-Neurone am Tag E12.5 angeschaltet wurde, und solche mit spätem Expressionsbeginn (siehe 3.3.1.1). Die verschiedenen zeitlichen Verläufe der Neuropeptid-Expression wurden mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen verifiziert. Dazu wurden Gewebeschnitte von Embryonen vier verschiedener Entwicklungsstadien (E12.5, E14.5, E16.5 und E18.5) mit Sonden für die Neuropeptid-Gene *Dynorphin*, *Galanin*, *NPY*, *Nociceptin* und *Enkephalin* hybridisiert (Abb. 3.10).

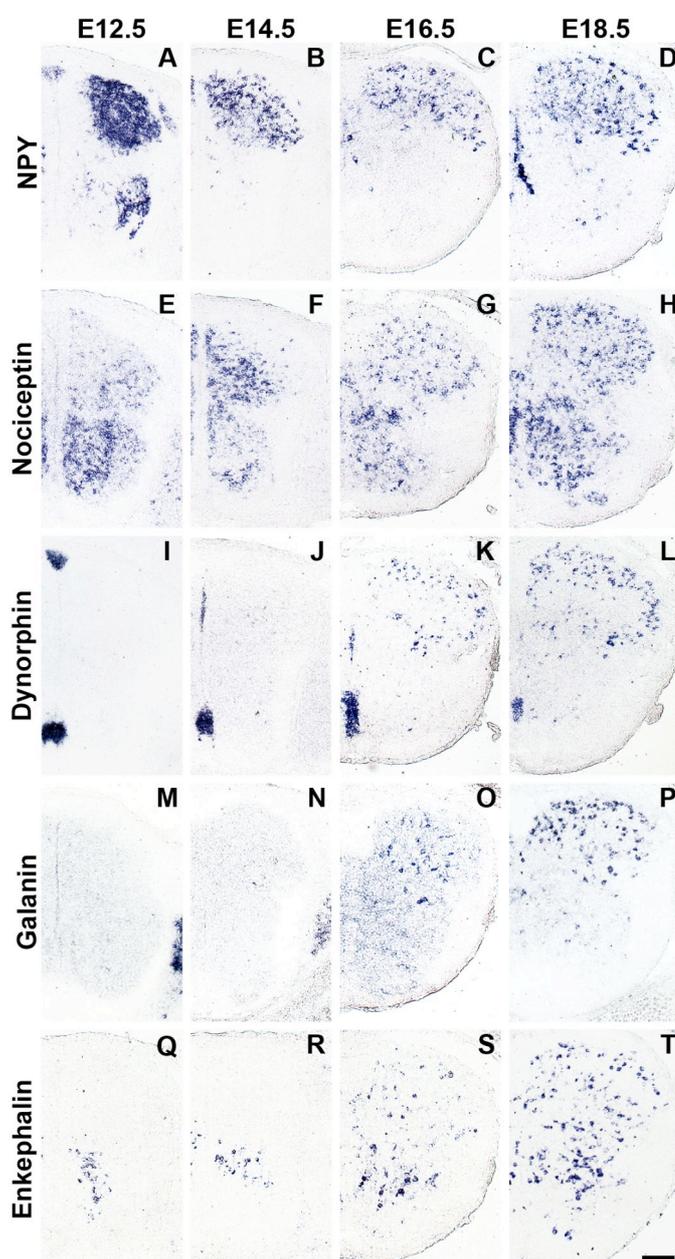


Abb. 3.10: Zeitlicher Verlauf der Expression von Kategorie A-Neuropeptiden. *In situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden gegen die Kategorie A-Neuropeptide *NPY* (A-D), *Nociceptin* (E-H), *Dynorphin* (I-L), *Galanin* (M-P) und *Enkephalin* (Q-T) auf Rückenmarksschnitten verschiedener Entwicklungsstadien (E12.5, E14.5, E16.5 und E18.5). Die beiden Neuropeptide mit frühem Beginn der Expression, *NPY* und *Nociceptin*, werden schon am Tag E12.5 exprimiert (A,E) und ihre Expression bleibt bis zum Tag E18.5 erhalten (B-D, F-H). Die Expression der Neuropeptide mit spätem Expressionsbeginn, *Dynorphin*, *Galanin* und *Nociceptin*, ist erst ab Tag E16.5 zu erkennen (K,O,S) und wird E18.5 aufrechterhalten (L,P,T). Maßstab: 100 μ m.

Die Expression von *NPY* und *Nociceptin* im dorsalen Rückenmark beginnt am Tag E12.5 und wird bis zum Tag E18.5 aufrechterhalten. Die Expression von *NPY* erscheint am Tag E12.5 am stärksten und wird im weiteren Verlauf der Entwicklung schwächer, bleibt aber bis zum Tag E18.5 bestehen (Abb. 3.10 A-D). Die Stärke der Expression von *Nociceptin* ist am Tag E12.5 eher schwach und steigert sich im Verlauf der Entwicklung (Abb. 3.10 E-H). *Dynorphin*, *Galanin* und *Enkephalin* werden am Tag E12.5 und E14.5 im dorsalen Rückenmark nicht exprimiert (Abb. 3.10 I,J,M,N,Q,R). Eine Expression dieser Neuropeptide ist erst ab Tag E16.5 zu erkennen (Abb. 3.10 K,O,S), wobei die Intensität der Expression bis zum Tag E18.5 ansteigt (Abb. 3.10 L,P,T).

3.4.2 Verifizierung der Expression der Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2* und *6* in inhibitorischen Neuronen

3.4.2.1 Expression von *Neurod1*, *2* und *6* in der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks

Die Expressionsanalyse des dorsalen Rückenmarks *Gsx1/2*-mutanter Embryonen zeigte eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2*, *6*, *Bhlhb5*, *Gbx1*, *Lhx1*, *5* und *Pax8* in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen und damit eine mögliche dILA-spezifische Expression dieser Gene. Die Expression von *Bhlhb5*, *Gbx1*, *Lhx1*, *5* und *Pax8* in inhibitorischen Neuronen wurde bereits beschrieben (siehe 3.3.2), die Expression der drei verwandten basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *Neurod2* und *Neurod6* war dagegen im dorsalen Rückenmark noch nicht genau untersucht. Deshalb habe ich die Expression dieser Gene zu verschiedenen Zeitpunkten der Rückenmarksentwicklung mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen analysiert (Abb. 3.11).

Neurod1 wird am Tag E12.5, wenn die dILA-Neurone entstehen, nur schwach im dorsalen Rückenmark exprimiert (Abb. 3.11 A). Ab Tag E13.5 verstärkt sich die Expression im sich entwickelnden dorsalen Horn (Abb. 3.11 B). Anschließend verringert sich die Expression, so dass am Tag E18.5 nur noch vereinzelte *Neurod1*+ Neurone zu erkennen sind, die sich meist in tieferen Schichten des dorsalen Horns nahe der Mittellinie befinden (Abb. 3.11 D). Der nahezu komplette Verlust der *Neurod1*-Expression im dorsalen Rückenmark von *Ptfla*-mutanten Embryonen am Tag E13.5

verdeutlichte, dass *Neurod1* präferenziell in inhibitorischen Neuronen exprimiert wird (Abb. 3.11 C).

