

## 4. Diskussion

Das Rhombenzephalon kontrolliert lebensnotwendige physiologische Prozesse. Dazu erhält es sensorische Informationen, d.h. Axone der peripheren sensorischen Ganglien, die in den Hirnnerven gebündelt werden, projizieren auf sensorische Interneurone im Rhombenzephalon. Zusätzlich werden Informationen aus dem Rückenmark und aus höheren Gehirnzentren verarbeitet. Im Rhombenzephalon werden diese Informationen integriert, verschaltet und an höhere Hirnregionen und an Motorneurone weitergegeben. So reguliert das Rhombenzephalon Prozesse, die reflexartig gesteuert werden, z.B. Atmung oder Schlucken. Neuronale Schaltkreise, die aus unterschiedlichen Nervenzelltypen bestehen, erlauben diese Funktionen. Diese Schaltkreise werden während der Entwicklung angelegt und entstehen immer in gleicher stereotyper Art und Weise in verschiedenen Individuen. Um diese korrekte Verschaltung zu erreichen, müssen die verschiedenen Nervenzelltypen zeitlich und räumlich koordiniert entstehen. Die molekularen Mechanismen, die das Entstehen der verschiedenen Nervenzelltypen und Schaltkreise regulieren, werden intensiv untersucht, sind aber erst in den Anfängen verstanden.

### **4.1 Spezifizierung der *Lbx1+* Nervenzellen im Rückenmark und im Rhombenzephalon**

Unterschiedliche Nervenzellen entstehen im ZNS an bestimmten Positionen und zu bestimmten Zeiten in der Entwicklung. Vorläuferzellen, die unterschiedliche Nervenzellen bilden, sind bereits verschieden: Die Vorläuferzellen besitzen unterschiedliche Identität, und diese Identität bestimmt, welche Nervenzellen sie bilden werden. Die Identität einer Vorläuferzelle wird durch ihre räumliche Position bestimmt, d.h. ihre Position entlang der anterior-posterioren und dorso-ventralen Achse. Die Identität der Vorläuferzellen wird durch Signale spezifiziert, die in konzentrationsabhängiger Art und Weise wirken. Im Rhombenzephalon und im Rückenmark werden ventral ‚*sonic hedgehog*‘ Protein (Shh) und dorsal ‚*bone morphogenic*‘ Proteine (BMP) produziert. Diese Proteine kontrollieren konzentrationsabhängig die Expression von Musterbildungsgenen in den

Vorläuferzellen. Dies führt zur Ausbildung unterschiedlicher Domänen in der Ventrikularschicht des Rückenmarks, die jeweils in Streifen angeordnet sind (Lee and Jessell 1999; Briscoe et al. 2000; Jessell 2000). Bestimmte Vorläuferzell-Streifen generieren dann jeweils bestimmte postmitotische Neuronentypen. Obwohl die Musterbildungsgene nicht mehr in den postmitotischen Neuronen exprimiert werden, geben sie das weitere Differenzierungsprogramm der Nervenzellen vor. Sie sind dafür verantwortlich, dass ein neues, spezifisches Set von Transkriptionsfaktoren in den postmitotischen Zellen exprimiert wird. Lbx1 ist ein solcher Faktor, der in postmitotischen Nervenzellen erscheint. Lbx1+ Neurone entstehen aus einer mittleren Domäne, der ventralen Flügelplatte, und ihre Bildung ist unabhängig von ventralen und dorsalen Signalen. Im Rückenmark und im Rhombenzephalon entstehen sie aus Pax7+ Vorläuferzellen, wobei ein Teil der Lbx1+ Zellen von einer Mash1+/Pax7+ Vorläuferdomäne gebildet werden.

Mash1 gehört wie Math1, Neurogenin1 und 2 zu den proneuralen Genen. Mash1 war das erste Säugerhomolog der *achaete scute* Gene aus *Drosophila*. *Achaete scute* Gene kontrollieren bereits in der Fliege die Entwicklung sensorischer Neurone (Ghysen and Dambly-Chaudiere 1990; Guillemot et al. 1993). Diese Transkriptionsfaktoren induzieren den Austritt aus dem Zellzyklus und den Beginn der Differenzierung. Die sogenannten postmitotischen Transkriptionsfaktoren erscheinen erstmals in postmitotischen Nervenzellen und kontrollieren ihre weitere Differenzierung.

