

4 Diskussion

Das dorsale Rückenmark verarbeitet sensorische Reize unterschiedlicher Modalitäten und leitet sie an höhere Zentren des zentralen Nervensystems weiter (Gillespie und Walker, 2001; Julius und Basbaum, 2001). Diese komplexen Funktionen werden von einer Vielzahl sowohl morphologisch als auch physiologisch unterschiedlicher Nervenzellen vermittelt (Rexed et al., 1952; Brown und Fyffe, 1981). Diese Neurone entstehen während der Embryonalentwicklung der Maus im dorsalen Rückenmark, wie diese neuronale Diversität entsteht, ist allerdings unklar.

Verschiedene Nervenzellen nutzen unterschiedliche Neurotransmitter, die sie für die synaptische Erregungsübertragung einsetzen. Im dorsalen Rückenmark werden zwei Neuronentypen schon früh in der Entwicklung spezifiziert: inhibitorische (GABAerge) dILA- und exzitatorische (glutamaterge) dILB-Neurone. Die überwiegende Mehrzahl der Nervenzellen, die im fertig entwickelten dorsalen Horn lokalisiert sind, entsteht aus diesen zwei Neuronentypen. Während der Maturierung diversifizieren diese beiden Neuronentypen in verschiedene Subpopulationen, die unterschiedliche Neuropeptide produzieren. Die Neuropeptide sind für die Modulation der sensorischen Information von Bedeutung und wurden vor allem wegen ihrer wichtigen Funktion in der Schmerzempfindung untersucht (Todd et al., 1992; Rowan et al., 1993; Todd und Spike, 1993; Simmons et al., 1995; Hökfelt et al., 2000; Todd et al., 2003). Die molekularen Mechanismen, die Maturierung und Diversifizierung der Neurone kontrollieren und die Expression der Neuropeptide steuern, sind allerdings noch weitgehend unbekannt und sollten im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Mit Hilfe einer genomweiten Expressionsanalyse konnte ich Gene identifizieren, die spezifisch in inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen des dorsalen Rückenmarks exprimiert werden. Dazu setzte ich mutante Mausstämme ein, in denen entweder die inhibitorischen oder die exzitatorischen Neurone nicht gebildet werden. Unter anderem identifizierte ich Neuropeptide, und konnte zeigen, dass alle identifizierten Neuropeptide entweder in der inhibitorischen oder in der exzitatorischen Population vorkommen. Zusätzlich identifizierte ich mehrere Transkriptionsfaktoren, die in den inhibitorischen Neuronen ausgeprägt wurden, und zeigte, dass diese die Maturierung und Neuropeptid-Expression in inhibitorischen Neuronen des dorsalen Horns

kontrollieren. Die identifizierten Transkriptionsfaktoren bilden ein regulatorisches Netzwerk, das die Produktion des Neurotransmitters GABA und die Neuropeptid-Expression in einer koordinierten Art und Weise kontrolliert. Durch die Mutation einzelner Faktoren konnte aber Neurotransmitter-Produktion und Neuropeptid-Expression voneinander entkoppelt werden.

4.1 Veränderte Genexpression im dorsalen Rückenmark *Gsx1/2*-mutanter Embryonen

Die Mechanismen der Differenzierung von Nervenzellen des dorsalen Rückenmarks sind bisher nur teilweise verstanden. Zum Ersten fehlen molekulare Marker, um die vielen verschiedenen Typen von Nervenzellen, die durch morphologische und physiologische Experimente definiert wurden, zu unterscheiden (Caspary und Anderson, 2003; Zhuang und Sockanathan, 2006). Zum Zweiten sind die Faktoren nicht bekannt, die Differenzierung der dorsalen Neurone und deren Diversifizierung in verschiedene Subtypen kontrollieren. Systematische Analysen der Genexpression könnten die fehlende Information liefern, sind allerdings durch die Koexistenz vieler verschiedener Populationen von Nervenzellen kompliziert (Sun et al., 2002; Li et al., 2006). Wegen der Heterogenität und Komplexität kann erwartet werden, dass Transkripte, die nur in bestimmten Subpopulationen der maturierenden Neurone auftreten, nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind. Vom entwicklungsbiologischen Standpunkt betrachtet, ist das dorsale Horn aber einfach aufgebaut, da die überwiegende Mehrheit der Neurone von zwei neuronalen Subtypen gebildet wird, die durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Pax2* und *Lhx1/5* bzw. *Tlx3* und *Lmx1b* charakterisiert werden, und die zu inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen differenzieren (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Cheng et al., 2004 und 2005). Die geringe entwicklungsbiologische Komplexität hat es mir ermöglicht, Genexpression im dorsalen Horn systematisch zu analysieren, und erfolgreich Gene zu identifizieren, die während der Maturierung entweder in inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen exprimiert werden.