Die dorsale Expression von *Neurod2* ist am Tag E12.5 stärker als die Expression von *Neurod1*, bleibt aber auf wenige Neurone beschränkt (Abb. 3.11 E). Die Anzahl der dorsalen *Neurod2*⁺ Neurone erhöht sich bis zum Tag E13.5 (Abb. 3.11 F) und nimmt anschließend wieder ab. Am Tag E18.5 können noch einige schwach *Neurod2*-positive Neurone angefärbt werden, die aber im Gegensatz zu den *Neurod1*⁺ Neuronen über das gesamte dorsale Horn verteilt sind (Abb. 3.11 H). In *Ptfla*-mutanten Embryonen waren am Tag E13.5 kaum *Neurod2*⁺ Neurone vorhanden, was eine präferenzielle Expression

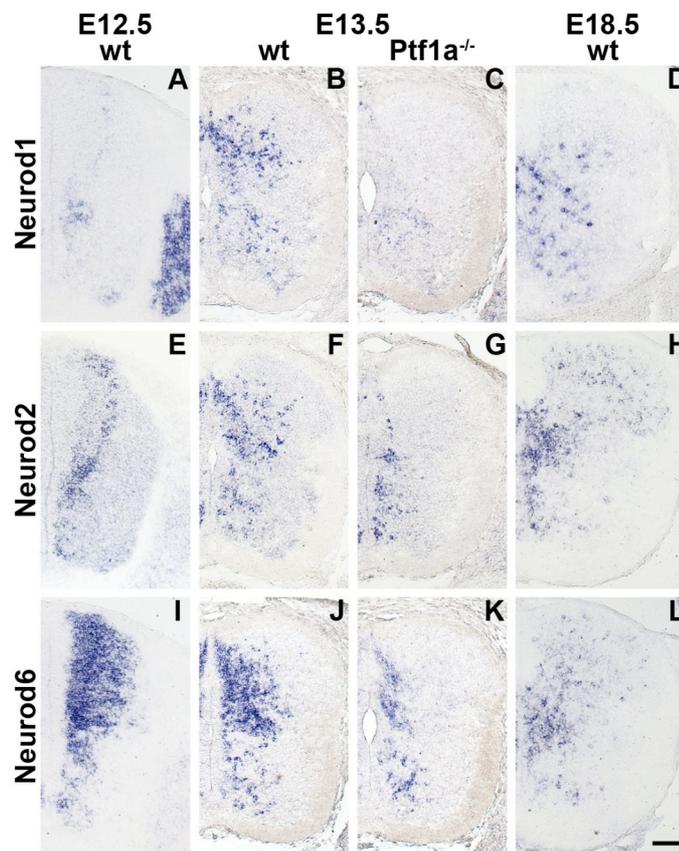


Abb. 3.11: Expression der Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2* und *6* während der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks. *In situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für die Transkriptionsfaktoren *Neurod1* (A-D), *Neurod2* (E-H) bzw. *Neurod6* (I-L) auf Schnitten von Wildtyp- und *Ptfla*-mutanten Embryonen. *Neurod1* ist im dorsalen Rückenmark am Tag E12.5 nur schwach exprimiert (A). Die Expression wird am Tag E13.5 stärker (B) und schwächt sich anschließend bis zum Tag E18.5 wieder ab (D). Am Tag E13.5 waren in *Ptfla*^{-/-}-Embryonen keine dorsalen *Neurod1*⁺ Neurone vorhanden (C). Die Expression von *Neurod2* ist am Tag E12.5 ebenfalls schwach (E) und steigert sich bis zum Tag E13.5 (F). Am Tag E18.5 sind nur wenige *Neurod2*⁺ Neurone über das dorsale Horn verteilt (H). In E13.5 *Ptfla*^{-/-}-Embryonen war die Anzahl der dorsalen *Neurod2*⁺ Neurone stark reduziert (G). *Neurod6* wird am Tag E12.5 von vielen Neuronen des dorsalen Rückenmarks exprimiert (I) und die Anzahl der *Neurod6*⁺ Neurone verändert sich bis E13.5 kaum (J), reduziert sich aber anschließend bis zum Tag E18.5 (L). Die Anzahl der dorsalen *Neurod6*⁺ Neurone war in E13.5 *Ptfla*-mutanten Embryonen reduziert, aber es waren noch einige *Neurod6*⁺ Neurone vorhanden (K). Maßstab: 100 μ m.

von *Neurod2* in inhibitorischen Neuronen nachweist (Abb. 3.11 G). *Neurod6* wird am Tag E12.5 von vielen Neuronen des dorsalen Rückenmarks exprimiert (Abb. 3.11 I). Die Anzahl der Neurod6+ Neurone verändert sich bis zum Tag E13.5 wenig, ist aber am Tag E18.5 stark reduziert (Abb. 3.11 J,L). Ähnlich den Neurod2+ Neuronen, sind am Tag E18.5 noch wenige schwach *Neurod6*-positive Neurone erkennbar, die über das gesamte dorsale Horn verteilt sind. Die Anzahl der Neurod6+ Neurone war im dorsalen Rückenmark *Ptf1a*-mutanter Embryonen am Tag E13.5 deutlich reduziert, es blieben aber noch einige Neurod6+ Neurone in den mutanten Embryonen erhalten (Abb. 3.11 K). Somit wird *Neurod6* zu einem hohen Anteil, aber nicht ausschließlich, in inhibitorischen Neuronen exprimiert. Die drei Gene *Neurod1*, *2* und *6* zeigen somit eine starke, aber transiente Expression in jungen Neuronen des dorsalen Rückenmarks, die überwiegend auf inhibitorische Neurone beschränkt ist.

3.4.2.2 Expression von Neurod1, 2 und 6 in Lhx1/5+ inhibitorischen Neuronen

Zur weiteren Charakterisierung von Neurod1+, Neurod2+ und Neurod6+ Neuronen wurden immunhistologische Analysen von Wildtyp-Embryonen durchgeführt (Abb. 3.12). Am Tag E14.5 wurde die Koexpression von Neurod1, 2 und 6 mit den Transkriptionsfaktoren Lhx1/5 bzw. Tlx3 untersucht, deren spezifische Expression in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen bekannt ist (Cheng et al., 2004 und 2005; Pillai et al., 2007).