Die molekularen Mechanismen, die die Bildung und Differenzierung von Motorneuronen im Rückenmark steuern, sind gut untersucht. Die Vorläuferdomäne im ventralen Neuralrohr, in der die Motoneurone gebildet werden, wird durch Shh induziert. Die Vorläuferzellen exprimieren Ngn2, Olig2 und Nkx2. Ngn2 kontrolliert das Einleiten der neuronalen Differenzierung. Olig2 und Nkx2 kontrollieren die Spezifizierung des neuronalen Zelltyps, der aus der Vorläuferdomäne hervorgeht und bestimmen so, daß Motoneuronen und kein anderer Neuronentyp gebildet wird (Pattyn et al. 2003). Die postmitotischen Transkriptionsfaktoren Is11 und Lhx3 werden in den neu gebildeten Motoneurone induziert und kontrollieren wiederum die Expression der Transkriptionsfaktoren Hb9, Is11, Lhx3 und Hb9. Sie bestimmen dann verschiedene Aspekte der weiteren Differenzierung der Motoneurone, wie z.B. ihr

Projektionsmuster oder das Set von Neurotransmittern, das von der Zellen produziert wird (Thaler et al. 2004).

Anders als *Isl1* oder *Lhx3* ist *Lbx1* als früher postmitotischer Transkriptionsfaktor für die Differenzierung mehrerer Neuronentypen notwendig. Anhand der *Lbx1* Expression können die neugeborenen Neurone der Flügelplatte in zwei unterschiedliche Klassen (A und B) eingeteilt werden. Die dorsal entstehenden Neurone der Klasse A exprimieren kein *Lbx1*, während die ventral entstehenden Neurone der Klasse B *Lbx1* exprimieren.

Im gesamten Rückenmark können während der ersten Welle der Neurogenese (E10-E11) drei Typen von *Lbx1*+ Nervenzellen unterschieden werden (Gross et al. 2002; Müller et al. 2002). Im Rhombenzephalon ist ihre Anzahl in den einzelnen Rhombomeren unterschiedlich, d.h. im siebten Rhombomer existieren drei, und im zweiten bis sechsten Rhombomer vier Typen von *Lbx1*+ Nervenzellen. Die unterschiedlichen Nervenzellen des dorsalen Rückenmarks gebildet werden werden im gesamten einheitlich Rückenmark beobachtet. Im Rhombenzephalon konnte ich dagegen Rhombomer-abhängige Unterschiede beobachten. So exprimieren z.B. die B3 Neurone im zweiten bis fünften Rhombomer kein *Brn3a*, und die im sechsten und siebten Rhombomer *Brn3a*. Im Vergleich zum Rückenmark wird also im Rhombenzephalon eine größere Anzahl unterschiedlicher Nervenzelltypen gebildet; die Unterschiede sind jeweils typisch für Rhombomere bzw. Rhombomer-Klassen. Das Rhombenzephalon ist in seiner Funktion und Anatomie komplexer als das Rückenmark und die größere Anzahl von Nervenzelltypen war deshalb zu erwarten.

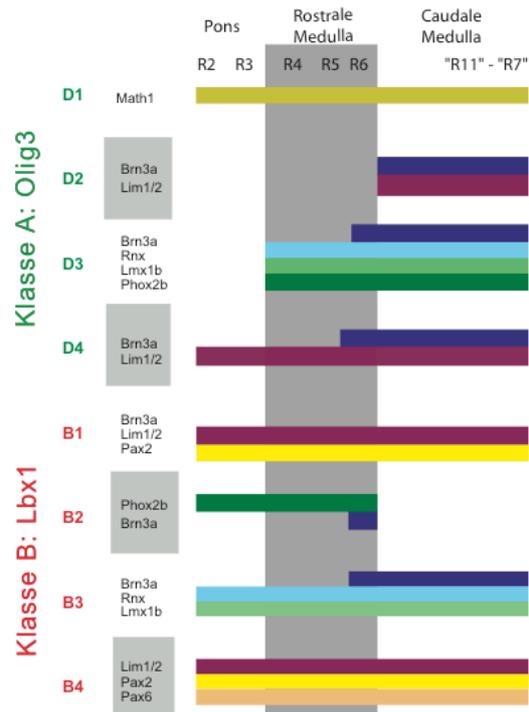


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der postmitotischen Neurone am Tag E11 der Entwicklung in Rhombenzephalon. In den Rhombomeren zwei bis sieben können zwei Klassen von postmitotischen Neuronen unterschieden werden Klasse A (D1 bis D4) exprimiert Olig3 und Klasse B (B1 bis B4) exprimiert Lbx1. Durch differenzielle Expression von Transkriptionsfaktoren im siebten Rhombomer können drei unterschiedliche Lbx1+ Neurone und in den anderen Rhombomeren vier unterschiedliche Lbx1+ Neurone beobachtet werden