4.2 Spezifische Expression von Neuropeptiden in Subtypen von inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen

Genomweite Expressionsanalysen wurden eingesetzt, um die Expression von Transkripten im dorsalen Rückenmark von Kontroll- und *Gsx1/2*-mutanten Embryonen nachzuweisen. Durch einen Vergleich der Expressionsdaten konnten differenziell exprimierte Gene identifiziert werden. Im dorsalen Rückenmark *Gsx1/2*-mutanter Mäuse wird eine vermehrte Anzahl inhibitorischer Neurone, aber es werden keine exzitatorischen Neurone gebildet (Mizuguchi et al., 2006). Gene, die in inhibitorischen, aber nicht in exzitatorischen Neuronen exprimiert werden, sollten demnach in den *Gsx1/2*-mutanten Embryonen ein höheres Expressionsniveau als in Kontrolltieren zeigen. Transkripte, die in exzitatorischen, aber nicht in inhibitorischen Neuronen vorhanden sind, sollten in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen in geringerer Menge auftreten. Diese Vorgehensweise erlaubte mir die Identifizierung von Genen, die spezifisch in inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen exprimiert werden. Darüber hinaus konnte ich sogar Transkripte identifizieren, die nur in kleinen Subpopulationen inhibitorischer oder exzitatorischer Nervenzellen vorhanden waren. Eine Gruppe von Genen, die ich so identifizierte, kodieren für Neuropeptide. Insgesamt konnte ich die