Die immunhistologische Färbung mit einem Antikörper, der sowohl die Proteine Lhx1 als auch Lhx5 erkennt, ergab, dass der Großteil der Neurod1+ und der Neurod2+ Neurone des dorsalen Horns Lhx1/5 koexprimieren (Abb. 3.12 A,B). Dagegen können am Tag E14.5 keine Neurod1+/Tlx3+ oder Neurod2+/Tlx3+ Neurone erkannt werden (Abb. 3.12 D,E). Diese Analysen verdeutlichen den inhibitorischen Charakter der Mehrzahl der Neurod1+ und Neurod2+ Neurone. Da kein Neurod6-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde die immunhistologische Analyse dieses Proteins mit *Neurod6^{Cre}*-heterozygoten Embryonen durchgeführt (Abb. 3.12 C,F). In *Neurod6^{Cre}*-Tieren wurde die kodierende Sequenz von *Neurod6* mittels homologer Rekombination in ES-Zellen durch die kodierende Sequenz der *Cre*-Rekombinase ersetzt (Goebbels et al., 2006). In *Neurod6^{Cre/+}*-Embryonen wird das Cre-Protein unter der Kontrolle des *Neurod6*-Lokus gebildet und kann mit einem anti-Cre-Antikörper

immunhistologisch nachgewiesen werden. Im dorsalen Rückenmark der *Neurod6^{Cre/+}*-Embryonen wurde das Cre-Protein überwiegend mit Lhx1/5 koexprimiert, allerdings waren auch einige Cre⁺/Lhx1⁻ Neurone zu erkennen (Abb. 3.12 C). Die Anzahl der dorsalen Cre⁺/Tlx3⁺ Neurone war dagegen sehr gering (Abb. 3.12 F). Diese Ergebnisse bestätigen, dass Neurod6 präferenziell von inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird.

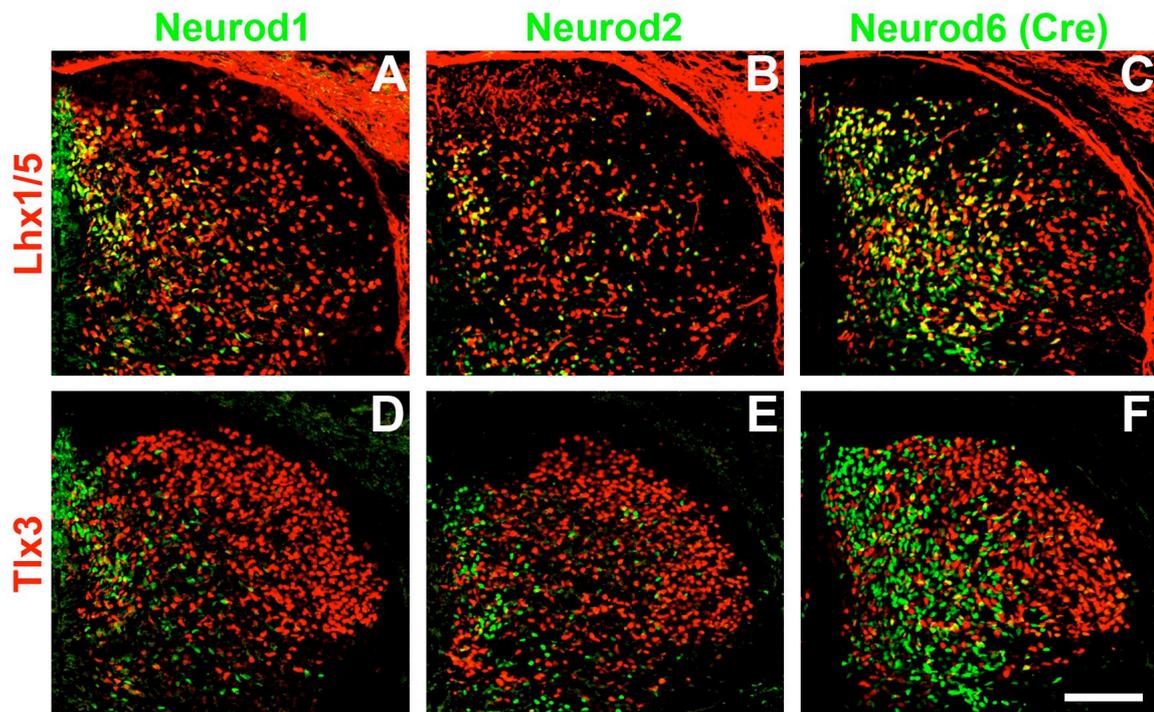


Abb. 3.12: Expression von Neurod1, 2 und 6 in Lhx1/5+ inhibitorischen dILA-Neuronen. (A-F) Immunhistologische Analyse des dorsalen Horns von E14.5 Wildtyp- (A,B,D,E) und *Neurod6^{Cre/+}*-Embryonen (C,F) mit Antikörpern gegen Neurod1, Neurod2, Cre (alle grün), Lhx1/5 und Tlx3 (beide rot). Neurod1+ Neurone koexprimieren überwiegend die dILA-spezifisch exprimierte Faktoren Lhx1/5 (A), aber nicht den dILB-spezifisch exprimierte Faktor Tlx3 (D). Neurod2 wird ebenfalls überwiegend mit Lhx1/5 koexprimiert (B) und nicht mit Tlx3 (E). Cre-Protein, das in *Neurod6^{Cre/+}*-Embryonen unter der Kontrolle des *Neurod6*-Lokus gebildet wird, zeigte zu einem großen Anteil Koexpression mit Lhx1/5 (C). Koexpression des Cre-Proteins und Tlx3 war nur in sehr wenigen Neuronen sichtbar (F). Maßstab: 100 μ m.

3.5 Kontrolle der Expression von Kategorie A-Neuropeptiden

Ich habe oben gezeigt, dass man verschiedene Subpopulationen von inhibitorischen Neuronen mittels ihrer Neuropeptid-Expression unterscheiden kann. Es stellte sich die Frage, ob die Transkriptionsfaktoren, die in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden, die Differenzierung und Diversifizierung der Neurone kontrollieren. Deshalb habe ich die GABAerge Differenzierung und die Expression von Kategorie A-Neuropeptiden in verschiedenen mutanten Mausstämmen untersucht (Abb. 3.15, 3.16

und 3.17). Zur Untersuchung von *Pax2*, *Neurod1*, 2 und 6 wurden Mausstämmen verwendet, in denen Nullmutationen durch homologe Rekombination in die entsprechenden Gene eingeführt worden waren (Torres et al., 1995; Naya et al., 1997; Goebbels et al., 2006). Außerdem wurden *Lhx1/5*-mutante Embryonen analysiert. Diese Embryonen trugen eine Nullmutation im *Lhx5*-Gen (Zhao et al., 1999). Weil *Lhx1*-mutante Embryonen früh sterben, wurde ein konditionelles *Lhx1*-Allel benutzt (Kwan und Behringer, 2002). Durch die zellspezifische Expression der *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des *Lbx1*-Lokus (Sieber et al., 2007) konnte in *Lhx1^{fllox/fllox};Lhx5^{-/-};Lbx1^{Cre}*-Tieren die kodierende Sequenz des *Lhx1*-Gens in allen *Lbx1*+ Zellen des dorsalen Rückenmarks deletiert werden. Dies führte zum Verlust der Proteine Lhx1 und Lhx5 im dorsalen Rückenmark dieser Embryonen. Die *Lhx1^{fllox/fllox};Lhx5^{-/-};Lbx1^{Cre}*-Embryonen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit vereinfacht als *Lhx1/5^{-/-}*-Embryonen bezeichnet.

