

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors Mash1 in der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks untersucht. Dabei zeigte sich: Mash1 besitzt eine duale Funktion, daß heißt, Mash1 wird sowohl für die Neurogenese als auch für die Spezifizierung von dorsalen Neuronen benötigt. Zudem verändert sich die Funktion von Mash1 im Verlauf der Neurogenese. Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich daher wie folgt:

- Charakterisierung der Mash1 Expression im dorsalen Rückenmark (3.1 und 3.2)
- Analyse der proneuralen (Neurogenese fördernden) Funktion von Mash1 (3.3)
- Analyse der Funktion von Mash1 in der Spezifizierung von früh (3.4.1) und spät (3.4.2) geborenen dorsalen Neuronen
- Analyse der funktionellen Defizite des spinalen Reflexbogens von neugeborenen Mash1 mutanten Mäusen (3.5)

3.1 Mash1/Cash1 Expression im Rückenmark von Maus- und Hühnerembryonen

Während der ersten Phase der Neurogenese (E10 - E11.5; E = Tag der Embryonalentwicklung) werden sechs Typen von dorsalen Interneuronen (dI1-6) im dorsalen Rückenmark der Maus geboren, die an immer gleichen Positionen entlang der dorso-ventralen Achse in einem Streifenmuster entstehen. Drei dieser Neuronentypen (dI3-5) werden von der Mash1-positiven Vorläuferdomäne gebildet (Abb. 3.1 A). Zwei dieser drei Neuronentypen exprimieren den Transkriptionsfaktor Tlx3 (dI3 und dI5). Sie können aber unterschieden werden: dI5, aber nicht dI3 Zellen sind Lbx1-positiv. Der dritte Interneuronentyp (dI4) ist durch die Expression von Pax2 und Lbx1 gekennzeichnet. Am elften Tag der Embryonalentwicklung löst sich das Streifenmuster langsam auf und damit beginnt die zweite neurogene Phase (E11.5 - E14). Die Mash1 positive Vorläuferdomäne wird breiter, und Pax2+ / Lbx1+ (dILA) und Tlx3+ / Lbx1+ (dILB) Neurone werden von der gesamten Mash1 positiven Domäne produziert (Abb. 3.1 B). Am Tag 12 der Embryonalentwicklung werden im dorsalen Rückenmark hauptsächlich diese dILB und dILA Neurone gebildet, die in einem Salz-und-Pfeffer-Muster entstehen (Abb. 3.1 C). Die relative Häufigkeit von neugeborenen dILA und dILB Neuronen variiert im Verlauf der zweiten neurogenen

Phase, ist aber zu einem gegebenen Zeitpunkt in verschiedenen Individuen konstant (Tabelle 1). Die Zahl der spät geborener dorsalen Neurone ist deutlich größer als die Zahl der früh geborenen, und sie bilden somit die Mehrzahl der Neurone des dorsalen Horns (Gross et al. 2002; Muller et al. 2002; Cheng et al. 2004).

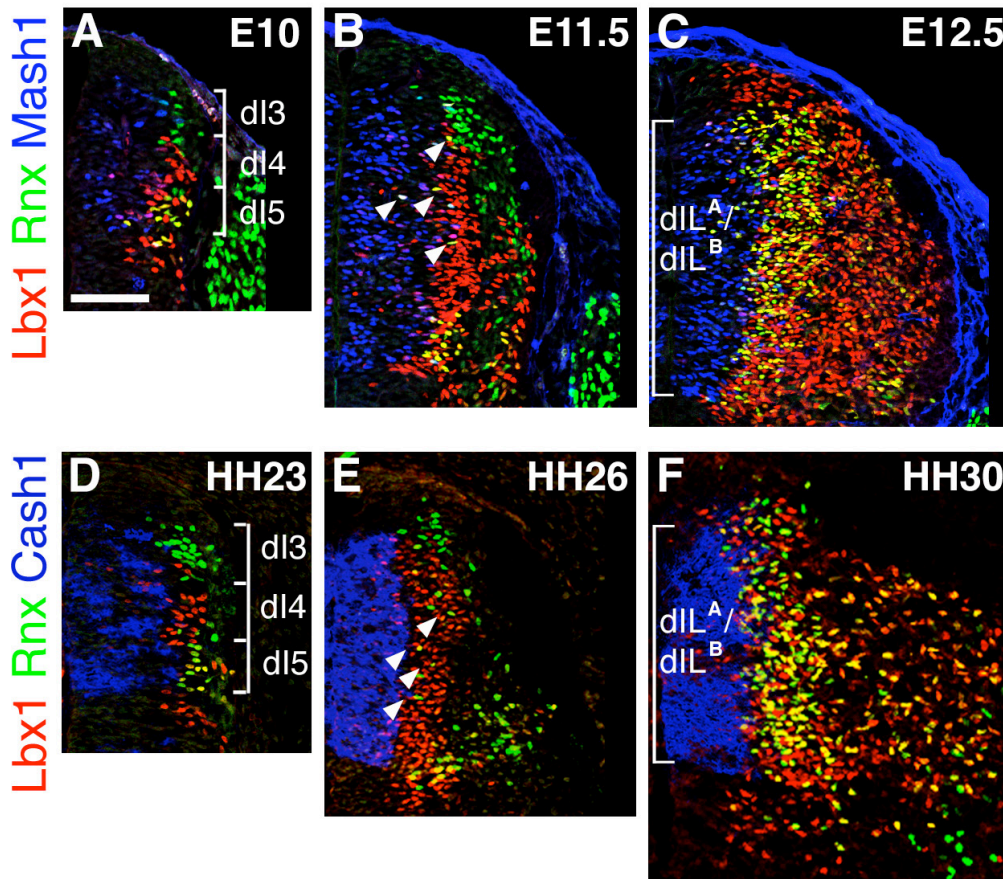


Abb. 3.1 Mash1/Cash1 wird in der Vorläuferdomäne von dl3-5 und dILA und dILB Neuronen exprimiert.