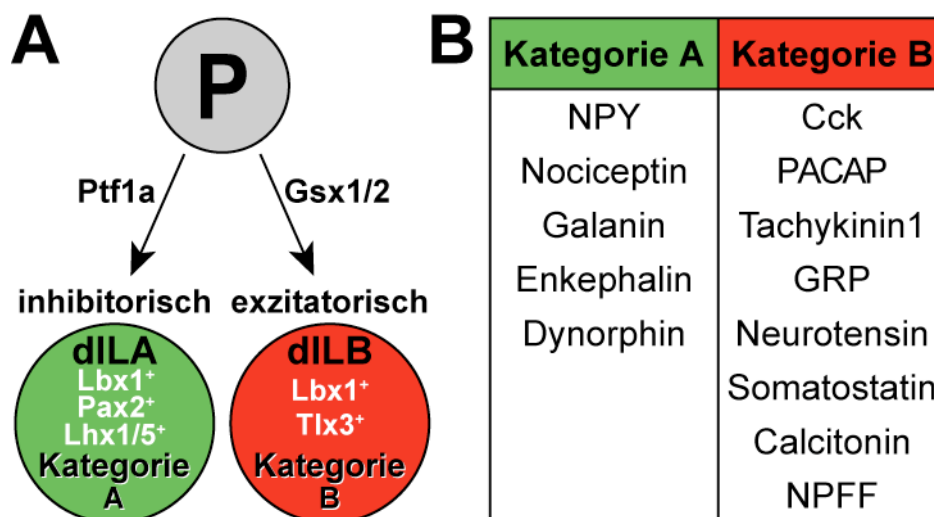


Abb. 4.1: Expression von Kategorie A- bzw. Kategorie B-Neuropeptiden in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen. (A) Schematische Darstellung der Entstehung von differenzierten dILA- und dILB-Neuronen aus einer undifferenzierten Vorläuferzelle. Aus der Vorläuferzelle (P) entwickeln sich inhibitorische dILA-Neurone unter der Kontrolle von *Ptf1a* und exzitatorische dILB-Neurone unter der Kontrolle von *Gsx1/2*. Inhibitorische Neurone exprimieren Kategorie A-Neuropeptide sowie die Transkriptionsfaktoren *Lbx1*, *Pax2* und *Lhx1/5*, während exzitatorische Neurone Kategorie B-Neuropeptide und die Transkriptionsfaktoren *Lbx1* und *Tlx3* exprimieren. (B) Zusammenfassung der Neuropeptid-Gene, die mittels genomweiter Expressionsanalyse des dorsalen Horns *Gsx1/2*-mutanter Embryonen als Kategorie A- oder B-Neuropeptide klassifiziert werden konnten.

Expression von dreizehn verschiedenen Neuropeptiden nachweisen, die alle entweder inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen zugeordnet werden konnten (Abb. 4.1). Dass alle im dorsalen Rückenmark vorhandenen Neuropeptide entweder in inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronentypen exprimiert werden, war unerwartet. Neuropeptide, die in inhibitorischen Neuronen vorkommen, ordnetet ich in die Kategorie A ein, und solche, die in exzitatorischen Neuronen vorkommen, in die Kategorie B.

Der Nachweis der Expression von Neuropeptiden in inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen wird durch die unterschiedliche Lokalisierung von Proteinen innerhalb einer Nervenzelle erschwert. Einige Marker dieser Neurone sind Transkriptionsfaktoren wie z.B. Pax2 oder Tlx3 und befinden sich im Zellkern, während Neuropeptide und Neurotransmitter cytoplasmatisch oder in den Fortsätzen der Zellen, z.B. an den Synapsen, lokalisiert sind. Nur für einige wenige Neuropeptide wurde zuvor eine Expression in inhibitorischen oder exzitatorischen Neuronen des dorsalen Horns nachgewiesen, z.B. war die Koexpression von *NPY* und *Enkephalin* mit GABA und die Koexpression von *Tachykinin1* mit *vGlut2* beschrieben (Todd et al., 1992; Rowan et al., 1993; Polgár et al., 1999). Zu meinen Daten teilweise konträre Beobachtungen wurden in früheren Untersuchungen zur Expression des Neuropeptid-Gens *Enkephalin* publiziert. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass Enkephalin-Protein überwiegend in inhibitorischen Neuronen, aber auch in exzitatorischen Neuronen in Schicht I und II des dorsalen Horns vorkommt (Todd et al., 1992; Todd et al., 2003). Es ist somit nicht auszuschließen, dass Enkephalin in der späten fötalen Entwicklung in inhibitorischen Neuronen, und im erwachsenen Tier zusätzlich in einer kleinen Gruppe exzitatorischer Neurone auftritt (siehe auch unten).

Auch die Expression von *Galanin* in GABAergen Neuronen des dorsalen Rückenmarks wurde durch frühere Untersuchungen beschrieben (Todd et al. 1992; Simmons et al., 1995). In der durchgeführten Microarray-Expressionsanalyse waren *Galanin*-Transkripte allerdings in nur sehr geringer Menge vorhanden, und ähnliche Mengen der Transkripte wurden in Kontroll- und *Gsx1/2*-mutanten Tieren beobachtet. Die experimentell ermittelten Expressionsstärken von *Galanin* wurden deshalb mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) und mittels *in situ*-Hybridisierungen kontrolliert. Diese Analysen zeigten, dass *Galanin* in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen im

Vergleich zu Kontrolltieren verstärkt exprimiert wird. Galanin konnte somit in die Kategorie A der Neuropeptide eingeordnet werden. Dass das Expressionsniveau eines Gens durch die Microarray-Technik nicht korrekt erkannt wird, kann in Einzelfällen vorkommen und beruht auf der Auswahl der Sequenzen, die das entsprechende Gen auf dem Microarray repräsentieren. Sind die Sequenzen nicht optimal, verläuft die Hybridisierung der cRNA mit den Sonden auf dem Microarray nicht spezifisch (Konishi, 2006).