3.5.1 Gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren *Pax2*, *Lhx1*, 5, *Neurod1*, 2 und 6

Um die Funktion der Transkriptionsfaktoren *Pax2*, *Lhx1*, 5, *Neurod1*, 2 und 6 zu untersuchen, habe ich zuerst analysiert, ob diese Faktoren ihre Expression im dorsalen Rückenmark gegenseitig regulieren (Abb. 3.13). Dabei zeigte sich, dass die Expression von *Pax2* in *Lhx1/5*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert war (Abb. 3.13 A,C). Umgekehrt war auch die Expression von *Lhx1* in *Pax2*-mutanten Embryonen reduziert (Abb. 3.13 E,F). Die Expression von *Pax2* und *Lhx1* war in *Neurod1/2/6*-mutanten Embryonen nicht verändert (Abb. 3.13 D,H), die Expression von *Neurod1*, 2 und 6 aber in *Pax2^{-/-}*-Embryonen deutlich reduziert (Abb. 3.13 I,J,M,N,Q,R). In *Lhx1/5*-mutanten Embryonen war dagegen nur eine geringe Reduktion der Expression von *Neurod1*, 2 und 6 zu erkennen (Abb. 3.13 K,O,S). Die Ergebnisse zeigen, dass sich *Pax2* und *Lhx1/5* gegenseitig regulieren, d.h. *Pax2* ist für die korrekte Expression von *Lhx1*, und *Lhx1/5* für die korrekte Expression von *Pax2* notwendig. Außerdem deuten diese Ergebnisse auf eine transkriptionelle Hierarchie von *Neurod1/2/6* und *Pax2* hin, d.h. *Pax2* kontrolliert (direkt oder indirekt) die Expression von *Neurod1/2/6*. Die Transkriptionsfaktoren *Lhx1/5* beeinflussen die Expression von *Neurod1/2/6* nur wenig, unter Umständen indirekt über ihre Funktion in der Kontrolle der *Pax2*-Expression.

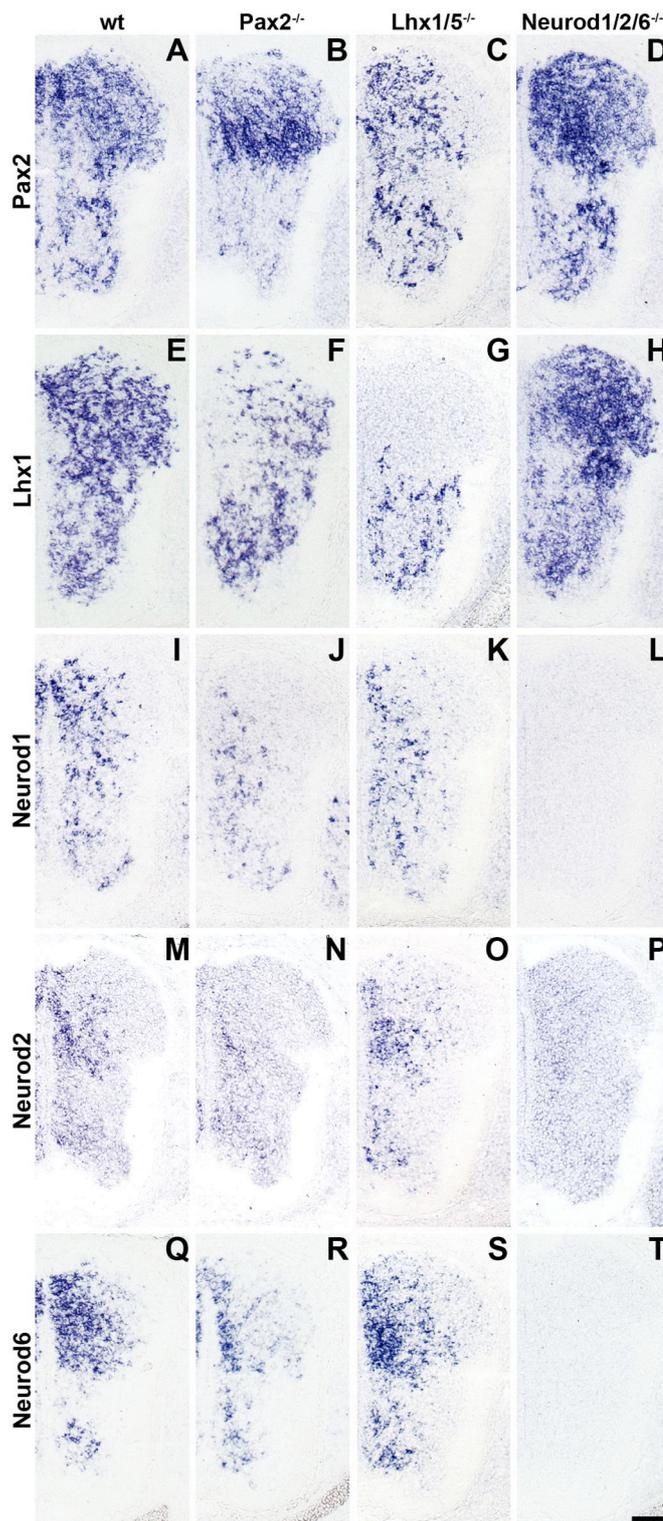


Abb. 3.13: Gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren *Pax2*, *Lhx1*, 5, *Neurod1*, 2 und 6. *In situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden gegen die Transkriptionsfaktoren *Pax2* (A-D), *Lhx1* (E-H), *Neurod1* (I-L), *Neurod2* (M-O) und *Neurod6* (Q-T) auf dem Rückenmark von E14.5 Wildtyp-, *Pax2*^{-/-}, *Lhx1/5*^{-/-} und *Neurod1/2/6*^{-/-}-Embryonen. Die dorsale Expression von *Pax2* war im Rückenmark von *Lhx1/5*-mutanten Embryonen deutlich vermindert (A,C), aber nicht im dorsalen Rückenmark von *Neurod1/2/6*-mutanten Embryonen (D). Auch die dorsale Expression von *Lhx1* war im Rückenmark von *Neurod1/2/6*-mutanten Embryonen unverändert (E,H), aber im dorsalen Rückenmark von *Pax2*-mutanten Embryonen deutlich reduziert (F). Die dorsale Expression von *Neurod1*, *Neurod2* und *Neurod6* war im Rückenmark von *Pax2*-mutanten Embryonen deutlich vermindert (I,J,M,N,Q,R), in *Lhx1/5*-mutanten Embryonen dagegen nur leicht reduziert (K,O,S). Maßstab: 100 μ m.

