

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktionen des Hirnstamms

Das Rhombenzephalon befindet sich zwischen Mesenzephalon und Rückenmark und teilt sich in *Cerebellum*, *Pons* und *Medulla oblongata*. Das *Cerebellum* koordiniert die Feinabstimmung der Körperbewegung und reguliert den Muskeltonus. *Medulla oblongata* und *Pons* bilden gemeinsam mit dem Mesenzephalon eine funktionelle Einheit, den sogenannten Hirnstamm. Im Hirnstamm werden sowohl motorische als auch sensorische Informationen integriert und weitergeleitet. Funktionell ist der Hirnstamm außerordentlich wichtig für die Aufrechterhaltung und Steuerung von lebensnotwendigen Prozessen wie Atem- und Herzkreislauffunktionen.

Als rostrale Fortsetzung des Rückenmarks zeigt der Hirnstamm einen prinzipiell ähnlichen anatomischen Aufbau wie das Rückenmark. Der Hirnstamm gliedert sich wie das Rückenmark in Basalplatte und Flügelplatte. Anders als das Rückenmark ist das Rhombenzephalon dorsal geöffnet, d. h. Anteile die im Rückenmark dorsal liegen, liegen im Rhombenzephalon lateral (Abb 1.1). In der Flügelplatte, dem ehemals dorsalen Anteil terminieren zentrale Projektionen primärer sensorischer Neurone und werden dort auf zweite Neurone umgeschaltet (z. B. *Ncl. principalis n. trigemini*), welche die sensorische Information auf Hirnstammebene verarbeiten u/o zu höheren Zentren des Gehirns weiterleiten. In der Basalplatte sind v. a. motorische Kerne lokalisiert, in einer Zwischenzone finden sich viscerosensible und –motorische Kernareale. Im Hirnstamm werden außerdem sog. lange aufsteigende Leitungsbahnen aus dem Rückenmark, wie z.B. die sensiblen Hinterstrangbahnen und spinozerebelläre Bahnen in Relaiskernen (*Ncl. gracilis und cuneatus*, bzw. *Ncl. olivaris inferior*) auf nachfolgende Neurone umgeschaltet, welche ihrerseits z. B. zum Thalamus oder zum *Cerebellum* projizieren.

Neben seiner Funktion als Weiterleitungs- und Relaisstation besitzt der Hirnstamm zentrale Bedeutung in der Steuerung lebenswichtiger Kreislauf- und Atemfunktionen. Morphologische Grundlage dieser Aufgaben ist die *Formatio Reticularis*. Hierbei handelt es sich um ein morphologisch gut, molekular bisher nur unzureichend charakterisiertes System von netzförmig im gesamten Hirnstamm angeordneten Nervenzellverbänden. Innerhalb der *Formatio Reticularis* lassen sich Subsysteme

abgrenzen, die durch das Vorherrschen bestimmter Transmittersysteme gekennzeichnet sind, z. B. adrenerge, noradrenerge, dopaminerge, oder serotonerge Systeme.

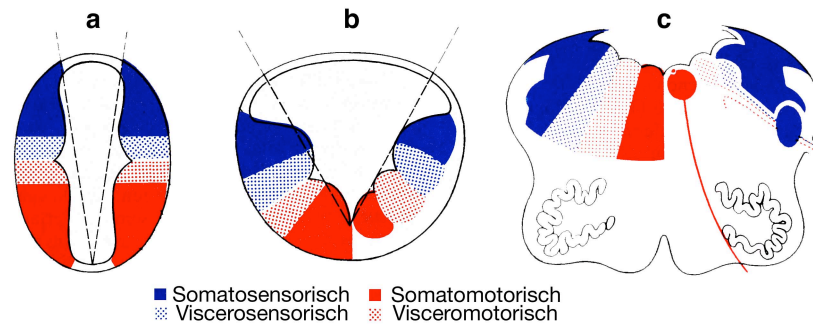


Abb 1.1 Schematische Darstellung der Anordnung von sensorischen Interneuronen und Motorneuronen im Rückenmark (a), Rhombenzephalon (c) und einem theoretischen Übergangsstadium (b). Die Neurone werden in Rückenmark und Rhombenzephalon in homologen Positionen gebildet.