(A-C) Immunhistologische Analyse von murinen Wildtyp-Rückenmarksschnitten zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten zwischen E10 und E12,5 mit Antikörpern gegen Tlx3 (rot), Lbx1 (grün) und Mash1 (blau). (D-E) Immunhistologische Analyse auf Rückenmarksschnitten von Hühnerembryonen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten zwischen HH23 und HH30 mit Antikörpern gegen Tlx3 (rot), Lbx1 (grün) und *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde gegen *Cash1* (blau). Das einem Konsekutiv-Schnitt entsammende *in situ* Signal wurde in ein blaues Signal umgewandelt und mit dem Immunfluoreszenz-Signal zu einer Abbildung fusioniert.

(A, D) Während der ersten Phase der Neurogenese werden drei verschiedene dorsale Interneuronentypen aus der Mash1+/Cash1+ Vorläuferdomäne heraus geboren. Zwei davon sind Tlx3+ (dl3 und dl5). (B, E) Der Beginn der zweiten neurogenen Phase (E11,5 bzw. HH26) ist durch das vereinzelte Auftreten von Tlx3+/Lbx1+ Neuronen zwischen den dl3 und dl5 Bereichen gekennzeichnet. (C, F) Während des Höhepunktes der zweiten Phase der Neurogenese (E12,5 bzw. HH30) gehen Tlx3+/Lbx1+ und Tlx3-/Lbx1+ Neurone in einem Salz-und-Pfeffer-Muster aus der gesamten Mash1+ bzw. Cash1+ Vorläuferdomäne hervor. Balken:100μm

Im Huhn entstehen dorsale Neurone des Rückenmarks in einem identischen Muster. Am Tag 4 der Embryonalentwicklung des Huhns (Hamburger Hamilton Stadium 23, HH23) können sechs dorsale Neuronen-Typen beobachtet werden (dI1-6), die wie in der Maus am Tag 10 der Entwicklung in einem Streifenmuster entstehen. dI1-6 Neurone exprimieren das gleiche Set von Transkriptionsfaktoren im Huhn und in der Maus (s.a. (Muller et al. 2002)). *Cash1* kodiert für das *Mash1* Homolog im Huhn. Wie in der Maus produziert die *Cash1*-positive Vorläuferdomäne im Hühnerembryo dI3-dI5 Neurone (Abb. 3.1 D). Die zweite neurogene Phase beginnt am fünften Tag der Entwicklung des Huhns (HH26) (Abb. 3.1 E). Am Tag 6 der Embryonalentwicklung (HH29) entstehen dann hauptsächlich dILA und dILB Neurone im Salz-und-Pfeffer-Muster, und auch im Huhn exprimieren diese Neuronentypen Pax2 und Lbx1 bzw. Tlx3 und Lbx1 (Abb. 3.1 F). Die beiden Phasen der Neurogenese verlaufen also auf identische Art und Weise im Huhn und in der Maus.

Stadium	dILA:dILB
E 11.75	1.3 ± 0.12
E 12.0	1.01 ± 0.14
E 12.5	0.74 ± 0.08
E 13.5	0.88 ± 0.06

Tabelle 1 An den angegebenen Stadien der Mausentwicklung wurde das Verhältnis der Anzahl der neugeborenen dILA zu dILB Neuronen bestimmt. Neugeborene dILA und dILB Neurone nahe der Ventrikulärschicht wurden mittels Antikörperfärbung gegen Pax2 und Lmx1b identifiziert, und ihre Anzahl wurde durch das Auszählen von 9-12 Schnitten, die von drei verschiedenen Embryonen stammten, bestimmt. Der angegebene Fehler repräsentiert die Standardabweichung.

3.2 Mash1+ Vorläuferzellen bilden verschiedene Neuronentypen

Die immunhistochemische Analyse mit Antikörpern gegen Mash1 bestätigt, daß das Protein in dem Vorläuferbereich vorhanden ist, der früh die dI3-5 Neurone und spät dILA und dILB Neurone bildet. Weder *Mash1* mRNA noch Mash1 Protein kann aber zu irgendeinem Zeitpunkt in allen Vorläuferzellen in dieser Domäne nachgewiesen werden (Abb. 3.1 A-C). Es könnten also zwei Vorläuferzelltypen existieren, ein Mash1-positiver und ein Mash1-negativer Typ, die jeweils einen der beiden späten

Neuronentypen (dILA oder dILB) produzieren. Mash1 ist in der Vorläuferdomäne nachweisbar, und wird nur sehr selten in postmitotischen Zellen beobachtet. Anhand von immunhistochemischen Färbungen kann also keine Aussage darüber gemacht werden, welche Neuronentypen aus Mash1-positiver Vorläuferzellen entstehen.

Das aus einer Qualle (*Aequorea Victoria*) isolierte *Green Fluorescence Protein* (GFP) wurde bereits in einer Vielzahl von Organismen eingesetzt. Dabei wurde beobachtet, daß GFP oft stabiler als endogene Proteine ist ((Chalfie et al. 1994; Lumpkin et al. 2003)). Ich habe deshalb die *Mash1* kodierende Sequenz gegen *GFP* Sequenzen ausgetauscht und versucht, anhand der GFP Expression das weitere Schicksal von Mash1-positiven Vorläuferzellen zu verfolgen. Dazu etablierte ich ein 'knock-in' Allel von *Mash1* in ES-Zellen und etablierte mit deren Hilfe eine Mauslinie, die GFP statt Mash1 exprimiert (*Mash1^{GFP}*).

3.2.1. Konstruktion des Mash1-GFP Allels

Als erster Schritt wurde ein Targeting-Vektor konstruiert, mit dessen Hilfe *Mash1* durch homologe Rekombination in ES-Zellen verändert werden kann. Als Ausgangsvektor diente dazu ein Plasmid, das ein 13kb langes genomisches Fragment des *Mash1* Gens enthielt. Das offene Leseraster des *Mash1* Gens wurde mittels homologer Rekombination in Bakterien durch das offene Leseraster der *GFP* cDNA ersetzt. Der Targeting-Vektor enthält zusätzlich eine Neomycin-Resistenz-Kassette, die von zwei LoxP Sequenzen umgeben ist und die für die Selektion des homologen Rekombinations-Ereignisses in ES Zellen benötigt wird (Abb. 3.2 A). LoxP Sequenzen werden von der Cre-Rekombinase erkannt; diese Rekombinase entfernt DNA Fragmente, die zwischen zwei LoxP Sequenzen lokalisiert sind.