3.5.2 *Pax2* kontrolliert die Migration dorsaler Interneurone des Rückenmarks

Mit Hilfe einer *in situ*-Sonde gegen das *Pax2*-Transkript konnten Neurone in *Pax2*^{-/-}-Embryonen nachgewiesen werden, die den mutanten *Pax2*-Lokus exprimieren (Abb. 3.13 B). Dies war möglich, da in *Pax2*^{-/-}-Embryonen nur funktional wichtige Teile der Exone 1 und 2 des *Pax2*-Gens entfernt wurden, und die restlichen Exone in *Pax2*^{-/-}-

Embryonen noch transkribiert werden (Torres et al., 1995). Dabei fiel die im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen veränderte Verteilung der angefärbten Neurone in *Pax2*-mutanten Embryonen auf (Abb. 3.14). Am Tag E12.5 war die Anzahl der angefärbten Neurone in den *Pax2*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen nur leicht reduziert, und ihre Verteilung war ähnlich (Abb. 3.14 A,B). Am Tag E14.5 und E18.5 zeigten sich auffällige Unterschiede in der Verteilung der angefärbten Neurone (Abb. 3.14 C,D und E,F). Die Neurone, die mit Hilfe der *Pax2*-Sonde in den mutanten Embryonen nachgewiesen werden konnten, sammelten sich in tieferen Schichten des dorsalen Horns und waren nur in geringem Maße in höhere Schichten eingewandert. Dies deutet darauf hin, dass *Pax2* nicht nur die Differenzierung der dorsalen Neurone kontrolliert (siehe 3.5.3.1 und 3.5.4), sondern auch deren Migration.

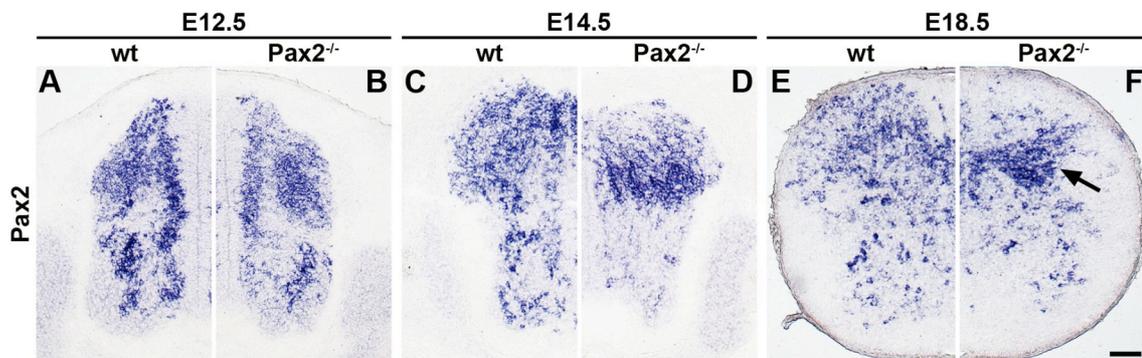


Abb. 3.14: Veränderte Migration dorsaler Neurone im Rückenmark *Pax2*-mutanter Embryonen. *In situ*-Hybridisierungen mit einer spezifischen Sonde für *Pax2*, die Transkripte vom Wildtyp- und vom mutierten *Pax2*-Lokus erkennt. (A,B) Die nachgewiesene Expression war am Tag E12.5 in *Pax2*-mutanten Embryonen geringer als in Wildtyp-Embryonen. (C,D) Am Tag E14.5 war die Expression in *Pax2*-mutanten Embryonen weiter verringert und es zeigte sich eine veränderte Verteilung der dILA-Neurone. (E,F) Am Tag E18.5 versammelten sich in *Pax2*^{-/-}-Embryonen die meisten angefärbten Neurone im ventralen Bereich des dorsalen Horns (Pfeil). Maßstab: 100 µm.

3.5.3 Differenzierung von Dynorphin+ und Galanin+ Neuronen

3.5.3.1 *Pax2* und *Neurod1/2/6* sind essenziell für die Expression von *Dynorphin* und *Galanin*

Der Transkriptionsfaktor *Pax2* kontrolliert die Differenzierung von inhibitorischen Neuronen schon zu einem frühen Zeitpunkt der neuronalen Entwicklung und steht auch in einer funktionellen Hierarchie über den Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, 2 und 6. Dies ist auch daran zu erkennen, dass in *Pax2*-mutanten Embryonen die Expression von *Gad1* im dorsalen Horn von E18.5 Embryonen fehlte und *Pax2* somit die Produktion des Neurotransmitters GABA kontrolliert (Abb. 3.15 K,L). Die Analyse des dorsalen

Horns ergab zudem, dass es in *Pax2*-mutanten Embryonen keine Dynorphin+ Neurone und im Vergleich zu Kontrolltieren nur sehr wenige Galanin+ Neurone gab (Abb. 3.15 A,B,E und F,G,J). *Pax2* kontrolliert in inhibitorischer Neuronen somit die Expression von *Gad1* und dadurch die Produktion des Neurotransmitters GABA, und darüber hinaus die Expression der Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin*.