Mit Ausnahme des I. und II. Hirnnerven sind die primären Kerngebiete aller Hirnnerven im Hirnstamm lokalisiert, wobei die Kerne des III. und IV. Hirnnerven im Mittelhirn, diejenigen der V. – XII. Hirnnerven im Rhombenzephalon liegen. Die einzelnen Hirnnerven stellen entweder gemischte Nerven dar, oder enthalten ausschließlich sensorische bzw. motorische Fasern. Die Funktionen der Hirnnerven können folgendermaßen zusammengefaßt werden: 1. die Übermittlung somatosensibler Information aus der Haut, Muskulatur und Gelenken des Kopfes 2. die Übermittlung spezieller sensorischer Information, wie Geschmack, Geruch, Sehen, Hören und Gleichgewichtssinn, 3. die Übermittlung viscerosensibler Information aus den inneren Organen, wie z.B. Herzfrequenz, Blutdruck, Sauerstoffgehalt des Blutes und Atmung sowie 4. die motorische Steuerung der Gesichts- Kau- und Schlundmuskulatur und der inneren Organe.

Die motorischen Hirnnerven (-kerne) können anhand ihrer Funktionen weiter untergliedert werden: 1. Somatomotorische Kerne (III, IV, VI, XII) innervieren nicht-branchiogene Muskulatur des Kopfes, die teilweise aus Myotomen hervorgegangen ist (äußere Augenmuskeln, innere Zungenmuskulatur), branchiomotorische Kerne (V, VII, IX, X, XI) innervieren Kopfmuskulatur, die aus den Branchialbögen

hervorgegangen ist (Kaumuskulatur, Mimische Muskulatur, Muskulatur des Pharynx und Larynx) und allgemein-visceromotorische Kerne (III, VII, IX, X), über die alle inneren Organe autonom innerviert werden.

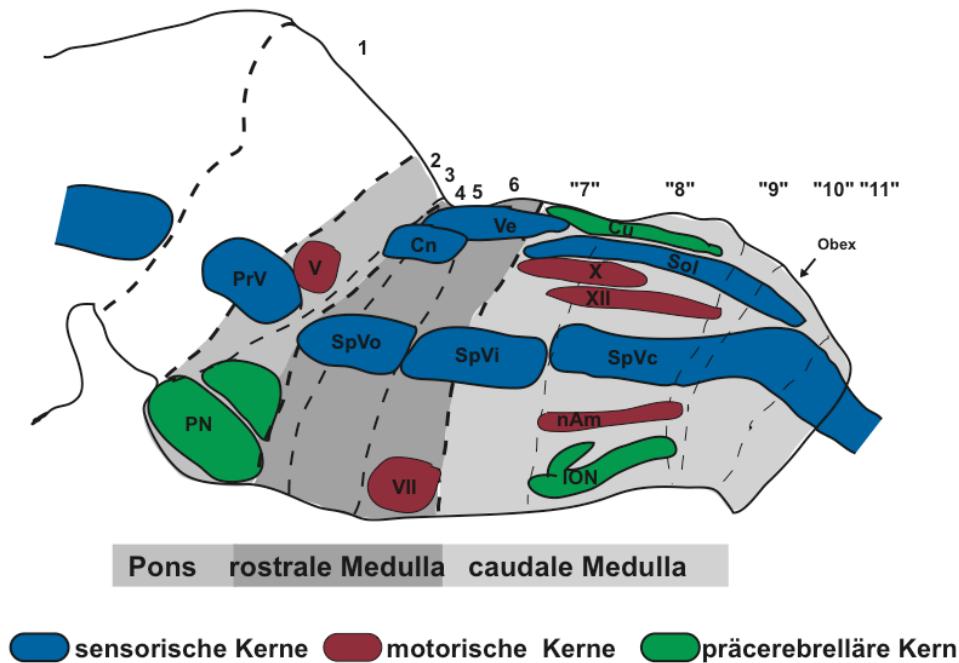


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des Rhombenzephalons. Die in der Arbeit besprochenen Kerngebiete sind entsprechend ihrer Position innerhalb der einzelnen Rhombomere eingezeichnet. PrV *Ncl. principalis n. trigeminus*, SpVo *Ncl. spinalis oralis n. trigeminus*, SpVi *Ncl. Spinalis interpoaris n. trigeminus*, SpVc *Ncl. spinalis caudalis n. trigeminus*, Sol *Ncl. solitarius*, Ve *Nucl. vestibularis*, Cn *Nucl. cochlearis*, V *Nucl. motorius n. trigeminus*, X *Nucl. motorius n. vagus*, XII *Nucl. motorius n. hypoglossus* nAm *Nucl. ambiguus*, ION *oliva inferior*, PN *Nucl. Pontinus*, Cu *Nucl. cuneatus*

Zwei Klassen sensibler Afferenzen können unterschieden werden: viszerale und somatische Afferenzen. Die viszerale Afferenzen des *N. intermedius* (der sensible Anteil des *N. facialis*), *N. glossopharyngeus* und *N. vagus* übermitteln viszerosensible Informationen aus allen inneren Organen und Geschmacksinformationen der Zunge in den *Nucl. solitarius*. Die somatischen Afferenzen des *N. vestibulocochlearis* übermitteln Informationen über Hören und Gleichgewicht zu den gleichnamigen Kerngruppen. Weitere sog. somatosensible Informationen beinhalten Hautsensibilität sowie Tiefensensibilität aus Muskeln und Sehnen. Diese Informationen aus dem Bereich des Kopfes werden durch den *N. trigeminus* zum Hirnstamm geleitet, und in der zugehörigen Kerngruppe *Ncl. trigeminalis* umgeschaltet.