Die Einordnung der Neuropeptide in Kategorie A und B (d.h. die Expression der entsprechenden Gene in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen) wurde durch *in situ*-Hybridisierungen bestätigt. Dazu wurden neben *Gsx1/2*- auch *Ptf1a*-mutante Embryonen untersucht. In *Ptf1a*-Mutanten werden im dorsalen Rückenmark keine inhibitorischen Neurone, und stattdessen exzitatorische Neurone in vermehrter Anzahl gebildet (Glasgow et al., 2005). *Ptf1a*- und *Gsx1/2*-mutante Mäuse zeigen also komplementäre Phänotypen. Im Vergleich zu Kontrolltieren war die dorsale Expression von Kategorie A-Neuropeptiden in *Ptf1a*-mutanten Embryonen deutlich reduziert, und in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen verstärkt. Kategorie B-Neuropeptide zeigten dagegen eine verstärkte dorsale Expression in *Ptf1a*-mutanten Embryonen und wurden in *Gsx1/2*-mutanten Embryonen nicht exprimiert. Dies bestätigt die differenzielle Expression der Kategorie A- und B-Neuropeptide in inhibitorischen bzw. exzitatorischen Neuronen, und verdeutlicht die im Allgemeinen korrekte Identifizierung differenziell exprimierter Gene durch die Microarray-Expressionsanalyse.

4.3 Die Expression von verschiedenen Neuropeptiden erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung

Die genomweite Expressionsanalyse erlaubte mir auch, Neuropeptid-Gene anhand ihres Expressionsbeginns zu unterscheiden und sie in zwei Gruppen mit frühem oder spätem Expressionsbeginn einzuteilen. Auch diese Unterteilung von Kategorie A-Neuropeptiden wurde durch *in situ*-Hybridisierungen verifiziert. Die früh exprimierten Neuropeptide *NPY* und *Nociceptin* konnten schon ab Tag E12.5 im dorsalen Horn nachgewiesen werden, während die spät exprimierten Neuropeptide *Dynorphin*, *Galanin* und *Enkephalin* erst ab Tag E16.5 vorhanden waren. Der unterschiedliche Beginn der Expression deutet darauf hin, dass die Expression von verschiedenen Neuropeptiden

nicht durch einen gemeinsamen Faktor kontrolliert wird, sondern dass unterschiedliche Faktoren die Expression kontrollieren.

Meine Untersuchungen beschränkten sich auf fötale Entwicklungsstadien, und endeten am Tag E18.5 kurz vor der Geburt. *Gsx1/2*-mutante Embryonen sterben wenige Stunden nach der Geburt, da ihre Atmung nicht normal funktioniert, und können deshalb zu späteren Entwicklungsstadien nicht mehr analysiert werden (Li et al., 1996; Szucsik et al., 1997). Bis zum Tag E18.5 werden im dorsalen Horn viele Neuronentypen ausgebildet, die sich durch die Expression von Neuropeptiden unterscheiden. Die Entwicklung des Rückenmarks ist aber mit der Geburt nicht vollkommen abgeschlossen, und vor allem inhibitorische Neurone können sich in der postnatalen Entwicklungsphase noch weiter verändern. Ein gut untersuchtes Beispiel dafür ist die inhibitorische Wirkung des Neurotransmitters GABA, die erst eine Woche nach der Geburt voll ausgeprägt ist. Zu diesem Zeitpunkt verändert sich in diesen Neuronen die Expression von Transporterproteinen, was zu einer Umkehrung des Chloridgradienten über die Zellmembran führt. Dadurch wird die zuvor noch exzitatorische Funktion von GABA zu einer inhibitorischen Funktion umkehrt (Ben-Ari, 2002; Baccei und Fitzgerald, 2004; Cordero-Erausquin et al., 2005). Es ist deshalb denkbar, dass weitere Reifungsprozesse, die auch die Expression von Neuropeptiden modulieren, in der postnatalen Entwicklungsphase stattfinden. Zudem ist noch unklar, ob alle Neurone, die anfangs einen inhibitorischen Phänotyp zeigen und *Gad1* exprimieren, ihre inhibitorischen Charakteristika beibehalten oder ob der inhibitorische bzw. exzitatorische Phänotyp einer gewissen Plastizität unterliegt.