Nach Elektroporation des Targeting-Vektors in ES-Zellen und anschließender Selektion auf Neomycin-Resistenz wurden 250 ES-Zellklone mittels Southern-Hybridisierung auf homologe Rekombination hin untersucht: 11 homologe Rekombinations-Ereignisse wurden so identifiziert (Abb. 3.2 B). Drei dieser ES-Zellklone wurden in Blastozysten injiziert. Daraus sich entwickelnde chimäre Maus-Böcke wurden mit weiblichen Cre-Deleter Mäusen verpaart, um die Neomycin-Resistenz-Kassette zu entfernen (Schwenk et al. 1995). Die Tiere des Cre-Deleter-

Stamms exprimieren Cre Rekombinase früh in der Entwicklung in allen Zellen: so konnte die von LoxP-Sequenzen flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette entfernt werden. Die chimäre Männchen gaben das veränderte Gen an ihre Nachkommen weiter, und wurden zur Etablierung des *Mash1^{GFP}* Stammes eingesetzt. Die Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette wurde mittels PCR und Southernhybridisierung überprüft.

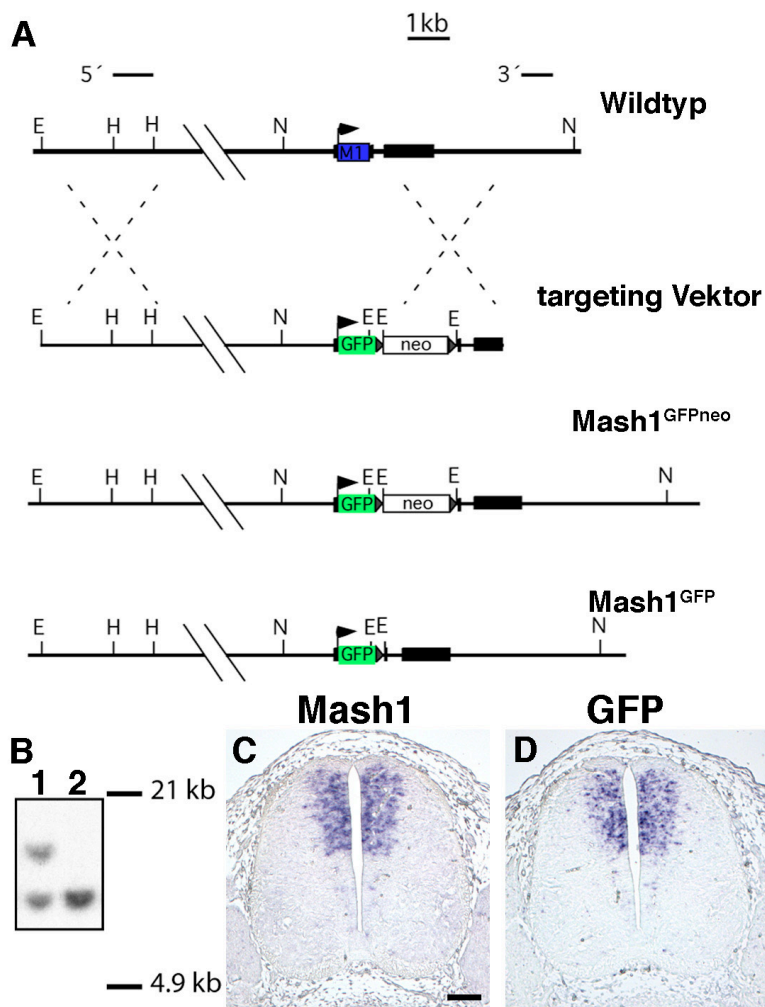


Abb.3.2: Strategie zur Mutagenese des *Mash1*-Gens.

(A) Schematische Darstellung der genomischen Struktur des Wildtyp *Mash1*-Locus, des Targeting-Vektors und des mutierten *Mash1*-Allels (*Mash1^{GFPneo}*) sowie des mutierten *Mash1* Allels nach der Cre vermittelten Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette (*Mash1^{GFP}*). Die Exone 1 und 2 sind schwarz, die *Mash1* kodierende Sequenz blau und die *GFP* kodierende Sequenz grün eingezeichnet. Die Positionen der Neomycin-Resistenz-

Kassette ist angegeben. Die Lage der *Mash1*-Sonden, die zur Southern-Hybridisierung verwendet wurden, sind dargestellt. Die EcoRI- (E), HindIII- (H) und NdeI- (N) Restriktionsschnittstellen sind ebenso wie das *Mash1* Initiationscodon (Pfeil) markiert. (B) Southern-Blot-Analyse von genomischer Wildtyp- (Spur 2) und *Mash1^{GFP/+}* (Spur 1) ES-Zell-DNA nach NdeI-Restriktionsverdau. (C, D) *In situ*-Hybridisierung auf sequentiellen Schnitten eines *Mash1^{GFP/+}* E12.5 Embryos (rechts) mit Sonden die die kodierende Sequenz von *Mash1* (C) bzw. die kodierende Sequenz GFP (D) erkennen. Balken: 100µm.

Die mRNAs, die vom *Mash1^{GFP}*-Allel und vom Wildtyp-*Mash1*-Allel transkribiert werden, sollten hinsichtlich ihrer 5' oder 3' untranslatierten Sequenzen identisch sein. Lediglich die kodierenden Sequenzen unterscheiden sich. Eine unterschiedliche

Verteilung der Mash1- und GFP-Proteine sollte daher nur auf ihre unterschiedliche Stabilität zurückzuführen sein und nicht auf unterschiedliche transkriptionelle oder translationelle Regulation. Um dies zu überprüfen, wurden sequenzielle Schnitte von *Mash1^{GFP/+}* Tieren angefertigt und die Expression der *Mash1* und *GFP* mRNAs mittels in situ-Hybridisierungen verglichen.