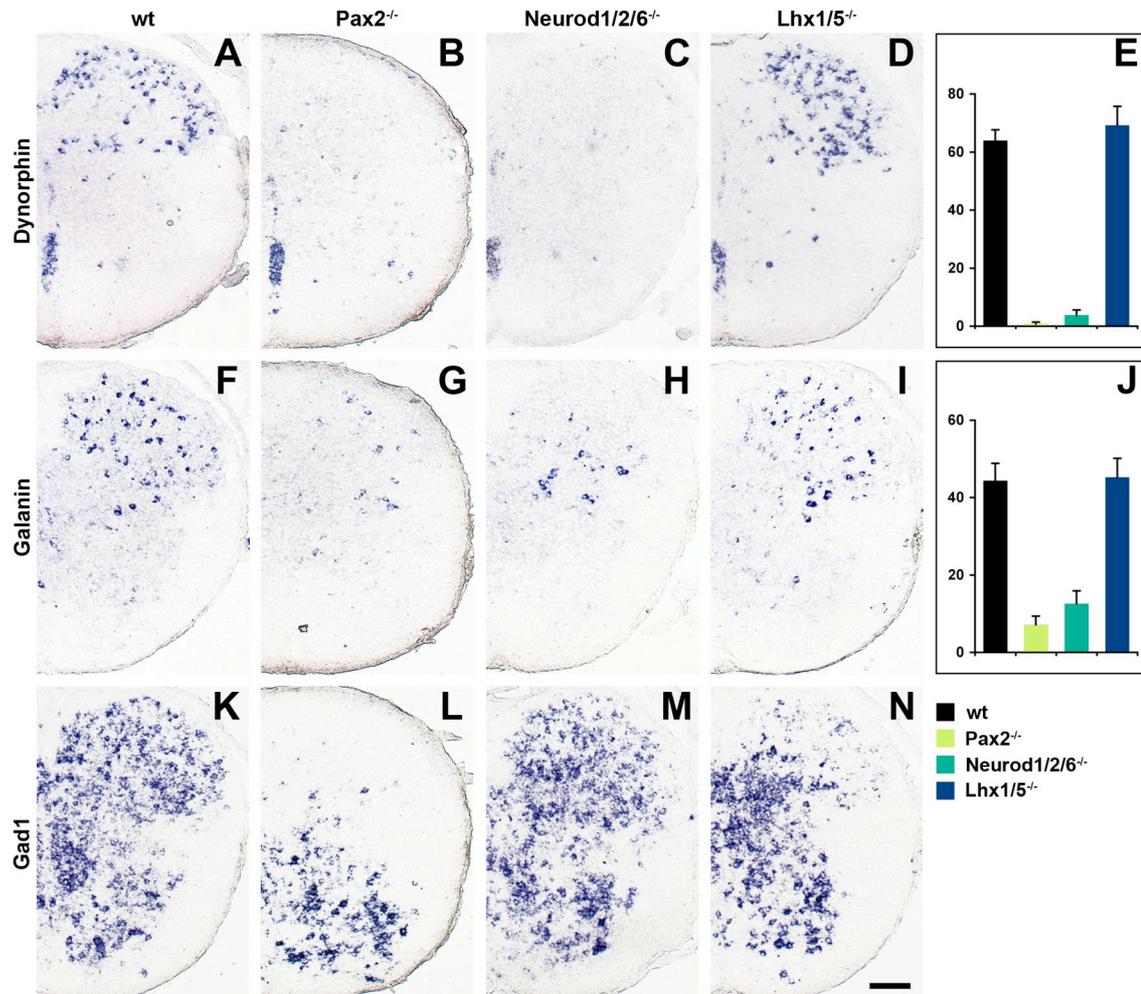


Abb. 3.15: Kontrolle der Expression von *Dynorphin* und *Galanin*. *In situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für die Neuropeptid-Gene *Dynorphin* (A-D) und *Galanin* (F-I) und den Marker inhibitorischer Neurone *Gad1* (K-N) auf dem Rückenmark von E18.5 Wildtyp-, *Pax2*^{-/-}, *Neurod1/2/6*^{-/-}- und *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen. Dynorphin+ Neurone waren in *Pax2*^{-/-} und *Neurod1/2/6*^{-/-}-mutanten Embryonen nicht vorhanden (A,B,C), die Anzahl der Dynorphin+ Neurone in *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen war dagegen unverändert (D). Die Anzahl der Galanin+ Neurone war im Rückenmark *Pax2*^{-/-} und *Neurod1/2/6*^{-/-}-mutanter Embryonen stark reduziert (F,G,H) und in *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen mit dem Wildtyp vergleichbar (I). Die dorsale Expression des Gens *Gad1* war in *Pax2*^{-/-}-Embryonen nicht vorhanden (K,L) und in *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen deutlich reduziert (N), aber in *Neurod1/2/6*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen unverändert (M). (E,F) Quantifizierung der neuronalen Subtypen, die spezifisch Neuropeptide exprimieren. Die Anzahl der Dynorphin+ (E) bzw. Galanin+ Neurone (J) des dorsalen Horns sind für die verschiedenen analysierten Genotypen dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Maßstab: 100 µm.

Lhx1 und *5* kontrollieren die Aufrechterhaltung der *Pax2*-Expression, und *Pax2* die Aufrechterhaltung der *Lhx1*- und *Lhx5*-Expression. Im dorsalen Horn *Lhx1/5*-mutanter Embryonen war die Expression von *Gad1* reduziert (Abb. 3.15 N). Dagegen war in diesen Embryonen sowohl die Anzahl der Dynorphin⁺ als auch der Galanin⁺ Neuronen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen unverändert (Abb. 3.15 D,E und I,J). Die GABAerge Identität der inhibitorischen Neuronen wird also von *Lhx1/5* beeinflusst, die Expression von *Galanin* und *Dynorphin* allerdings nicht.

Die Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2* und *6* stehen in einer funktionellen Hierarchie unterhalb von *Pax2*, aber wirken unabhängig von *Lhx1/5*. In homozygoten Embryonen, in denen *Neurod1*, *2* und *6* gleichzeitig ausgeschaltet wurden, konnte keine Veränderung in der *Gad1*-Expression festgestellt werden (Abb. 3.15 M). Allerdings konnten in diesen Embryonen keine Dynorphin⁺ Neurone nachgewiesen werden, und die Anzahl der Galanin⁺ Neurone war stark reduziert (Abb. 3.15 C,E und H,J). Die verbliebenen Galanin⁺ Neurone befanden sich in den tieferen Schichten IV und V des dorsalen Horns, während Galanin⁺ Neurone in den Schichten II und III vollkommen fehlten (Abb. 3.15 H). *Neurod1/2/6* sind somit für die Kontrolle der Produktion des inhibitorischen Neurotransmitters GABA nicht notwendig, kontrollieren aber zusammen mit *Pax2* die Expression der Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin*. Insgesamt offenbarte die Analyse des dorsalen Rückenmarks der *Pax2*^{-/-}-, *Neurod1/2/6*^{-/-}- und *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen deutliche Unterschiede in der Kontrolle der Neuropeptid- und *Gad1*-Expression in inhibitorischen Neuronen.

3.5.3.2 Redundante Funktion der *Neurod*-Faktoren

Um den Einfluss der *Neurod*-Transkriptionsfaktoren auf die Expression von *Dynorphin* und *Galanin* genauer zu analysieren, wurde die Expression der beiden Neuropeptide zusätzlich in Embryonen untersucht, die Mutationen einzelner oder verschiedener Kombinationen von *Neurod*-Genen aufwiesen. Im dorsalen Rückenmark (E18.5) von Wildtyp-, *Neurod1*-, *Neurod6*- und *Neurod1/6*-mutanten Embryonen war die Anzahl der Dynorphin⁺ und Galanin⁺ Neurone vergleichbar (Abb. 3.16 A,B,D,F,Q und I,J,L,N,R). In *Neurod2*-mutanten Embryonen konnte dagegen eine verringerte Anzahl von Dynorphin⁺ Neuronen und Galanin⁺ Neuronen festgestellt werden (Abb. 3.16 C,Q und K,R). Die Anzahl von Dynorphin⁺ und Galanin⁺ Neuronen war in *Neurod1/2*- und

Neurod2/6-mutanten Embryonen noch stärker reduziert (Abb. 3.16 E,G,Q und M,O,R). In *Neurod1/2/6*-mutanten Embryonen war der komplette Verlust der Dynorphin+ Neurone zu beobachten (Abb. 3.16 H,Q), und nur noch wenige Galanin+ Neurone befanden sich in tieferen Schichten des dorsalen Horns (Abb. 3.16 P,R). Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die homologen Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2* und *6* eine teilweise redundante Funktion in der Kontrolle der *Dynorphin*- und *Galanin*-Expression besitzen.