4.4 Zellautonome Regulation der Differenzierung

Die Differenzierung der inhibitorischen Neurone, die spezifisch Kategorie A-Neuropeptide exprimieren, verläuft weitgehend unabhängig von Signalen der exzitatorischen Neurone (dies gilt umgekehrt auch für exzitatorische Neurone). So werden Kategorie A-Neuropeptide generell in den *Gsx1/2*-mutanten Embryonen, die keine exzitatorischen Neurone bilden, exprimiert. In diesen mutanten Embryonen werden vermehrt inhibitorische Neurone gebildet, und interessanterweise ist auch die Anzahl der Neurone, die Kategorie A-Neuropeptide exprimieren, erhöht. Ebenso konnten im umgekehrten Fall alle Kategorie B-Neuropeptide in *Ptf1a*-mutanten

Embryonen nachgewiesen werden. Die erhöhte Anzahl von exzitatorischen Neuronen in dieser Mutante korreliert auch hier mit einer Erhöhung der Neuropeptid-positiven Neurone. Dies könnte darauf hinweisen, dass zellautonome Prozesse für die Kontrolle der Neuropeptid-Expression wichtig sind. Allerdings könnten auch Signale, die von Zellen außerhalb des Rückenmarks stammen, die Differenzierung kontrollieren. So sind zum Zeitpunkt, an dem die Expression der spät exprimierten Neuropeptide beginnt, schon sensorische Fasern in das dorsale Horn eingewachsen, und diese könnten Differenzierungssignale liefern (Ozaki und Snider, 1997). Außerdem wäre es möglich, dass z.B. früh geborene inhibitorische Neurone Signale produzieren, die das Zellschicksal der später geborenen inhibitorischen Neurone beeinflussen. Solch ein Rückkopplungsprozess konnte z.B. während der Entwicklung von Ganglionzellen der Retina beobachtet werden. Hier produzieren früh gebildete Neurone den Faktor GDF11, der anschließend die Differenzierung der später entstehenden Neurone kontrolliert (Kim et al., 2005).

4.5 Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden

Mit Hilfe der genomweiten Expressionsanalyse konnte ich im Rahmen dieser Arbeit auch Transkriptionsfaktoren identifizieren, die spezifisch in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden. Darunter befanden sich die drei homologen bHLH-Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2* und *6*. Die Funktion dieser Faktoren wurde bisher vor allem im Gehirn untersucht (Schwab et al., 1998 und 2000; Olson et al., 2001; Goebbels et al., 2005 und 2006; Wu et al., 2005; Ince-Dunn et al., 2006). Die Funktion und Expression im dorsalen Rückenmark wurde dagegen noch nicht dokumentiert. Die Analyse der Expression von *Neurod1*, *2* und *6* in Wildtyp-, *Gsx1/2*- und *Ptf1a*-mutanten Embryonen verdeutlichte die überwiegende Expression dieser Gene in inhibitorischen Neuronen. Die Expression der drei *Neurod*-Gene war in *Ptf1a*-mutanten Embryonen stark reduziert, allerdings nicht vollkommen abwesend. Es konnten vor allem einige wenige *Neurod6*⁺ Neurone im dorsalen Rückenmark *Ptf1a*-mutanter Embryonen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass *Neurod6* auch in einigen exzitatorischen Neuronen exprimiert wird. Neben den *Neurod*-Faktoren wurden weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden. Darunter befanden sich einige Transkriptionsfaktoren, deren Expression bereits

charakterisiert worden war: *Pax8*, *Lhx1*, *Lhx5* und *Gbx1* (John et al., 2005; Pillai et al., 2007). Auch der Transkriptionsfaktor *bHLHb5* wird zu einem überwiegenden Anteil in inhibitorischen Neuronen exprimiert (Liu et al., 2007). Die genomweite Expressionsanalyse hatte es also erlaubt, Gene zu erkennen, die vorwiegend in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden.