Wie in Abbildung 3.2 C und D zu erkennen ist, ist die Verteilung der *Mash1* und *GFP* mRNA identisch. Antikörperfärbungen von Mash1 und GFP zeigen aber einen deutlichen Unterschied in der Verteilung der Proteine. Das Mash1 Protein wird lediglich in der Vorläuferdomäne beobachtet und ist nur selten in Lbx1+ Neuronen zu finden. GFP Protein wird dagegen in Vorläuferzellen und in differenzierten Lbx1+ Neuronen beobachtet (Abb. 3.3 A und B). Die Lokalisation des GFP-Proteins zeigt, daß es stabiler als Mash1 ist und deshalb auch in den differenzierten Neuronen persistiert. Die membranständige Lokalisation von GFP ist auf ein kurzes Signalpeptid zurückzuführen, welches N-terminal mit dem GFP Protein fusioniert ist.

3.2.2 Mash1+ Vorläuferzellen bilden dI3-dI5, dILA und dILB Neurone

Die höhere Stabilität des GFP Proteins ermöglichte es, die neuronalen Produkte der Mash1+ Vorläuferzellen zu identifizieren. Erste Beobachtungen zeigten, daß praktisch alle von der Mash1 Domäne gebildeten Neurone GFP exprimierten. Ich setzte verschiedene Antikörper ein, um die Identität der Lbx1+ und GFP+ Zellen (s. Abb. 3.3 A und B) genau zu bestimmen. Ich konzentrierte mich dabei auf die Analyse der neugeborenen Neurone, die neben der Ventrikularzone lokalisiert sind.

In *Mash1^{GFP/+}* Embryonen des Stadiums E11,0 war GFP in dI3-dI5 Neuronen vorhanden (Abb. 3.3 C,E), während dI2 und dI6 Neurone GFP-negativ waren. Am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung konnte GFP in dILA und dILB Neuronen beobachtet werden (Abb. 3.3 D, F). Daraus lässt sich schließen, daß sowohl dI3-dI5 als auch dILA und dILB Neurone in ihrer Entwicklung eine Mash1+ Phase durchlaufen. Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß Mash1+ Vorläuferzellen dI3-dI5, dILA und dILB Neurone bilden.

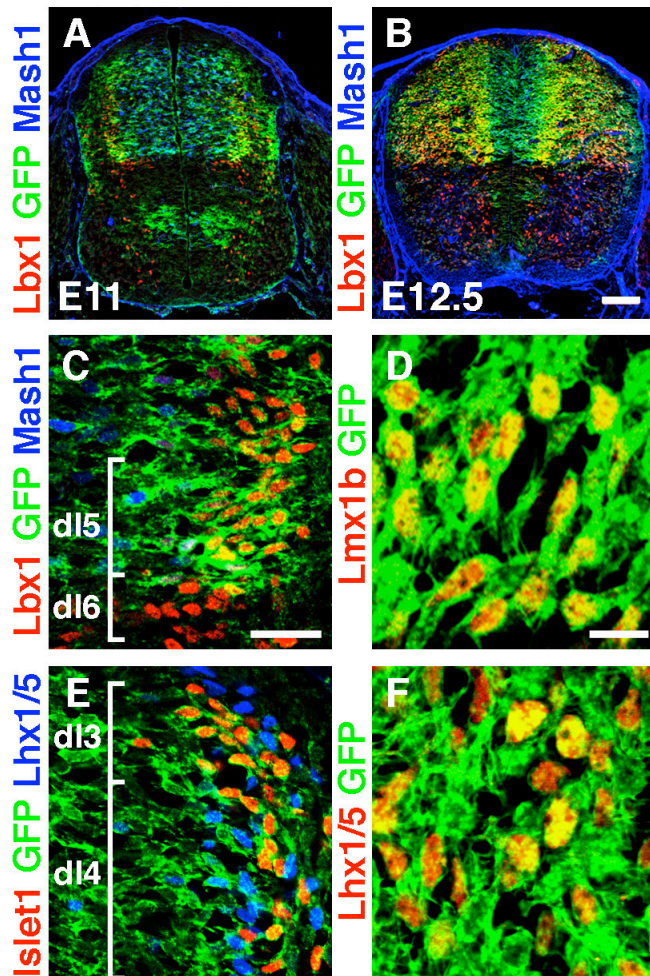


Abb. 3.3 Mash1 wird in Vorläuferzellen exprimiert aus denen dl3-dl5, dILA und dILB Neurone hervorgehen

(A, B) Immunhistologische Analyse der Expression von Lbx1 (rot), GFP (grün) und Mash1 (blau) im Rückenmark von *Mash1^{GFP/+}* Mäusen am Tag E11 (A) und E12,5 (B). GFP ist in beiden Stadien auch in postmitotischen Neuronen nachweisbar. (C, E) Hoch-auflösende immunhistologische Analyse der GFP-, Lbx1- und Mash1 Expression (C) und Islet1 (rot), GFP (grün) und Lhx1/5 (blau) (E) Expression im Rückenmark von E11 Mäusen. (D, F) Hochauflösende immunhistologische Analyse der GFP (grün) und Lmx1b (rot) (D) und GFP (grün) und Lhx1/5 (rot) (F) Expression im Rückenmark von E12.5 Mäusen. Sowohl die spät geborenen Lhx1/5+ (dILA) als auch die die spät geborenen Lmx1b+ (dILB) Neurone sind GFP+ (gelb). Balken: 100μm (A und B), 20μm (C und E) und 10μm (D und F)

3.3 *Mash1* ist ein essentielles proneurales Gen während der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks

Um die Funktion von *Mash1* während der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks zu bestimmen, wurden *Mash1* mutante Mäuse eingesetzt (*Mash1*^{-/-}) und mit Kontrolltieren (wildtyp und heterozygot) des jeweils gleichen Stadiums verglichen. Im *Mash1* Null-Allel wurde die *Mash1* kodierende Sequenz mittels homologer Rekombination durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt (Guillemot et al. 1993). Dieser Mausstamm wurde mir von F. Guillemot zur Verfügung gestellt.