Wie im Rückenmark kann auch im Rhombenzephalon eine frühe und späte Welle der Neurogenese in der Flügelplatte unterschieden werden. Im Rückenmark ist die späte Welle dadurch gekennzeichnet, dass nur noch zwei unterschiedliche Lbx1+ Nervenzelltypen entstehen, die in einem Salz-und-Pfeffer-Muster gebildet werden. Auch im siebten Rhombomer entstehen die späten Lbx1+ Nervenzellen in einem Salz-und-Pfeffer-Muster. In anderen Rhombomeren existiert aber kein offensichtlicher Unterschied zwischen der frühen und späten Welle, d.h. früh und spät entstehen vier unterschiedliche Lbx1+ Nervenzelltypen an spezifischen Positionen entlang der dorso-ventralen Achse.

Aufgrund der Unterschiede in der Neurogenese können die Rhombomere in Gruppen eingeteilt werden. Rhombomer eins ist in mehrfacher Hinsicht speziell und produziert keine Lbx1+ Neurone. Die meisten Neurone des ersten Rhombomers bilden das Cerebellum. Im zweiten und dritten Rhombomer wird ein identisches Set von

Nervenzellen geboren, die sich von denen des Rhombomers vierten bis sechsten unterscheiden können (z.B. unterschiedliche A3 Neurone). Rhombomer zweit und drei bilden die Brücke (Pons), und die Rhombomere viert bis sechs die rostrale Medulla oblongata. Das siebte Rhombomer ähnelt in vielem dem Rückenmark, z.B. produzieren beide nur drei Arten von Lbx1+ Neurone während der frühen Welle der Neurogenese, und in beiden verläuft die späte Welle ähnlich. Das siebte Rhombomer wird zur kaudalen Medulla oblongata.

#### ***4.2 Lbx1 und die Spezifizierung von Interneuronen im Rhombenzephalon***

In meiner Arbeit habe ich die Funktion von Lbx1 in der Entwicklung sensorischer Interneurone im Rhombenzephalon untersucht. In Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren wurden Veränderungen in der Spezifizierung der Klasse B Neurone beobachtet. Die früh geborenen Klasse B Neurone exprimieren in Lbx1<sup>-/-</sup> Embryonen ektopisch Olig3, wie dies normalerweise in Neuronen der Klasse A beobachtet wird. Veränderte Spezifizierung im dorsalen Rhombenzephalon wurden bereits in anderen mutanten Mausstämmen beobachtet. In Hoxa3/Hoxb3 mutanten Tieren werden A3 Neurone, die normalerweise zu (nor)adrenergen Nervenzellen differenzieren, im Rhombomer fünf falsch spezifiziert. Die falsch spezifizierten Neurone in den Mutanten ähneln den benachbarten A4 Zellen. In Hoxb1<sup>-/-</sup> Tieren wird ein analoger Identitätswechsel von A3 Neuronen in den Rhombomeren vier und sechs beobachtet (Gaufo et al. 2004).

In den Lbx1 mutanten Tieren wird allerdings nicht nur ein einzelner Neuronentyp falsch spezifiziert, sondern alle Klasse B Neurone zeigen ein verändertes Transkriptionsfaktor-Profil. Außerdem wird nicht das Schicksal einer direkt benachbarten Nervenzelle angenommen. Zum Beispiel exprimieren die falsch spezifizierten B1\* Zellen in Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren ektopisch die gleichen Transkriptionsfaktoren wie A2 Neurone (siebte Rhombomer), oder die falsch spezifizierten B2\* Neurone die Transkriptionsfaktoren von A3 Neuronen (vierte bis sechste Rhombomer).