4.6 Ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren kontrolliert Neuropeptid-Expression und Differenzierung

Die Identität eines Neurons wird während der Embryonalentwicklung durch die Expression von Transkriptionsfaktoren bestimmt. Meist legt die Expression mehrerer Transkriptionsfaktoren einen Code fest, der einem Neuron ein bestimmtes Zellschicksal zuweist. Die Entwicklung eines bestimmten Zelltyps verläuft dabei oft in aufeinander folgenden Entwicklungsschritten (Shirasaki und Pfaff, 2002; Baumgardt et al., 2007). Auch die Entwicklung der verschiedenen Populationen von inhibitorischen Neuronen und die spezifische Expression von Neuropeptiden in diesen Neuronentypen werden durch verschiedene Transkriptionsfaktoren kontrolliert. So kontrolliert *Pax2* über die teilweise redundant wirkenden Faktoren *Neurod1*, *2* und *6* die Expression der Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin*. *Pax2* alleine beeinflusst zudem zumindest teilweise die Expression des Neuropeptids *Nociceptin*. Die beiden Faktoren *Lhx1* und *5* kontrollieren dagegen die Expression der Neuropeptide *NPY* und *Enkephalin*.

Die unterschiedlichen Zeitpunkte, an denen die Expression der Neuropeptide oder der Transkriptionsfaktoren in inhibitorischen Neuronen einsetzt, weist darauf hin, dass die Differenzierung von dorsalen inhibitorischen Neuronen in mehreren Entwicklungsschritten erfolgt. Zum Beispiel werden *Pax2*, *8*, *Lhx1*, *5* und *Lbx1* schon früh, d.h. am Tag E12.5, exprimiert (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Pillai et al., 2007), während *Neurod1*, *2* und *6* erst zu einem späteren Zeitpunkt eine starke Expression aufweisen. Außerdem wirken *Pax2* und *Neurod1/2/6* in einer Hierarchie. Dabei werden zuerst die dorsalen Neurone, die während der späten Neurogenese geboren werden, in inhibitorische bzw. exzitatorische Grundtypen (dILA und dILB) spezifiziert. Die Spezifizierung der inhibitorischen Neurone steht unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors *Ptfla*: In *Ptfla*-mutanten Embryonen werden keine inhibitorischen Neurone angelegt (Glasgow et al., 2005). Anschließend sind mehrere

Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung der inhibitorischen Neurone verantwortlich. Der Faktor *Pax2* liegt in einer funktionellen und zeitlichen Hierarchie unterhalb von *Ptf1a*. *Pax2* wird schon früh in den inhibitorischen Neuronen exprimiert und beeinflusst die Differenzierung sämtlicher inhibitorischer Neurone, und kontrolliert z.B. die Produktion des inhibitorischen Neurotransmitters GABA (Gross et al., 2002; Müller et al., 2002; Cheng et al., 2004 und 2005). Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass *Lhx1* und *5*, die ebenfalls früh in inhibitorischen Neuronen exprimiert werden, die Expression von *NPY* und *Enkephalin* in inhibitorischen Neuronen kontrollieren. Die später auftretenden Faktoren *Neurod1*, *2* und *6* liegen in einer funktionellen und zeitlichen Hierarchie unterhalb von *Pax2*: Sie werden durch *Pax2* kontrolliert und werden für die Expression von *Dynorphin* und *Galanin* benötigt (Abb. 4.2).