Das Rückenmark *Mash1* mutanter Mäuse wurde mit Antikörpern gegen pan-neurale Antigene wie Tuj1 oder NeuN immunohistochemisch analysiert. Dabei beobachtete ich, daß die Größe der dorsalen Mantelzone am Tag 10.5 in mutanten und Kontroll-Embryonen noch gleich war; beginnend mit Tag 11,5 der embryonal Entwicklung war

die Grösse aber reduziert (Abb. 3.4 A,B, E,F, I,J). Um die Anzahl neugeborener Neurone zu bestimmen, wurde BrdU an verschiedenen Entwicklungsstadien 24 Stunden vor der Präparation der Embryonen in das trächtige Muttertier injiziert. Die Anzahl postmitotischer dorsaler Rückenmarks Zellen wurde bestimmt, wobei postmitotische Zellen entweder als BrdU+/Tuj1+ oder als BrdU+/NeuN+ definiert wurden. Der Vergleich von *Mash1* Mutanten und Kontrolltieren ergab, daß die Anzahl neugeborener dorsaler Neurone in Kontroll- und *Mash1*^{-/-} Tieren am Tag E10,5 vergleichbar war; in den nachfolgenden Stadien war die Zahl der neugeborenen Neuronen in *Mash1*^{-/-} Tieren verringert (Abb. 3.4 C). Der Differenzierungsindex (Anzahl der dorsalen neugeborenen BrdU+ Neurone/ Gesamtzahl der dorsalen BrdU+ Zellen) war im Stadium E10,5 in *Mash1*^{-/-} und Kontrolltieren vergleichbar, in den nachfolgenden Stadien in den *Mash1*^{-/-} Tieren deutlich verringert (Abb. 3.4 D).

Pax7 wird in allen Vorläuferzellen der *Mash1*⁺ Domäne exprimiert. Die Anzahl der dorsalen Rückenmarksvorläuferzellen wurde daher durch die Analyse mit *Pax7* Antikörper bestimmt. Alternativ wurde die Zahl der dorsalen NeuN-/YOPRO+ Zellen bestimmt (YOPRO ist ein fluoreszierender Kernfarbstoff). *Pax7*⁺ Vorläuferzellen waren in *Mash1*^{-/-} und Kontrolltieren im Stadium E10,5 in vergleichbarer Anzahl vorhanden (Abb. 3.4 G). Im Stadium E11,5 und in den nachfolgenden Stadien der Neurogenese war die Zahl der dorsaler Vorläuferzellen in *Mash1*^{-/-} Tieren erhöht (Abb. 3.4 G). Der Poliferationsindex wurde ermittelt, indem dem trächtigen Muttertier zwei Stunden vor der Präparation der Embryonen mit BrdU injiziert wurde und dann die Zahl BrdU+/Zahl *Pax7*⁺ Zellen bestimmt wurde. Der Proliferationsindex zeigte zu keinem der analysierten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen *Mash1* mutanten- und Kontrolltieren (Abb. 3.4 H). *Lbx1* wird in Kontrolltieren von postmitotischen Neuronen und nur vereinzelt von *Pax7*⁺ Vorläuferzellen exprimiert. In *Mash1* mutanten Tieren exprimierten viele *Pax7*⁺ Vorläuferzellen *Lbx1* (Abb. 3.4 K und L). Andere Proteine, wie *Lmx1b*, *Pax2* oder *βIII-Tubulins*, wurde nicht in *Pax7*⁺ Vorläuferzellen von *Mash1* mutanten Embryonen beobachtet.

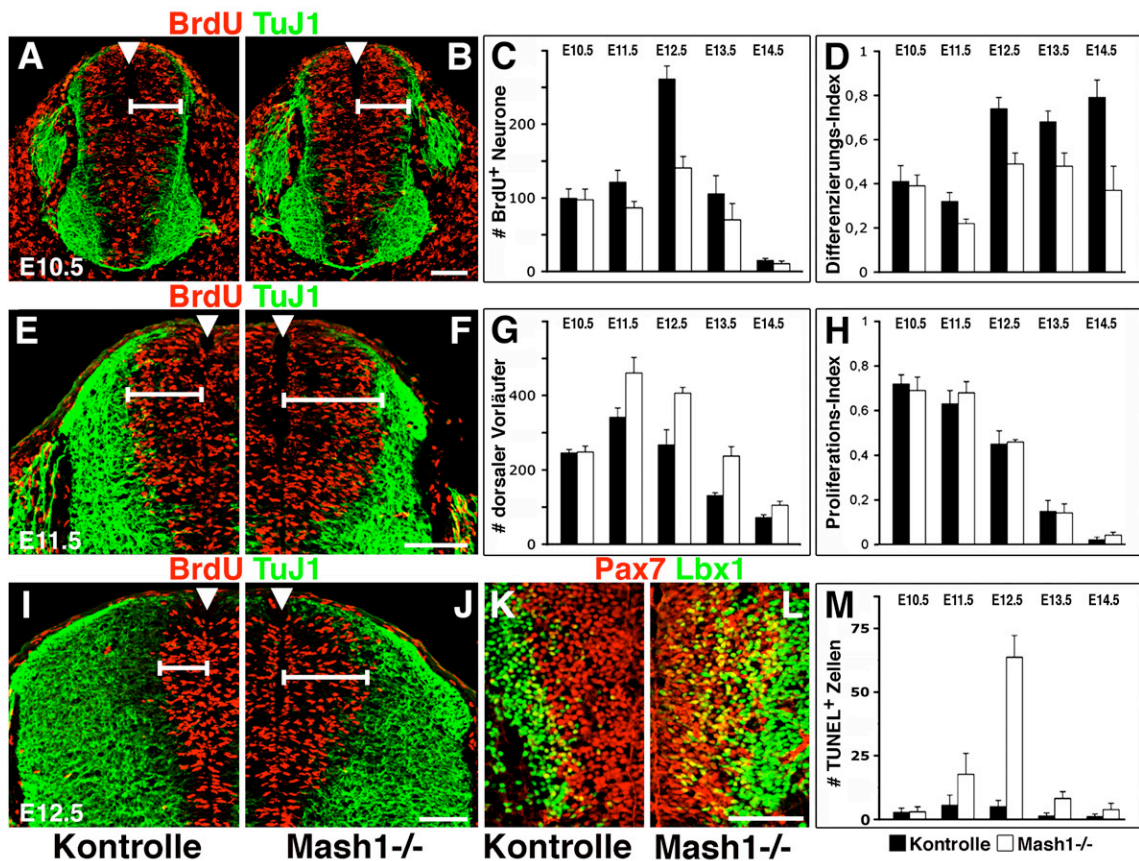


Abb. 3.4 Die proneurale Funktion von Mash1 ist mit dem Beginn der zweiten Phase der Neurogenese (E11.5) essentiell