Abb. 4.2: Schematische Darstellung der am Tag E11 beobachteten Identitätswechsel im zweiten, vierten und siebten Rhombomer und Rückenmark.

Ähnliche Wechsel der Spezifizierung waren zuvor im Rückenmark beobachtet worden (Gross et al. 2002; Muller et al. 2002), d.h. auch im Rückenmark exprimieren die falsch spezifizierten Nervenzellen der Klasse B die Transkriptionsfaktor-Profile von Nervenzellen der Klasse A. Während in Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren die beobachteten Identitäts-Wechsel im gesamten Rückenmark einheitlich sind, trifft dies nicht auf das Rhombenzephalon zu. Stattdessen sind die Veränderungen in unterschiedlichen Rhombomer-Gruppen unterschiedlich. Innerhalb einer Rhombomergruppe (vgl. Abb. 1.2. und 4.1) sind die Wechsel der Identität eines Nervenzelltyps allerdings immer einheitlich (Zusammenfassung in Abb. 4.2).

Die Veränderungen in der Genexpression, die in Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet werden, weisen darauf hin, dass Lbx1 als transkriptioneller Regulator fungiert. So werden Transkriptionsfaktoren wie Olig3, Phox2b und Lmx1b in den falsch spezifizierten Klasse B\* Neuronen ektopisch exprimiert. Lbx1 scheint also die Expression dieser Gene zu inhibieren, falls die beobachteten Veränderungen auf direkte Effekte zurückzuführen sind. Andere Transkriptionsfaktoren wie Pax2 werden in den Lbx1<sup>-/-</sup>

Tieren nicht exprimiert, Lbx1 scheint also die Expression des Pax2-Gens zu aktivieren. Weitere Analysen sind nötig, um die Frage zu klären, welche dieser Genen von Lbx1 direkt reguliert werden.

### **4.3 Lbx1 und die späte Neurogenese**

Nur im siebten Rhombomer werden in einer späten Welle der Neurogenese Nervenzellen durch einen neuen Mechanismus spezifiziert, und zwei unterschiedliche Neuronentypen, LA und LB, in einem Salz-und-Pfeffer-Muster gebildet. Beide, LA und LB, werden in Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren falsch spezifiziert. Die LA\* Neurone verlieren Pax2, während die LB\* Neurone ektopisch Phox2b exprimieren. Damit exprimieren LB\* und A3 Neurone die gleichen Transkriptionsfaktoren, und beide differenzieren zu Nervenzellen des *Nucl. solitarius*. Die neue Identität der LA\* Neurone entspricht aber keinem der normalerweise gebildeten Nerventypen in diesem Rhombomer, und in ihrer weiteren Entwicklung tragen LA\* Neurone nicht erkennbar zu einer bestimmten Struktur bei. Neben den definierten Strukturen und Kernen existiert im Rhombenzephalon auch die sogenannte *Formatio reticularis*. Sie ist pränatal noch nicht morphologisch noch nicht voll ausgebildet und zudem molekular nicht untersucht. Beides erschwert die histologische Untersuchung der *Formatio reticularis* in Lbx1<sup>-/-</sup>, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese ektope Zellen zur *Formatio reticularis* beitragen.

Wie im siebten Rhombomer werden auch im Rückenmark die spätgeborenen Neurone in den Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren falsch spezifiziert. Die falsch spezifizierten LA Neurone des Rhombenzephalons und dIL<sup>A</sup> Neurone des Rückenmarks verändern sich in der gleichen Weise, d.h. sie exprimieren ein identisches Set von Transkriptionsfaktoren. Die falsch spezifizierten LB\* Neurone des Rhombenzephalons und dIL<sup>B\*</sup> Neurone des Rückenmarks verändern sich aber in unterschiedlicher Weise: LB\* Neurone exprimieren ektopisch Phox2b, und dIL<sup>B\*</sup> Neurone Is11/2.