Im Hirnstamm wird sensorische Information nicht nur weitergeleitet, sondern auch integriert. Damit repräsentiert der Hirnstamm eine eigene Regulationsebene, die in der

Steuerung lebenswichtiger Funktionen eine kritische Rolle spielt. Die zentrale Bedeutung des Hirnstamms bei der Regulation lebenswichtiger vegetativer Funktionen wurde von Lumsden in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts durch eine Reihe klassischer Experimente gezeigt (Lumsden 1923). Er durchtrennte den Hirnstamm von Katzen zwischen Pons und Metencephalon. Die Katzen zeigten auch nach der Durchtrennung eine regelmäßige Atmung. Erst nach Zerstörung der *Pons* wurde Atemstillstand beobachtet. An der Kontrolle der Atmung sind mehrere Regionen im Rhombenzephalon beteiligt. Der Atemrhythmus wird durch rhythmische Aktivität von Neuronen in der ventro-lateralen *Medulla oblongata* zum Beispiel dem Prä-Bötzinger Zentrums generiert und über den *Nervus phrenicus* an die Atemmuskulatur weitergegeben. Dieser primäre Rhythmus muß dem Sauerstoffbedarf des Körpers angepasst werden. Informationen über Sauerstoffgehalt und pH des Blutes werden durch den *Nervus vagus* in den *Nucl. solitarius* geleitet. Dieser moduliert gemeinsam mit (nor)adrenergen Zentren die rhythmische Aktivität der Nervenzellen im Prä-Bötzinger Zentrum und sorgt so für die notwendige Anpassung der Atemfrequenz an den Sauerstoffbedarf des Körpers (Feldman et al. 2003; Viemari JC 2004).

Die Ausbildung dieser Reflexbögen oder die Verschaltung der Nerven im Rhombenzephalon wird schon während der Entwicklung festgelegt. Ermöglicht wird dies dadurch, dass bestimmte Nervenzellen während der Entwicklung an bestimmten Orten gebildet werden bzw. an bestimmte Orte wandern und damit Bildung und Verschaltung von Nervenzellen in verschiedenen Individuen einer Spezies nach stereotypen Mustern ablaufen. Die Steuerung solcher komplexen Prozesse auf molekulare Ebene zu verstehen, ist eine Herausforderung für die Entwicklungsbiologie.

1.2 Entwicklung des Rhombenzephalons:

Durch die Neurulation wird das Ektoderm in zwei Abschnitte, das neuronale und nicht-neuronale Ektoderm, unterteilt. Aus dem nicht-neuronalen Ektoderm entwickelt sich die Oberhaut mit Anhangsgebilden und aus dem Neuroektoderm zunächst das Neuralrohr. Dieses differenziert sich in seinen rostralen Abschnitten zum Gehirn, während der kaudale Anteil sich zum Rückenmark entwickelt. Die frühe Hirnanlage

wird in drei Abschnitte, sog. Hirnbläschen, unterteilt: Prosenzephalon (Vorderhirnbläschen), Mesencephalon (Mittelhirnbläschen) und Rhombenzephalon (Rautenhirnbläschen). Entlang der anterior-posterioren Achse wird das Rhombenzephalon während der Entwicklung in sieben Metamere, sogenannte Rhombomere unterteilt (von Baer 1828; Vaage 1969; Fraser et al. 1990). Aus dem ersten Rhombomer entwickelt sich das spätere Cerebellum, aus den zweiten und dritten Rhombomeren die Brücke und aus den vierten bis sechsten Rhombomeren entwickelt sich die *rostrale Medulla oblongata*. Das siebte und größte Rhombomer ist wie das Rückenmark in weitere Unterabschnitte unterteilt und bildet die *caudale Medulla oblongata*. Diese bildet nach kaudal die Grenze des Gehirns; sie liegt auf Höhe des fünften Somiten. Kaudal davon beginnt das Rückenmark.