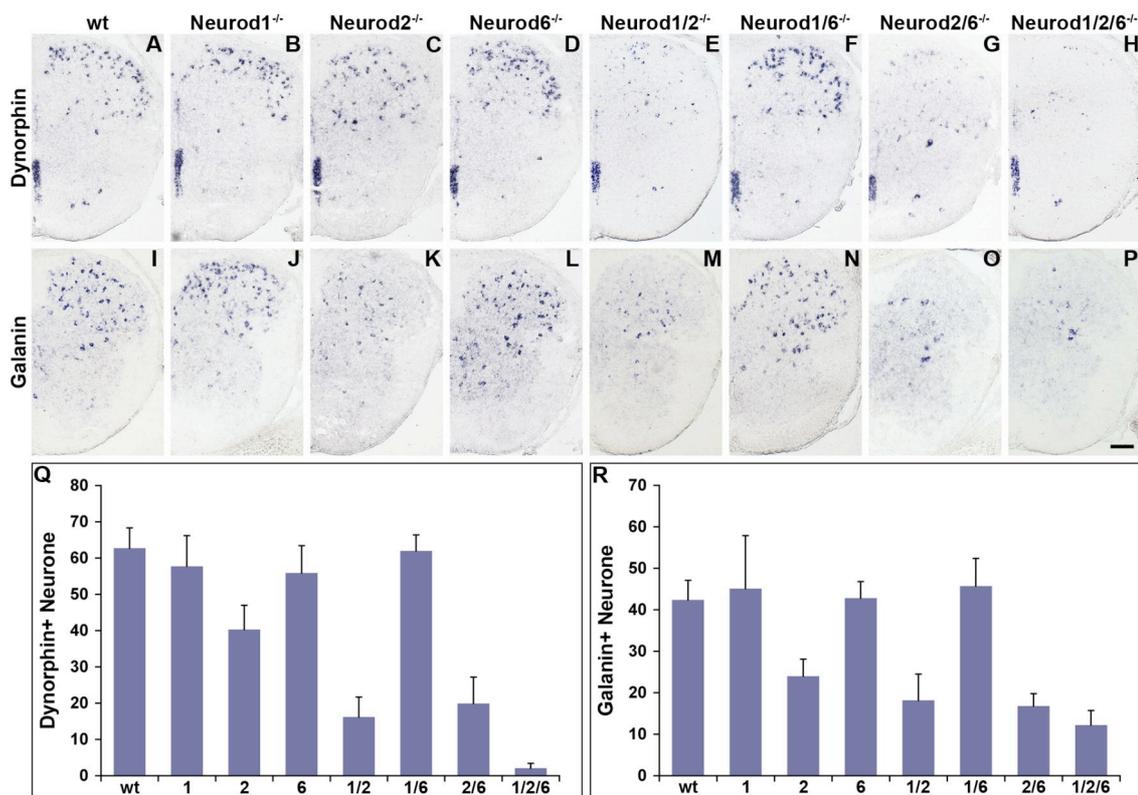


Abb. 3.16: Kontrolle der Expression von *Dynorphin* und *Galanin* durch *Neurod1/2/6*. *In situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für die Neuropeptid-Gene *Dynorphin* (A-H) und *Galanin* (I-P) auf Rückenmarksschnitten von E18.5 Wildtyp- und verschiedenen *Neurod*-mutanten Embryonen. Die Anzahl der Dynorphin+ Neurone war vergleichbar in Wildtyp-, *Neurod1*-, *Neurod6*- und *Neurod1/6*-mutanten Embryonen (A,B,D,F), in *Neurod2*-, *Neurod1/2*- und *Neurod2/6*-mutanten Embryonen dagegen reduziert (C,E,G). Ein kompletter Verlust der *Dynorphin*-Expression wurde in *Neurod1/2/6*-mutanten Embryonen beobachtet (H). Die Anzahl der Galanin+ Neurone war ebenfalls in Wildtyp-, *Neurod1*-, *Neurod6*- und *Neurod1/6*-mutanten Embryonen unverändert (I,J,L,N) und in *Neurod2*-, *Neurod1/2*- und *Neurod2/6*-mutanten Embryonen reduziert (K,M,O). In *Neurod1/2/6*-mutanten Embryonen konnten nur noch wenige Galanin+ Neurone in tiefen Schichten des dorsalen Horns nachgewiesen werden (P). (Q,R) Quantifizierung der neuronalen Subtypen, die spezifisch *Dynorphin* (Q) oder *Galanin* (R) exprimieren. Die ermittelten Zellzahlen der Neuropeptid+ Neurone sind für die verschiedenen Mutanten dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Maßstab: 100 μ m.

3.5.4 Differenzierung von Enkephalin+, NPY+ und Nociceptin+ Neuronen

Auch die Expression von *Enkephalin*, *NPY* und *Nociceptin* wurde im dorsalen Horn von *Pax2*^{-/-}, *Neurod1/2/6*^{-/-} und *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen mittels *in situ*-Hybridisierungen untersucht. Am Tag E18.5 entsprach die Anzahl der dorsalen Enkephalin+ Neurone in *Pax2*-mutanten Embryonen der Anzahl in Wildtyp-Embryonen. Allerdings gab es in *Pax2*-mutanten Embryonen eine Ansammlung von Enkephalin+ Neuronen im lateralen Bereich des dorsalen Horns (Abb. 3.17 A,B,E). Dies deutet darauf hin, dass *Pax2* für die korrekte Migration von Enkephalin+ (und anderen inhibitorischen Neuronen; siehe 3.5.2) essenziell ist. Die Anzahl sowohl der NPY+ als auch der Nociceptin+ Neurone war dagegen reduziert (Abb. 3.17 F,G,J und K,L,O). *Pax2* kontrolliert somit nicht nur gemeinsam mit *Neurod1/2/6* die Expression der Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin*, sondern partizipiert unabhängig von *Neurod1/2/6* auch an der Kontrolle der *NPY*- und *Nociceptin*-Expression.