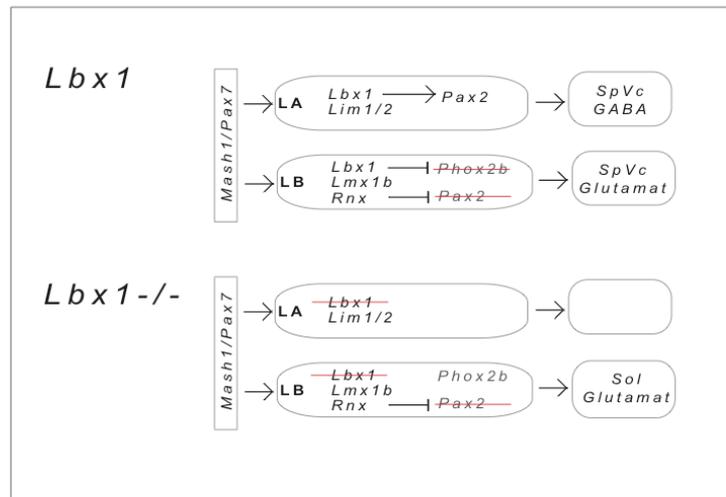


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Spezifizierung spätgeborener Interneurone in Wildtyp (a) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> (b) Tieren. *Lbx1* ist notwendig für die Bildung GABAerger und glutamaterger Interneurone. SpVc Nucl. spinalis caudalis n. trigemini, Sol Nucl. solitarius

Spät geborene dL<sup>B</sup> und LB Neurone des Rückenmarks und des Rhombenzephalons entwickeln sich auch in *Rnx*<sup>-/-</sup> Tieren abnormal. In *Rnx*<sup>-/-</sup> Tieren wurden zusätzliche, ektopische GABAerge Interneurone im SpVc des Rhombenzephalons und im dorsalen Horn des Rückenmarks beobachtet. Gleichzeitig wurden weniger glutamaterge Interneurone gebildet. Die Überexpression von *Rnx* im Hühnchen führte dazu, dass vermehrt glutamaterge Neurone und eine zu geringe Anzahl GABAerger Neurone gebildet wird. *Rnx* induziert also die Differenzierung zu glutamatergen Interneuronen und inhibiert eine Differenzierung zu GABAergen Neuronen. Die differenzielle Expression von *Rnx* in nur einem der beiden spätgeborenen Nervenzelltypen, LB, erlaubt, dass diese Zellen glutamaterge Nervenzellen bilden, während die *Rnx*-negativen LA Zellen zu GABAergen Nerven differenzieren (Cheng et al. 2004). *Lbx1* wirkt oberhalb von *Rnx* in der Differenzierungskaskade und ist für die Spezifizierung beider Neuronentypen, LA und LB, notwendig.

#### 4.4 Terminaldifferenzierung der falsch-spezifizierten Nervenzellen

In *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren konnte ich nicht nur zeigen, dass Neurone der Klasse B falsch spezifiziert werden und die gleiche Kombination von Transkriptionsfaktoren

exprimieren, wie dies normalerweise in Neuronen der Klasse A beobachtet wird. In ihrer weiteren Differenzierung verhalten sich diese falsch-spezifizierte Neurone dann auch so, wie das Nervenzellen der Klasse A normalerweise tun. Zum Beispiel exprimieren B1\* Neurone in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren die gleichen Transkriptionsfaktoren wie A2 Neurone. wie diese wandern sie in die Anlage der *Oliva inferior* und differenzieren zu Nervenzellen der *Oliva inferior*. Neurone der *Oliva inferior* sind die einzigen Neurone des Rhombenzephalons, deren Axone als Kletterfasern in das Kleinhirn projizieren, und in diesen Axonen ist TrkB und TrkC vorhanden. In den *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren exprimieren auch die zusätzlichen Neurone der *Oliva inferior* TrkB und TrkC. Ein weiteres Beispiel sind die falsch spezifizierte B2\* und B3\* Neurone von *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren, die wie A3 Zellen zu (nor)adrenergen Nervenzellen differenzieren und in den (nor)adrenergen Zentren des Rhombenzephalons auftauchen. Im Rückenmark von *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren war zuvor auch beobachtet worden, dass Neurone der Klasse B falsch spezifiziert werden. Dort starben aber die meisten der falsch spezifizierten Nervenzellen wenige Tage nach ihrer Geburt, und ihre Terminaldifferenzierung konnte deshalb nicht verfolgt werden (Gross et al. 2002; Müller et al. 2002).