Die transiente segmentale Gliederung des Rhombenzephalons, die sich in den Bläschen während der Entwicklung zeigt, ist nicht nur morphologisch charakterisiert. Die Gliederung des Rhombenzephalons in Rhombomere zeigt sich auch auf molekularer und zellulärer Ebene und bleibt auch später in der definitiven Anatomie nachweisbar. Die Expression vieler Gene zeigt im Rhombenzephalon ein segmentales Muster (Lumsden and Krumlauf 1996). Zellen verbleiben im allgemeinen innerhalb der Rhombomergrenzen (Fraser et al. 1990; Marin and Puelles 1995). Die meisten Strukturen des Rhombenzephalons entwickeln sich aus einem oder mehreren Rhombomeren, und definieren so auch die Rhombomergrenzen während der Reifung. Zum Beispiel werden die Motoneurone des *N. trigeminus* im zweiten und dritten Rhombomer geboren. Der motorische Kern des *V. Hirnnerven* ist im Adulten noch immer in diesen Rhombomeren lokalisiert (Lumsden and Keynes 1989).

1.3 Ausbildung der anterior-posterioren Achse im Rhombenzephalon

Die Anlage des Rhombenzephalons ist in segmentale Abschnitte, Rhombomere entlang der anterior-posterioren Achse unterteilt (von Baer 1828). Ihre bestimmte Lage in einem dieser Rhombomere weist den Vorläuferzellen eine spezifische positionelle Information zu. Molekular wird die Positionsinformation entlang der anterior-

posterioren Achse durch die spezifische Expression von Genen der Homöobox Familie bestimmt. Dieser molekulare Mechanismus ist in der Evolution hoch konserviert und wird sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten dazu eingesetzt, die anterior-posteriore Achse zu definieren. Spezifische Hox-Gen-Expression induziert die Segmentierung des Rhombenzephalons in einzelne Rhombomere und weist den einzelnen Rhombomeren eine spezifische Identität zu (Carpenter et al. 1993; Bell et al. 1999; Barrow et al. 2000).

Hox-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren. Alle Mitglieder der Homöobox Gen Familie besitzen eine charakteristische, konservierte 183 Basenpaar lange DNA Sequenz. Diese Sequenz kodiert ein DNA bindendes Proteinsegment, die Homöodomäne. Gene der Hox-Familie wurden erstmals in *Drosophila* mit Hilfe genetischer Techniken identifiziert. Mutationen in Genen der Homöobox Familie können zu einer sogenannten homöotischen Fehlbildung führen. Das bedeutet, dass ähnliche (homöotische) Strukturen zusätzlich an der falschen Körperstelle gebildet werden. Zum Beispiel wird nach Mutation des Hox-Gens *antennapedia* statt einer Antenne ein Bein am Kopf der Fliege gebildet. Mutationen der Hox-Gene in Säugern können im Prinzip zu ähnlichen phänotypischen Veränderungen, z.B. im sich entwickelnden Rhombenzephalon, führen. Mutation von *Hoxb1* bewirkt, daß anstelle des vierten Rhombomers ein zusätzliches Rhombomer gebildet wird, das die Identität des zweiten Rhombomers besitzt, (Goddard et al. 1996; Studer et al. 1996). Dagegen führt die ektopische Expression von *Hoxb1* im zweiten Rhombomer zu einem Identitätswechsel, und zur Bildung eines Rhombomers mit der Identität von Rhombomer vier (Bell et al. 1999).

In *Drosophila* gibt es einen Hox-Cluster, der 8 Gene enthält. Diese Hox-Gene werden in spezifischem Muster entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert. Die 39 Homöobox-Gene der Maus sind innerhalb des Genoms in vier Blöcken oder Clustern angeordnet (Hox-a-d Cluster) (McGinnis and Krumlauf 1992).

Hox-Gene werden in Abhängigkeit von ihrer Position innerhalb des jeweiligen Clusters im sich entwickelnden Nervensystem unterschiedlich exprimiert. Die ersten Gene, die 5' in den Clustern liegen, werden ausschließlich in anterioren Positionen exprimiert, während die Gene, welche am weitesten 3' im Cluster liegen in einer breiten Domäne, die sich von anterior nach posterior zieht, exprimiert werden. Nur

die ersten vier Hox-Gene eines Clusters werden in den Rhombomeren zweiten bis siebten exprimiert, z.B. im Hoxa Cluster die Hoxa1 - Hoxa4 Gene. Hox-Gene, die an der gleichen relativen Position in den paralogen Clustern lokalisiert sind, werden also teilweise überlappend in den Rhombomeren exprimiert.