Neurale Vorläuferzellen sowie differenzierte Neurone wurden durch die Verwendung von Antikörpern gegen BrdU (rot) und gegen das panneuronal exprimierte β III-Tubulin (TuJ1 grün) zu den Stadien E10 (A, B), E11,5 (E, F) und E12.5 (I, J) sichtbar gemacht. Die Vergrößerung der Ventrikularschicht ab E11.5 wurde durch weiße Balken angezeigt. Die Pfeilköpfe deuten auf den Zentralkanal. (K und L) In Kontrolltieren wird die Koexpression von Lbx1 (grün) und Pax7 (rot) nur vereinzelt beobachtet. In *Mash1*^{-/-} Tieren exprimiert eine deutlich erhöhte Anzahl von Pax7⁺ Vorläuferzellen auch Lbx1. (C, D, G, H und M) Quantifizierung des Neurogenese-Phänotyps der *Mash1*^{-/-} Mäuse. Die schwarzen Balken repräsentieren die Werte der Kontrolltiere, die weißen Balken repräsentieren die Werte der *Mash1*^{-/-} Tiere. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken dargestellt. (C) Zu verschiedenen Stadien zwischen E10.5 und E14.5 wurde die Anzahl von dorsalen BrdU⁺/NeuN⁺ Neuronen nach einem 24h BrdU Puls ermittelt. Es zeigte sich ein Verlust von neugeborenen Neuronen in *Mash1*^{-/-} Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren beginnend mit dem Stadium E11.5. (D) Es wurde der Differenzierungsindex (Anzahl der BrdU⁺NeuN⁺ dorsalen Neurone/ totale Anzahl der BrdU⁺ dorsalen neuronalen Zellen) für die angegebenen Stadien ermittelt. (G) Die Bestimmung der Anzahl Pax7⁺ Vorläufer für die angegebenen Stadien ergab einen Anstieg der Anzahl Pax7⁺ Vorläufer in *Mash1*^{-/-} Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren beginnend mit dem Stadium E11.5. (H) Der Proliferationsindex unterschied sich zu keinem der untersuchten Stadien signifikant zwischen *Mash1*^{-/-} Tieren und Kontrolltieren. Der Proliferationsindex wurde bestimmt als Quotient der BrdU⁺ dorsalen Vorläuferzellen nach einem 2 Stunden BrdU Puls und der Gesamtzahl der Pax7⁺ Vorläuferzellen. (M) Anzahl der TUNEL⁺ Kerne in *Mash1*^{-/-} und Kontrolltieren der Stadien E10.5-E14.5. Balken: 100 μ m

Die vergrößerte Anzahl von Vorläuferzellen und die verringerte Anzahl neugeborener Neurone zeigt, daß die Wahrscheinlichkeit, daß eine dorsalen Vorläuferzelle den Zellzyklus verlässt und differenziert, in den *Mash1*^{-/-} Tieren verringert ist. Da die Neurogenese in *Mash1* mutanten und Kontrolltieren zu vergleichbaren Zeitpunkten endet, untersuchte ich, ob die überzähligen Vorläuferzellen durch Apoptose eliminiert werden. Die TUNEL Analyse zeigte eine stark erhöhte Anzahl TUNEL+ Zellen in *Mash1*^{-/-} Embryonen (Abb. 3.4 M).

Mash1 ist also ein essentieller proneuraler Faktor im dorsalen Rückenmark. Die proneurale Funktion von *Mash1* ist erst mit Beginn der zweiten Phase der Neurogenese essentiell. Die reduzierte Differenzierung bei konstanter Proliferationsrate in *Mash1*^{-/-} Mäusen führt zur abnormen Vermehrung von Vorläuferzellen, die dann durch Apoptose eliminiert werden.

3.4. Unterschiedliche Funktionen von *Mash1* während der frühen und späten Neurogenese im dorsalen Rückenmark

Ausser den Effekten von *Mash1* auf die Bildung von Neuronen beobachtete ich auch Veränderungen in der Spezifizierung von Neuronentypen während der ersten und zweiten Phase der Neurogenese. Unter 3.4.1. beschreibe ich die Funktion von *Mash1* in der ersten Phase der Neurogenese, und unter 3.4.2. die Funktion während der späten Neurogenese .

3.4.1.1 *Mash1* ist essentiell für die Bildung der früh geborenen Tlx3+ dI3 und dI5 Neurone

Die Mutation des *Mash1* Gens hat keinen Einfluß auf die Anzahl der frühgeborenen Neurone (s. 3.3). Ich untersuchte im weiteren, ob in *Mash1* mutanten Embryonen die verschiedenen früh geborenen Neuronentypen korrekt spezifiziert werden. Während der ersten Phase der Neurogenese produziert die *Mash1* positive Vorläuferdomäne drei Subtypen von dorsalen Interneuronen (dI3-dI5), von denen zwei, dI3 und dI5, durch die Expression von *Tlx3* gekennzeichnet sind. dI3 Neurone koexprimieren ausserdem *Isl1*, und dI5 Neurone *Lmx1b* (zur Übersicht s. Abb. 3.5 J). Die immunhistochemische Analyse zeigte, daß in *Mash1*^{-/-} Embryonen dI3 und dI5

Neurone in stark verminderter Anzahl gebildet wurden (Abb. 3.5 A-D und I). Die Bildung von dI4 Neuronen, welche durch die Koexpression der Transkriptionsfaktoren Lbx1, Lhx1/5 und Pax2 gekennzeichnet sind, wurde in *Mash1*^{-/-} Tieren hingegen nicht negativ beeinflusst. Vielmehr wurden überzählige dI2 (Lbx1⁻/Lhx1/5⁺; Abb. 3.5 E,F und I) und dI6 Lbx1⁺/Lhx1/5⁺/Pax2⁺ (Abb. 3.5 A,B und I) Neurone gebildet.