Während der normalen Entwicklung wird ein bestimmter Nervenzelltyp zu einem bestimmten Zeitpunkt und an einer bestimmten Position entlang der anterior-posterioren und dorso-ventralen Achse geboren. Ich konnte in *Lbx1* Mutanten Tieren beobachten, dass durch die falsche Spezifizierung bestimmte Nervenzellen am falschen Ort entstanden, aber trotzdem an der normalen Entwicklung partizipieren konnten. So bilden die A2 Neurone Nervenzellen des siebten Rhombomers die *Oliva inferior*. In der *Lbx1* Mutante entstehen an einem weiter ventral gelegenen Ort Neurone, die das Transkriptionsfaktor-Muster der A2 Zellen exprimieren. In *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren erscheinen also an zwei unterschiedlichen Orten A2 bzw. A2-ähnliche Zellen, und beide bilden nun die *Oliva inferior*. Die *Oliva inferior* ist deshalb in den *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren stark vergrößert.

Während der Entwicklung des Rhombenzephalons existiert nicht nur räumliche, sondern auch zeitliche Plastizität. A3 Zellen bilden normalerweise den *Nucl. solitarius*. In *Lbx1* Mutanten exprimieren die falsch spezifizierten LB\* Neurone das

Transkriptionsfaktor-Muster der A3 Neurone, die bereits zwei Tage zuvor gebildet worden waren. Trotzdem verhalten sich diese LB\* Neurone in ihrer weiteren Entwicklung wie A3 Zellen, und sie wandern dahin, wo der *Nucl. solitarius* gebildet wird. Zeitliche und räumliche Plastizität existiert also, aber Rhombomergrenzen werden eingehalten. So konnte ich in keinem Fall beobachten, dass falsch-spezifizierte Zellen zu Strukturen in einem benachbarten Rhombomer beitragen.

#### **4.5 Entwicklung der Rhombenzephalonkerne**

In der Entwicklung des Rhombenzephalons ist oft ungeklärt, in welchen Positionen entlang der dorso-ventralen Achse die Neurone der unterschiedlichen Kerne entstehen. Meine systematische Charakterisierung der Neuronentypen, die im dorsalen Rhombenzephalon entstehen, und die Analyse des Lbx1<sup>-/-</sup> Phänotyps können dazu beitragen, offene Fragen zu klären. Neurone der Klasse B werden in Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren wie die der Klasse A spezifiziert und differenziert. Dies führt dazu, dass vermehrt Klasse A Zellen entstehen und Kerne, die sich aus diesen entwickeln, vergrößert sind. Stattdessen fehlen in den Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren dann die Kerne, die von den Neuronen der Klasse B normalerweise gebildet werden.

Die *Oliva inferior*, ein präcerebellärer Kern, übernimmt eine wichtige Funktion bei der Koordinierung von Bewegungen: die Axone ihrer Nervenzellen bilden die Kletterfasern. Es ist bekannt, dass die *Oliva inferior* in der kaudalen *Medulla oblongata* aus dorsal geborenen Brn3<sup>+</sup> Neuronen entsteht (de Diego et al. 2002). Im siebten Rhombomer exprimieren alle vier Neuronentypen der Klasse A Brn3a. Aus welchem der vier sich die *Oliva inferior* entwickelt, konnte ich durch einen Vergleich von Wildtyp und Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren bestimmen. Meine Daten zeigen, dass A2 Zellen normalerweise die *Oliva inferior* bilden, und diese in Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren durch die ektopisch differenzierten B1\* Zellen vergrößert ist.

Die viscerosensorischen Fasern aus dem Körper und der Zunge projizieren auf den *Nucl. solitarius*. In Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren ist der *Nucl. solitarius* verändert. Meine Untersuchungen zeigen, dass die A3 und die falsch-spezifizierten B3\* und LB\* im

siebten Rhombomer glutamaterge Neurone des *Nucl. solitarius* bilden. In den Rhombomeren vier bis sechs bilden die A3 und die falsch-spezifizierten B3\* die (nor)adrenergen die Zentren A1/C1 und A2/C2. So dass im *Nucl. solitarius* der Lbx1 mutanten Tieren ektopischen glutamatergen Neurone und in die Zentren A1/C1 und A2/C2 ektopische (nor)adrenerge Neurone zu beobachten sind. GABAerge Neurone des *Nucl. solitarius* werden durch die B1 Zellen gebildet. Diese Zellen werden in Lbx1 mutanten Tieren falsch spezifiziert, so dass sie ektopisch zu Neuronen der *Oliva inferior* differenzieren, infolge dessen fehlen in Lbx1 mutanten Tieren die GABAergen Neurone des *Nucl. solitarius*.