In den letzten Jahren wurde die Funktion von Hox-Genen in Säugern durch Mutationsanalysen in der Maus intensiv untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass diese Gene wenigstens teilweise redundante Funktionen übernehmen. Hoxa1 und Hoxb1 sind paraloge Gene, die beide am Ende der jeweiligen Cluster lokalisiert sind. Hoxa1 wird spezifisch im vierten Rhombomer exprimiert, während Hoxb1 im vierten Rhombomer und in weiter anterioren Positionen exprimiert wird. Mutation von Hoxa1 führt zum Fehlen des fünften Rhombomers und zu einer Verkleinerung des vierten Rhombomers, und geht einher mit dem Verlust von Motorneuronen des *N. facialis* Lufkin 1991 (Dolle et al. 1993; Mark et al. 1993). Mutation von Hoxb1 führt zu einem Identitätswechsel des vierten Rhombomers zum zweiten Rhombomer. Motorneurone des *N. facialis*, die im falsch spezifizierten vierten Rhombomer geboren werden, wandern später abnorm (Studer et al. 1996). Mutation beider Paraloge führt zu weiterreichenden Veränderungen im Rhombenzephalon, wie dem Verlust großer Teile des zweiten Kiemenbogens und dem Verlust des vierten und fünften Rhombomers. Dies lässt sich teilweise durch Redundanz der beiden Gene erklären. Verkompliziert wird dies dadurch, dass Homeoboxgene sich zusätzlich auch gegenseitig kontrollieren können (Gavalas et al. 1998; Rossel and Capecchi 1999). Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel für die Regulation von Hox-Genen ist Hoxb1 und Hoxb2. Die spezifische Expression von Hoxb2 im vierten Rhombomer wird durch Hoxb1 aufrecht erhalten (Maconochie et al. 1997).

Weitere Faktoren, die die Hox-Gene regulieren und damit für die Ausbildung der antero-posterioren Achse im Rhombenzephalon notwendig sind wurden identifiziert. Der wichtigste Faktor ist Retinsäure, ein Vitamin A Derivat, das in einem antero-posterioren Gradienten im ZNS vorhanden ist. Retinsäure bindet an den Retinsäurerezeptor und aktiviert diesen Transkriptionsfaktor. In Zellkultur kann Retinsäure Hox-Gene induzieren (Simeone et al. 1991), und Hoxa1 und Hoxb1

Promotoren besitzen Bindungsstellen für den Retinsäurerezeptor (Ogura and Evans 1995; Dupe et al. 1997).

Die Transkriptionsfaktoren Krox20, Gbx2 und Kreisler/MafB sind an der Spezifizierung der Rhombomere und der Ausbildung ihrer Identität beteiligt. Die Initiation ihrer Expression in spezifischen Rhombomeren wird durch Hox-Gene reguliert. Krox20, Gbx2 und Kreisler/MafB regulieren dann die Expression bestimmter Hox-Gene, z.B. regulieren Krox20 und Kreisler gemeinsam die Expression von Hoxb3 in Rhombomer fünf (Frohman et al. 1993; Schneider-Maunoury et al. 1993; McKay et al. 1994; Wassarman et al. 1997; Manzanares et al. 1999; Manzanares et al. 2001).

Die Familie der polycomb homeobox (Pbx) Faktoren sind Kofaktoren, die zur Regulation der Hoxexpression benötigt werden. Ohne Pbx wird die Expression von Hox-Genen nicht aufrecht erhalten, und es wird nur ein einziges Rhombomer mit der Identität des ersten Rhombomers gebildet. Positionsinformation entlang der antero-posterioren Achse wird im Rhombenzephalon demnach nicht festgelegt (Waskiewicz et al. 2001; Waskiewicz et al. 2002).

Übergeordnete Organisationszentren, die wichtig sind für die Regionalisierung anderer Regionen des Nervensystems, scheinen bei der Ausbildung der antero-posterioren Achse im Rhombenzephalon keine Rolle zu spielen. Eines dieser Zentren ist an der Grenze des Metencephalon/Rhombenzephalon lokalisiert und wird *midbrain hindbrain organizer* (MHO) genannt. Engrailed1 und Fgf8 sind notwendig, um diesen Organizer zu bilden. Mutationen von engrailed1 und Fgf8 haben keinen Effekt auf die Bildung und Spezifizierung der Rhombomere, führen aber dazu, daß das Cerebellum, ein Derivat des 1. Rhombomers, nicht normal gebildet wird (Wurst et al. 1994; Chi et al. 2003).

1.4 Die Ausbildung der dorso-ventralen Achse

Wie auch in anderen Teilen des ZNS entwickeln sich im Rhombenzephalon dorsal und ventral unterschiedliche Zelltypen. Generell werden ventral im Rhombenzephalon Motorneurone, dorsal sensorische Interneurone gebildet. Dies setzt

voraus, dass nicht nur die Position einer Zelle entlang der anterior-posterioren Achse definiert werden muss, sondern auch ihre Position entlang der dorso-ventralen Achse. Diese zweite dorso-ventrale Achse wird durch Signale festgelegt, die von dorsalen und ventralen Signalzentren ausgehen.