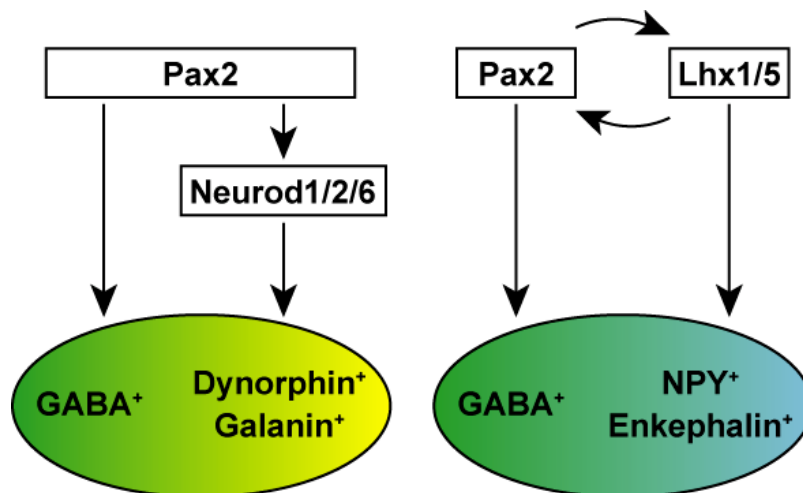


Abb. 4.2: Unterschiedliche Mechanismen kontrollieren die Produktion von GABA und die Expression der Kategorie A-Neuropeptide. Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen, die in inhibitorischen Neuronen für die transkriptionelle Kontrolle der Produktion des inhibitorischen Neurotransmitters GABA und der Expression einiger Kategorie A-Neuropeptide verantwortlich sind. *Pax2* kontrolliert unabhängig von *Neurod1/2/6* die Produktion von GABA. Zudem kontrolliert *Pax2* zusammen mit den nachgeordnet wirkenden Transkriptionsfaktoren *Neurod1/2/6* die Expression der Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin*. *Pax2* ist außerdem für die Expression von *Lhx1/5* notwendig und *Lhx1/5* umgekehrt für die Aufrechterhaltung der *Pax2*-Expression. Dadurch beeinflussen *Lhx1/5* ebenfalls die Produktion des Neurotransmitters GABA. Weiterhin kontrollieren *Lhx1/5* unabhängig von *Pax2* die Expression der Neuropeptide *NPY* und *Enkephalin*.

Es gibt auch andere Beispiele für einen solchen Ablauf der Entwicklung, bei dem zuerst ein bestimmter funktionaler Neuronen-Grundtyp festgelegt wird, der sich dann zu verschiedenen Subpopulationen diversifiziert. So werden im ventralen Rückenmark ventrale Interneurone und Motorneurone gebildet. Sowohl V2-Interneurone als auch Motorneurone differenzieren im Verlauf der Entwicklung zu verschiedenen Subtypen,

die durch die Expression molekularer Marker voneinander unterschieden werden können (Tsuchida et al., 1994; Li et al., 2005).

Meine Ergebnisse verdeutlichen, dass einige der hier analysierten Transkriptionsfaktoren sich auch gegenseitig regulieren. So ist zum Beispiel *Pax2* für die Expression von *Lhx1/5* im dorsalen Horn notwendig, andererseits *Lhx1/5* aber auch für die Aufrechterhaltung der *Pax2*-Expression (siehe auch Pillai et al., 2007). Somit wirken einige Transkriptionsfaktoren wohl eher nicht in strengen hierarchischen Abfolgen, sondern beeinflussen sich gegenseitig und bilden ein regulatorisches Netzwerk. Die Existenz solcher regulatorischer Netzwerke, die Differenzierungsprozesse von Nervenzellen steuern, wurde auch für andere Neuronentypen, z.B. für sympathische Neuronen, postuliert (Goridis und Rohrer, 2002).