In *Lhx1/5*-mutanten Embryonen waren fast keine NPY+ Neurone vorhanden, und die Anzahl der Enkephalin+ Neurone war deutlich reduziert (Abb. 3.17 D,E und I,J). Die Anzahl der Nociceptin+ Neurone entsprach in *Lhx1/5*-mutanten Embryonen der Anzahl in Wildtyp-Embryonen, allerdings erschien die Verteilung der Nociceptin+ Neurone verändert. Es konnten in diesen Embryonen weniger Nociceptin+ Neurone in den oberen Schichten des dorsalen Horns nachgewiesen werden, dafür befanden sich vermehrt Nociceptin+ Neurone in tieferen Schichten, in der Nähe der Mittellinie (Abb. 3.17 N,O). Dies deutet ebenfalls auf eine leicht veränderte Migration der Nociceptin+ Neuronen in *Lhx1/5*-mutanten Embryonen hin. Diese Veränderung der Migration von dorsalen, inhibitorischen Interneuronen in *Lhx1/5*-mutanten Embryonen konnte auch durch *in situ*-Hybridisierungen mit einer Sonde gegen *Gad1* beobachtet werden (siehe Abb. 3.15 N). *Lhx1/5* kontrollieren also die Expression von *Enkephalin* und *NPY*, wobei diese Kontrolle der Neuropeptid-Expression größtenteils unabhängig von *Pax2* erscheint. *Lhx1* und *Lhx5* wirken dabei redundant, da sich sowohl in *Lhx1*- als auch in *Lhx5*-mutanten Embryonen kein Unterschied in der Anzahl der dorsalen Enkephalin+ oder NPY+ Neurone ergab (Daten nicht gezeigt).

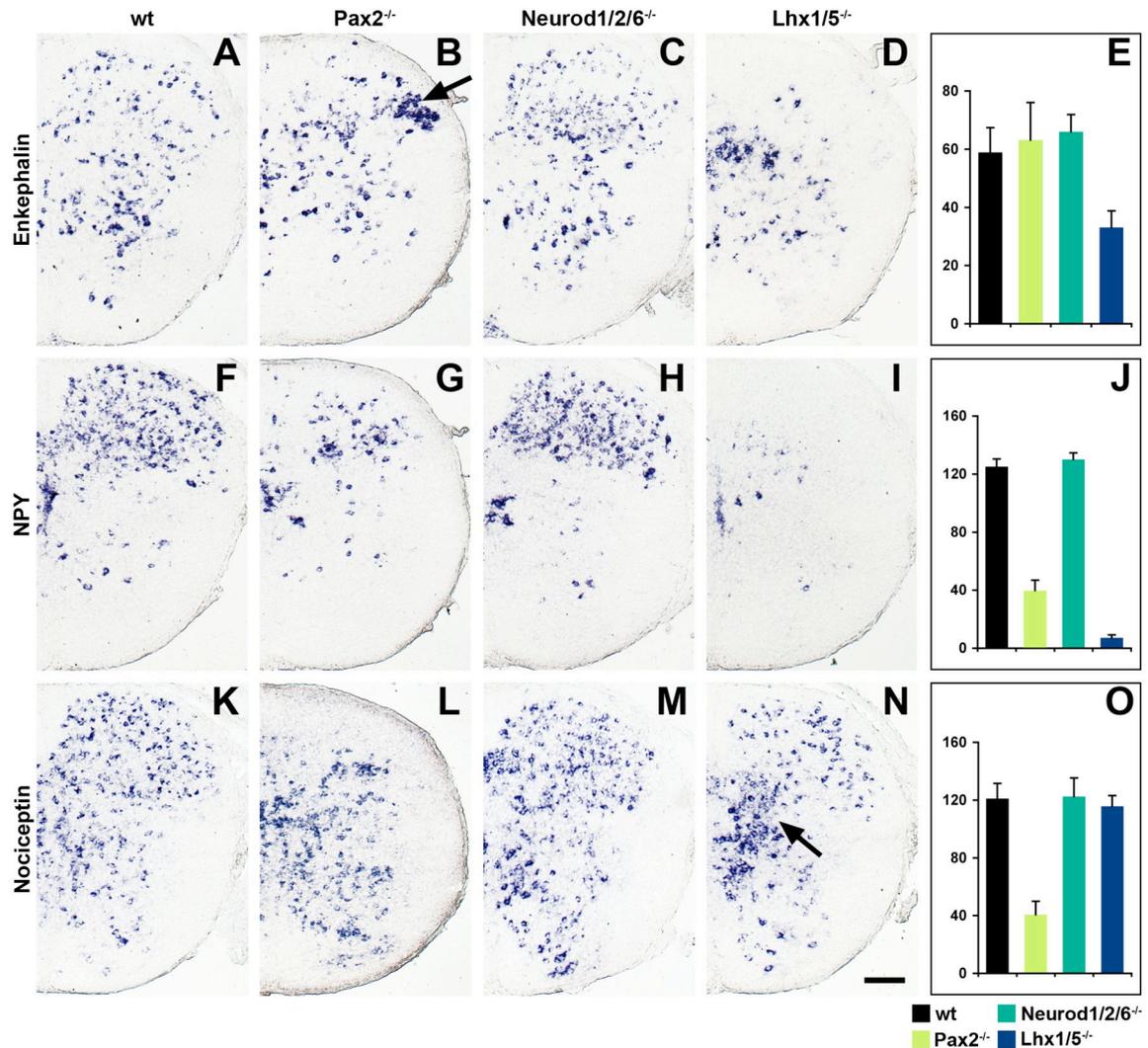


Abb. 3.17: Kontrolle der Expression von *Enkephalin*, *NPY* und *Nociceptin*. *In situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für *Enkephalin* (A-D), *NPY* (F-I) und *Nociceptin* (K-N) auf Schnitten durch das Rückenmark von E18.5 Wildtyp-, *Pax2*^{-/-}-, *Neurod1/2/6*^{-/-}- und *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen. Die Anzahl der dorsalen Enkephalin+ Neurone war in *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen reduziert (A,D), während sich in *Pax2*-mutanten Embryonen viele Enkephalin+ Neurone im lateralen dorsalen Horn sammelten (Pfeil in B). NPY+ Neurone waren in *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen nicht vorhanden (F,I) und ihre Anzahl war in *Pax2*^{-/-}-Embryonen reduziert (G). Die Anzahl der Nociceptin+ Neurone war ebenfalls in *Pax2*^{-/-}-Embryonen deutlich reduziert (K,L), in *Lhx1/5*^{-/-}-Embryonen sammelten sich vermehrt Nociceptin+ Neurone im medio-ventralen Bereich des dorsalen Horns (Pfeil in N). Die Anzahl der dorsalen Enkephalin+ (E), NPY+ (J) bzw. Nociceptin+ Neurone (O) sind für die verschiedenen analysierten Genotypen dargestellt, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen. Maßstab: 100 μ m.

In *Neurod1/2/6*^{-/-}-Embryonen war die Anzahl und die Verteilung der dorsalen Enkephalin+, NPY+ und Nociceptin+ Neurone im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen nicht verändert (Abb. 3.17 C,E und H,J und M,O). *Neurod1/2/6* kontrollieren somit nur die Expression bestimmter Neuropeptide, nämlich der Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin*, während die Expression anderer Neuropeptide (*Enkephalin*, *NPY*, *Nociceptin*) und die Spezifizierung des Neurotransmitter-Phänotyps (*Gad1*-Expression) unabhängig von *Neurod1/2/6* erfolgt.