Die Spezifizierung der dorso-ventralen Achse wurde im Detail im Rückenmark untersucht. Ähnliche molekulare Mechanismen werden wahrscheinlich auch im Rhombenzephalon benutzt, sie wurden allerdings bisher nicht in vergleichbarer Tiefe analysiert. Ich werde deshalb im folgenden die Entwicklung der dorso-ventralen Achse im Rückenmark beschreiben.

Bereits vor der Neurulation wird sonic hedgehog (*Shh*) in der Chorda dorsalis, einer axialen, mesodermalen Zellgruppe, die ventral des Neuralrohrs liegt exprimiert. Später in der Entwicklung wird *Shh* zusätzlich von der Bodenplatte des Neuralrohrs selber exprimiert (Ericson et al. 1995a; Ericson et al. 1995b; Roelink et al. 1995; Ericson et al. 1996). Der von Chorda dorsalis und Bodenplatte ausgehende *Shh* Gradient reguliert zwei Klassen von Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Gene, der Klasse I (*Pax7*, *Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3* und *Pax6*) werden von *Shh* reprimiert, während Gene der Klasse II (*Nkx6.2*, *Nkx6.1*, *Olig2*, *Nkx2.2* und *Nkx2.9*) von *Shh* induziert werden. Diese beiden Klassen von Transkriptionsfaktoren reprimieren sich gegenseitig, so dass es zur Etablierung fünf unterschiedlicher (V0, Vmn, V3, V4, V5) Vorläuferdomänen im ventralen Neuralrohr kommt (Lee and Jessell 1999; Jessell 2000; Briscoe and Ericson 2001; Mizuguchi et al. 2001; Novitch et al. 2001). Nach Mutation von *Shh* bilden sich diese Vorläuferdomänen nicht aus (Chiang et al. 1996). Aus jeder dieser Vorläuferdomänen entsteht eine spezifische neuronale Subpopulation. Dabei kann sich der Zelltyp, der sich aus einer Vorläuferdomäne entwickelt, im Laufe der Entwicklung ändern. So werden im Rhombenzepalon wie auch im Rückenmark aus der ventral gelegenen Vmn Domäne zunächst Motorneurone gebildet. Später in der Entwicklung entstehen in der gleichen Domäne im Rückenmark Oligodendrozyten, während im Rhombencepalon im Allgemeinen serotonerge Neurone gebildet werden. Dies gilt allerdings nicht für das vierte Rhombomer des Rhombencepalons, wo auch spät Motorneurone des *N. facialis* geboren werden (Pattyn et al. 2003).

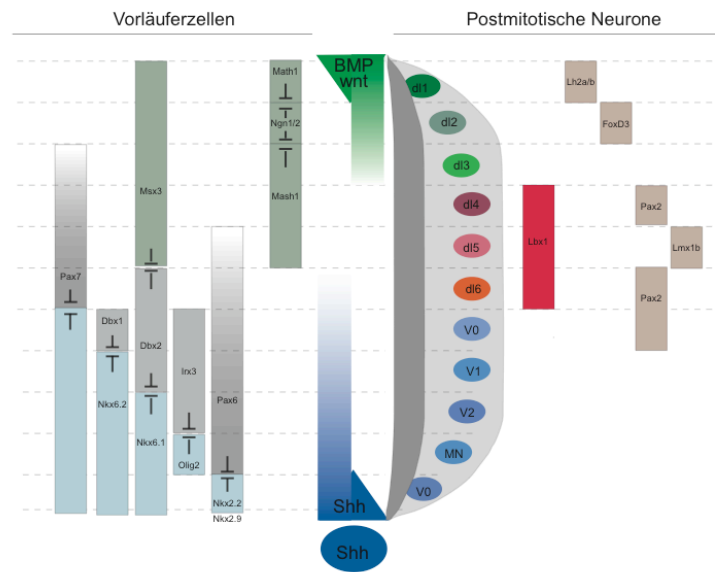


Abb 1.2: Das dorsale Rückenmark wird durch die differenzielle Expression von Homeobox und basic-helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren in fünf Vorläuferdomänen unterteilt. Die Expression von Transkriptionsfaktoren wird durch einen Sonic Hedgehog Gradienten und durch dorsale Signale reguliert.