Warum entstehen überzählige dI2 und dI6 Neurone auf Kosten der Tlx3⁺ Zellen? Das Schicksal von postmitotischen Neuronen wird durch die in der Vorläuferdomäne exprimierten Transkriptionsfaktoren bestimmt. Es wurde daher untersucht, ob die Mutation von *Mash1* die Expression von anderen Transkriptionsfaktoren in der Vorläuferdomäne beeinflusst. Die *Mash1* Expression grenzt ventral und dorsal an die Expressionsdomäne des bHLH Transkriptionsfaktors *Ngn1* (zur Übersicht s. Abb. 3.5 J). Ich beobachtete eine breitere Expressionsdomäne von *Ngn1* (Abb. 3.5 G,H); die Expression anderer Faktoren (*Olig3*, *Dbx1* und *2*, *Pax6* und *7*) war unverändert. Die Veränderungen in der Expression von *Ngn1* könnten zur Fehlspezifizierung der Neurone beitragen (siehe auch Diskussion). Zusammen zeigen diese Experimente, daß der Verlust von Tlx3⁺ dI3 und dI5 Neuronen in *Mash1* mutanten Tieren auf die Fehlspezifizierung dieser Neurone zurückzuführen ist, und nicht durch einen generellen Neurogenesedefekt verursacht wird.

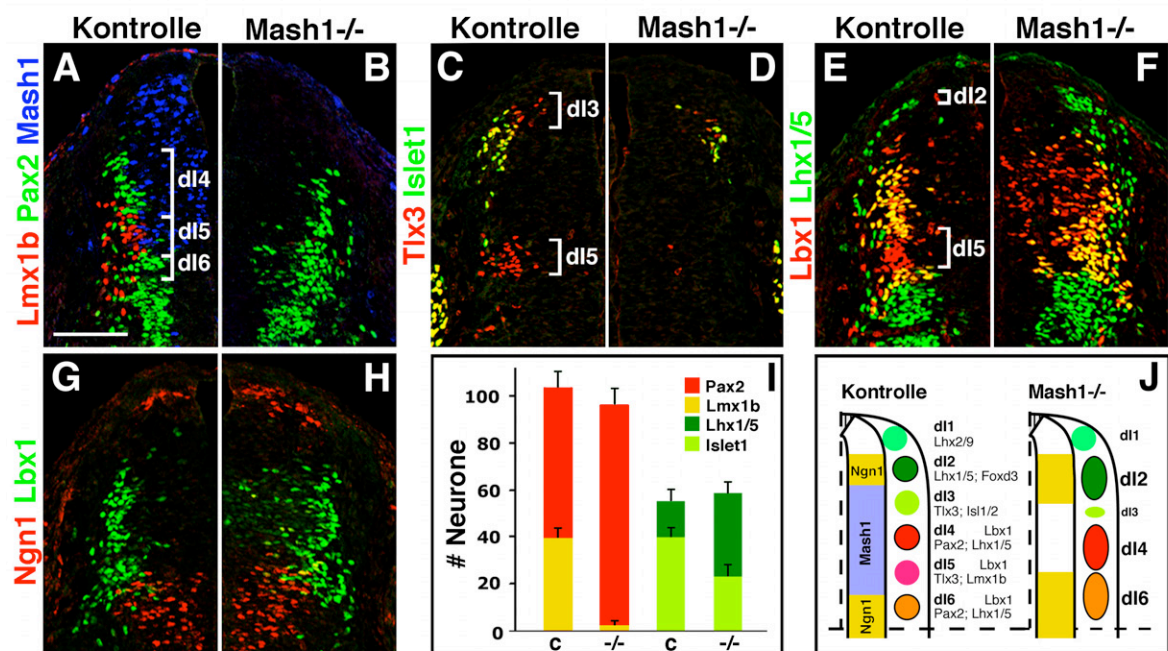
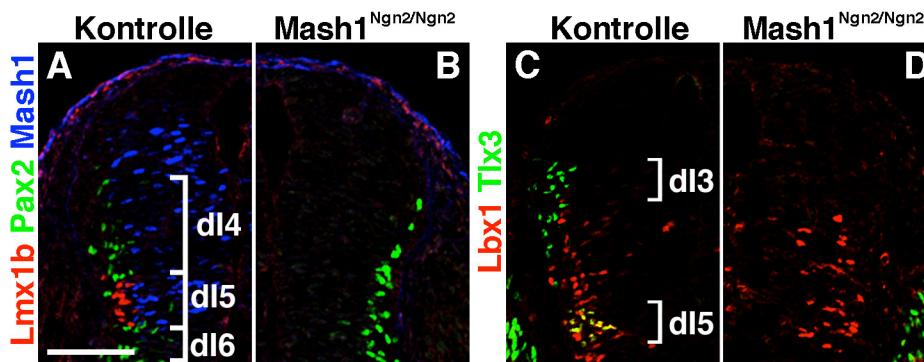


Abb. 3.5 In *Mash1*^{-/-} ist die Spezifizierung von dl3 und dl5 Neuronen beeinträchtigt

Mittels Immunhistologie wurde das dorsale Rückenmark von homozygot *Mash1* mutanten - und Kontrolltieren zum Stadium E10.75 untersucht. (A und B) Die Antikörperfärbung gegen *Lmx1b* (rot), *Pax2* (grün) und *Mash1* (blau) zeigt den Verlust von *Lmx1b*⁺ dl5 Zellen in *Mash1*^{-/-} Embryonen. (C, D) In *Mash1*^{-/-} Embryonen entstehen *Tlx3*⁺/*Isl1*⁺ (gelb) dl3 Neurone und *Tlx3*⁺ (grün) dl5 Neurone in stark reduzierter Anzahl. (E und F) Antikörperfärbung gegen *Lhx1/5* (grün) und *Lbx1* (rot). (G und H) Die Antikörperfärbung gegen *Ngn1* (rot) zeigt eine Verbreiterung der dorsalen *Ngn1* Expressionsdomäne in *Mash1*^{-/-} Embryonen. In *Mash1* mutanten Tieren zeigt die ventrale *Ngn1* Expressionsdomäne stärkerere Überschneidung mit dem *Lbx1*⁺ (grün) Bereich. (I) Quantifizierung der verschiedenen Neuronensubtypen, welche am Tag 10.5 in der Mausentwicklung gebildet werden. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. (J) Schematische Darstellung der Veränderung von Zellschicksalen in *Mash1* mutanten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Grössenstandard: 100µm