4.7 Koordinierte Mechanismen kontrollieren Neurotransmitter-Spezifität und Neuropeptid-Expression

Ptf1a kontrolliert die Spezifizierung aller inhibitorischer Neurone und deshalb werden im dorsalen Rückenmark *Ptf1a*-mutanter Embryonen weder der Neurotransmitter GABA (Glasgow et al., 2005), noch Kategorie A-Neuropeptide exprimiert. Im weiteren Verlauf der Differenzierung sind aber die Mechanismen, die Produktion des inhibitorischen Neurotransmitters und Expression der Neuropeptide kontrollieren, teilweise voneinander getrennt (Abb. 4.2). So sind die Transkriptionsfaktoren *Neurod1*, *2* und *6* für die Expression der Neuropeptide *Dynorphin* und *Galanin* essenziell. Die im Vergleich zu Kontrolltieren unveränderte dorsale Expression von *Gad1* in *Neurod1/2/6*-mutanten Embryonen zeigt aber, dass sie nicht für die Ausprägung der GABAergen Identität notwendig sind. Dagegen ist der Transkriptionsfaktor *Pax2* für die GABAerge Differenzierung aller inhibitorischer Neurone essenziell, und *Gad1* wird im dorsalen Rückenmark *Pax2*-mutanter Embryonen nicht exprimiert (Cheng et al., 2004). *Pax2* ist auch für die korrekte Expression der meisten Kategorie A-Neuropeptide notwendig, allerdings ist die Anzahl der Enkephalin+ Neurone im dorsalen Horn *Pax2*-mutanter Embryonen nicht reduziert. Die Neuropeptid-Expression in dieser Subpopulation inhibitorischer Neurone wird also unabhängig von *Pax2* gesteuert. Zudem kontrollieren die Transkriptionsfaktoren *Lhx1* und *5* gemeinsam die Expression der beiden Neuropeptide *NPY* und *Enkephalin*. Während in *Lhx1/5*-mutanten Embryonen keine

NPY+ Neurone zu erkennen sind, ist die Expression von *Gad1* in diesen Embryonen zwar reduziert, aber nicht gänzlich abwesend. Die Reduktion der *Gad1*-Expression liegt wahrscheinlich darin begründet, dass *Lhx1/5* für die Aufrechterhaltung der *Pax2*-Expression in dorsalen Neuronen notwendig sind (Pillai et al., 2007). Es gibt also einige Faktoren, die sowohl die Produktion des korrekten Neurotransmitters bestimmen, als auch die Neuropeptid-Expression kontrollieren, wobei die beiden Funktionen durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen können.

4.8 *Pax2* und *Lhx1/5* beeinflussen die Migration von inhibitorischen Neuronen

Die Transkriptionsfaktoren *Pax2* und *Lhx1/5* kontrollieren nicht nur die GABAerge Differenzierung und Neuropeptid-Expression von inhibitorischen Neuronen, sondern steuern auch noch andere Aspekte der Reifung dieser Neurone. Sowohl in *Pax2*- als auch in *Lhx1/5*-mutanten Embryonen konnte eine veränderte Lokalisation der dorsalen inhibitorischen Neurone beobachtet werden, was auf eine Störung der Migration dieser Neurone hinweist. Für den korrekten Ablauf der Migration ist die Expression von Molekülen notwendig, die Reaktionen der Neurone auf Signale aus der Umgebung ermöglichen und somit den Weg eines Neurons während der Wanderung durch das Rückenmark festlegen (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Mueller, 1999; Grunwald und Klein, 2002; Charron und Tessier-Lavigne, 2005). Die gestörte Migration der Neurone könnte auf eine veränderte Expression dieser Moleküle in *Pax2*- und *Lhx1/5*-mutanten Embryonen hindeuten. Dies verdeutlicht, dass das oben beschriebene regulatorische Netzwerk nicht nur die Produktion des Neurotransmitters und die Expression von Neuropeptiden kontrolliert, sondern auch andere Aspekte, wie z.B. die Migration der Neurone, beeinflusst. Auch andere Transkriptionsfaktoren, welche die Differenzierung exzitatorischer Neurone im dorsalen Horn steuern, beeinflussen das Migrationsverhalten der Nervenzellen, z.B. *Lmx1b* und *Prrxl1* (Chen et al., 2001; Ding et al., 2004).