In den Vorläuferdomänen des dorsalen Rückenmarks werden ebenfalls verschiedene Gene, die für *basic-helix-loop-helix* (bHLH) - und Homeobox-Faktoren kodieren, in spezifischen Domänen exprimiert, z.B. *Math1*, *Ngn1*, *Ngn2*, *Olig3* und *Mash1*, oder *Pax7* und *Pax3* (Ma et al. 1997; Lee et al. 1998; Gowan et al. 2001). Aus diesen Domänen entstehen sechs unterschiedliche Neuronentypen, dl1-6 (Gross et al. 2002; Müller et al. 2002). Die Bildung der dorsalen Domänen ist abhängig von Signalen der Deckplatte, und verschiedene Experimente zeigen, daß Proteine der bone morphogenic Familie (BMPs) eine wichtige Funktion in diesem Prozess ausüben. Aktivierung des BMP Signalweges im Neuralrohr von Hühnern führt zu einer deregulierten Expression von *Cath1* (dem Homolog von *Math1* im Huhn) und *Ngn1/2* (Timmer et al. 2002). In Mausembyonen, in denen durch Expression eines Toxins die Deckplatte zerstört wurde, werden *Math1* und *Ngn1/2* nicht exprimiert, und dl1-3 Neurone werden nicht gebildet. Die Produktion von Lbx1 positiven Neuronen die ventral davon entstehen ist aber nicht beeinträchtigt (Lee et al. 2000). Im dorsalen Neuralrohr entstehen also einerseits Neurone, deren Produktion von Signalen der Deckplatte abhängen (Klasse A); Klasse A Neurone exprimieren *Olig3* bei ihrer Geburt, und sie entstehen aus einer *Olig3+* Vorläuferdomäne. Andererseits entstehen

Neurone, die Lbx1 exprimieren (Klasse B) und die unabhängig von Signalen der Deckplatte und der Basalplatte entstehen können.

1.5 Neuronale Determination

Welcher Nervenzelltyp im Rhombenzephalon entsteht, wird durch die Vorläuferzelle determiniert, aus der sich diese Nervenzelle differenziert. Die Identität einer Vorläuferzelle wird einerseits dadurch determiniert, in welchem Rhombomer sie sich befindet (Position der Zelle entlang der antero-posterioren Achse). Andererseits ist auch die Position entlang der dorso-ventralen Achse wichtig für die Identität einer Vorläuferzelle. Im dorsalen Rhombenzephalon entstehen sensorische Neurone und (nor)/adrenerge Neurone aus spezifischen Vorläuferzellen in den Rhombomeren vier, fünf und sechs. Mehrere Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung dieser Neurone spielen sind in den letzten Jahren identifiziert worden. Allerdings wurde nur in wenigen Fällen der molekulare Mechanismus bestimmt, der zur abnormen Entwicklung solcher Nervenzellen im Rhombenzephalon führt.

Gsh2 wird in einer dorsal gelegenen Vorläuferdomäne exprimiert. In Gsh2^{-/-} Tieren wird die Area postrema nicht und der *Nucl. solitarius* abnorm gebildet. Die Gsh2-mutanten Tiere sterben innerhalb des ersten Tages nach der Geburt aufgrund einer fehlerhaften Kontrolle ihrer Atmung (Szucsik et al. 1997). Mash1 wird ebenfalls in dorsal gelegenen Vorläufern exprimiert; die Atmung von Mash1^{-/-} Tieren ist gestört (Dauger et al. 1999; Dauger et al. 2001). Zwei Gene, die durch Mash1 kontrolliert werden, sind Phox2a und -b (Pattyn et al. 2000a). Im Rhombenzephalon von Mash1^{-/-} Mäusen werden Phox2a und Phox2b nicht korrekt exprimiert. Die Expression von Phox2a und Phox2b wird in postmitotischen Nervenzellen des dorsalen Rhombenzephalons beobachtet, und markiert (nor)adrenerge Neurone für deren Differenzierung sie wichtig sind. Sowohl in Mash1^{-/-} also auch in Phox2b^{-/-} Tieren werden keine (nor)adrenergen Neurone gebildet (Hirsch et al. 1998; Pattyn et al. 2000b). In Phox2a^{-/-} Tieren wird nur ein Kern, das noradrenerge Zentrum A6, nicht angelegt (Morin et al. 1997; Pattyn et al. 1997). Phox2a^{-/-} Tiere atmen nicht, während Phox2b^{-/-} Tiere wegen Defiziten im peripheren Nervensystem noch während der Fetalentwicklung sterben (Pattyn et al. 1999).