Das sensorische Kerngebiet des *Nervus trigeminus* ist in fünf Abschnitte gegliedert. Jeder Teil übernimmt eine jeweils charakteristische Funktion in der Verarbeitung der somatosensorischen Information des Kopfes (Olszewski J 1982). Im **Nucl. spinalis caudalis** (SpVc) enden Fasern, die Schmerz- und Temperaturempfinden des Gesichtes vermitteln. Ich konnte zeigen, dass sich der SpVc aus den beiden spät geborenen Lbx1+ Neuronentypen (LA und LB) des siebten Rhombomers entwickelt. In *Nucleus principalis* enden vorwiegend propriorezeptive Fasern des *Nervus trigeminus*. Der *Nucl. principalis* wird von spät geborenen A3 Nervenzellen gebildet, die im zweiten und dritten Rhombomer spät geboren werden.

Zusammenfassend konnte ich also zeigen, dass die dorsalen A1 und A2 Neurone precerebelläre Kerne bilden. Axone der A1 Nervenzellen bilden Moosfasern, und die Axone der A2 Neurone (*Oliva inferior*) die Kletterfasern. A3 Neurone bilden in Rhombomer sieben Neurone, die glutamatergen Neurone, die viscerosensorische Informationen verarbeiten (*Nucl. solitarius*), und in Rhombomer vier bis sechs (nor)adrenerge Zellen. Ventral davon werden am Tag 10 GABAerge Neurone geboren und spät die Neurone des SpVC und *Nucl. principalis*, die somatosensorische Informationen verarbeiten.

#### **4.6 Normale Entwicklung von Lbx1+ Neuronen im Rhombenzephalon**

Welche reifen Strukturen die frühen Lbx1+ Neurone annehmen, konnte ich nicht in allen Fällen aufklären. So waren die B1-B4 Zellen in den Rhombomeren zwei bis sieben in Lbx1<sup>-/-</sup> Tieren falsch spezifiziert. Nur für die B1 Neurone im siebten Rhombomer konnte ich zeigen, dass sie die GABAergen Neurone der *Nucl. solitarius* bilden. Für die spät geborenen Neuronen Typen konnte ich zeigen, dass sowohl die LA als auch die LB Neurone zu Nervenzellen des SpVc differenzieren und von den späten B2 Zellen konnte ich zeigen dass sie zu Nervenzellen des *Nucl. principalis* differenzieren. Das Schicksal der anderen Lbx1+ Neuronentypen konnte ich nicht aufklären.

Die Beobachtung der Zellschicksale der frühen Lbx1+ Neurone wird durch mehrere Faktoren erschwert. Nicht alle Neurone behalten während der gesamten Differenzierung die Expression von Lbx1 bzw. eines Lbx1-spezifisch exprimierten Reportergens bei. Dadurch können diese Neurone zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr detektiert werden. Einzelne Neuronentypen können sich auf unterschiedliche Kerne verteilen, und nur einen Teil einer bestimmten Struktur bilden. Der Verlust eines (kleinen) Anteils ist weniger offensichtlich, und kann histologisch schwer nachweisbar sein.

Das Cre-LoxP System wird seit einiger Zeit eingesetzt, um „Lineage-Analysen“ durchzuführen, und wäre eine geeignete Methode, die weitere Entwicklung der Lbx1 Neurone zu verfolgen. Dabei wird die Cre-Rekombinase spezifisch, zum Beispiel unter Kontrolle des Lbx1 Promoters, in einem frühen Entwicklungsstadium exprimiert. Die Rekombinase deletiert in Zellen, die Cre-Protein exprimieren, DNA Abschnitte die von LoxP-Sequenzen flankiert werden. Cre kann dazu eingesetzt werden, ein Stopkodon zu deletieren, das die Transkription eines Reporterproteins verhindert. Nach Rekombination wird der Reporter dann exprimiert. Damit lassen sich alle Zellen markieren, die zu einem früheren Zeitpunkt in ihrer Entwicklung Cre (und damit Lbx1) exprimierten. Dies wäre eine gute Methode um das Schicksal der unterschiedlichen Neuronentypen im Rhombenzephalon herauszufinden.