Besonders gut untersucht ist die Rolle des Transkriptionsfaktors Rnx/Tlx3 in der Entwicklung des Rhombenzephalons. Rnx/Tlx3 wird zunächst in einem dorsalen und einem ventralen Streifen entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert und zwar in Streifen, die in der Flügelplatte des Rhombenzephalons und des Rückenmarks lokalisiert sind (Logan et al. 1998). Später in der Entwicklung wird Expression in einem breiten longitudinalen Streifen in der Flügelplatte des siebten Rhombomers und des Rückenmarks gefunden. Rnx^{-/-} Tiere zeigen ein verändertes Atemmuster und sterben infolgedessen nach der Geburt (Shirasawa et al. 2000). In Rnx Mutanten Tieren werden der *Nucl. solitarius* und die (nor)adrenergen Zentren *A1/C1*, *A2/C2* und *A5* nicht angelegt (Qian et al. 2001). In den spät geborenen Neuronen der dorsalen Flügelplatte des siebten Rhombomers und dem dorsalen Rückenmark induziert Rnx gemeinsam mit Tlx1 die Bildung von aktivierenden, glutamatergen Neuronen, während die Differenzierung von inhibitorischen, GABAergen Neuronen durch Rnx unterdrückt wird. In Rnx^{-/-} / Tlx3^{-/-} Tieren werden zum Beispiel statt glutamaterger Neurone im *Nucl. spinalis caudalis n. trigemius* und im Rückenmark GABAerge Neurone gebildet. Die zusätzlichen, ektopischen GABAergen Nervenzellen inhibieren die Neurone des Atemzentrums, so dass es zu einer veränderten Atmung kommt (Cheng et al. 2004).

Hox-Gene spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der anterior-posterioren Achse im Rhombenzephalon, sondern sie kontrollieren auch die Bildung einzelner neuronaler Subpopulationen, die entlang der dorsal-ventralen Achse innerhalb eines Rhombomers liegen. Zum Beispiel führt die gemeinsame Mutation von *Hoxa3* und *Hoxb3* oder die Mutation von *Hoxb1* zur Expansion einer bestimmten Vorläuferpopulation in dem vierten, fünften und sechsten Rhombomeren und damit zum Verlust der (nor)adrenerger Zellen innerhalb der Flügelplatte, die von diesen Vorläufern gebildet werden (Gaufo et al. 2004).

1.6 Der Homöobox Transkriptionsfaktor Lbx1

Das Gen, das für den Homöobox Transkriptionsfaktor Lbx1 der Maus kodiert wurde aufgrund seiner Homologie zu den ladybird Genen in *Drosophila* isoliert (Jagla et al. 1995; Chen et al. 1999). Lbx1 wird während der Entwicklung im Rhombenzephalon,

im Rückenmark und in wandernden Muskelvorläuferzellen exprimiert. In Mäusen, die eine Mutation des Lbx1 Gens tragen, wandern Muskelvorläuferzellen zwar aus dem Myotom aus, sie wandern aber nicht in die Extremitätenanlage ein. Lbx1 ist also nicht für die Motilität von Muskelvorläuferzellen per se, sondern für eine gerichtete Wanderung oder für eine Zielfindung notwendig (Brohmann et al. 2000). Zusätzlich spielt Lbx1 auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Nervenzellen im Rückenmark.

Im dorsalen Rückenmark ermöglicht die Lbx1 Expression, zwei Klassen postmitotischer Neurone zu unterscheiden. Klasse A Neurone sind dorsal lokalisiert, sie exprimieren kein Lbx1, und diese Neurone werden nur dann gebildet, wenn Signale, die von der Deckplatte gebildet werden vorhanden sind. Klasse B Neurone sind ventral lokalisiert, exprimieren Lbx1 und werden auch dann gebildet, wenn die dorsalen oder ventralen Signale fehlen. In Lbx1^{-/-} Mäusen werden die Neurone der Klasse B falsch spezifiziert, und sie nehmen die Identität von Neuronen der Klasse A an. Lbx1 ist also für die Spezifizierung von Neuronen der Klasse B notwendig. Während der Entwicklung des Rückenmarks können zwei Phasen der Neurogenese unterschieden werden. In der frühen Phase werden sechs Nervenzelltypen in spezifischen bestimmten Positionen entlang der dorso-ventralen Achse gebildet, wobei je drei der Klasse A bzw. B angehören. In der späten Phase werden nur noch zwei Nervenzelltypen der Klasse B gebildet, die in einem Salz- und Pfeffermuster entstehen. Beide, die frühen und die späten Neurone der Klasse B werden in Lbx1 mutanten Tieren falsch spezifiziert (Gross et al. 2002; Müller et al. 2002).

Lbx1^{-/-} Tiere werden geboren, sterben jedoch kurz nach der Geburt. Sie atmen nur unregelmäßig und bleiben somit hypoxisch. Die zentrale Steuerung der Atmung erfolgt im Hirnstamm, als einem Teil des Rhombenzephalons, und es wäre möglich, dass in Lbx1^{-/-} Tieren die an der Atmung beteiligten neuronalen Regelkreise nicht korrekt angelegt werden, d.h. dass Lbx1 eine wichtige Rolle für die Ausbildung lebensnotwendiger Schaltkreise spielt. Ziel dieser Arbeit ist es, eine mögliche Rolle von Lbx1 in der Entwicklung des Rhombenzephalons zu untersuchen und damit die Entwicklung sensorischer Interneurone im Rhombenzephalon besser zu verstehen.