In anderen Regionen des Nervensystems war beobachtet worden, dass die ektopische Expression von *Ngn2* die Funktionen von *Mash1* teilweise ersetzen kann. Ich überprüfte deshalb, ob die in den *Mash1* mutanten Mäusen beobachteten Veränderungen in der Entwicklung von dorsalen Neuronen durch die Expression von *Ngn2* verhindert werden können. Dazu wurden *Mash1*^{*Ngn2/Ngn2*} Embryonen benutzt, die *Ngn2* statt *Mash1* exprimieren (Parras et al. 2002). *Mash1*^{*Ngn2/Ngn2*} Tiere zeigten die gleichen Defekte wie *Mash1*^{-/-} Tiere im dorsalen Rückenmark am Tag E10.5 (Abb 3.6 A-D). *Ngn2* kann somit die frühe Funktion von *Mash1* nicht ersetzen.

**Abb. 3.6 Die Fehlspezifizierung von dl3 und dl5 Neuronen in *Mash1*^{-/-} Tieren kann nicht durch *Ngn2* gerettet werden**

Mittels Immunhistologie wurde das dorsale Rückenmark von homozygot *Mash1*^{*Ngn2/Ngn2*} mutanten und Kontrolltieren zum Stadium E10.5 untersucht. (A und B) Die Antikörperfärbung gegen *Lmx1b* (rot), *Pax2* (grün) und *Mash1* (blau) zeigt den Verlust von *Lmx1b*⁺ dl5 Zellen in *Mash1*^{*Ngn2/Ngn2*} Embryonen. (C und D) In *Mash1*^{*Ngn2/Ngn2*} Embryonen entstehen *Tlx3*⁺/*Isl1*⁺ (gelb) dl3 Zellen und *Tlx3*⁺ (grün) dl5 Zellen in stark reduzierter Anzahl. Balken: 100µm

3.4.1.2 Mash1 induziert die Bildung von Tlx3+ Neuronen während der frühen Phase der Neurogenese

Die Analyse von *Mash1* mutanten Embryonen der Stadien E10-E11.0 hat gezeigt, daß *Mash1* für die Spezifizierung von Tlx3+ Neuronen (dI3 und dI5 Subtypen) essentiell ist. Spielt *Mash1* eine instruktive Rolle in der Spezifizierung dieser Neurone? Diese Frage konnte durch die Analyse der Mausmutanten nicht beantwortet werden, und ich führte deshalb zusätzlich Überexpressionsexperimente im Hühnerembryo durch. Dazu wurde die kodierende Sequenz von *Mash1* in einen Expressionsvektor kloniert und mittels Elektroporation im Rückenmark von Hühnerembryonen während der ersten Phase der Neurogenese überexprimiert. Dabei wird der Expressionsvektor in den Zentralkanal des Rückenmarks injiziert und durch das Anlegen einer Spannung in die angrenzenden Vorläuferzellen eingebracht. Um die Entwicklung von Neuronen in der ersten Phase der Neurogenese zu beeinflussen, wurde als Zeitpunkt für die Elektroporation das Embryonalstadium HH16-18 gewählt, und die Embryonen am Entwicklungsstadien HH23-24 analysiert. (Abb.3.7 und s.a. 2.2.1).

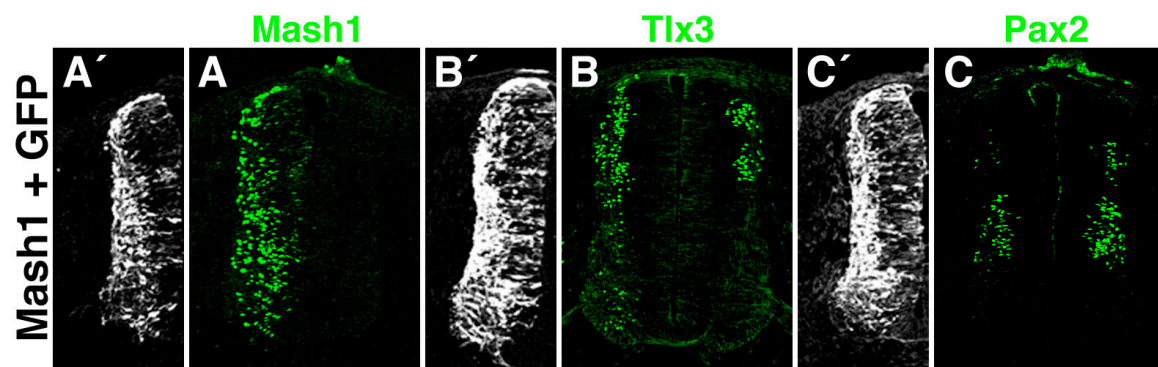


Abb. 3.7 Die ektope Expression von Mash1 induziert Tlx3+ Neurone

(A-F) Das Neuralrohr von Hühnerembryonen der Stadien HH16-18 wurde mit einem *Mash1* Expressionsvektor elektroporiert und 36 Stunden später analysiert. (A'-C') Der GFP Expressionsvektor wurde koelektroporiert und die GFP Expression wurde als Maß für die Effizienz der Elektroporation analysiert. (A) *Mash1* und GFP werden koexprimiert. (B-C) Der Effekt der ektope *Mash1* Expression auf die Expression von Tlx3 (B) und Pax2 (C) wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen die aufgezählten Faktoren überprüft. Nach der Elektroporation von *Mash1* können in der elektroporierten linken Seite ektope Tlx3+ + Neurone beobachtet werden (B). Die Expression Pax2 wird unterdrückt (C). Balken:100µm

36 Stunden nach Elektroporation eines Kontrollvektors, der für *GFP* kodiert, sind etwa die Hälfte der GFP-positiven Zellen noch undifferenziert und verbleiben in der Ventrikularschicht; die andere Hälfte der GFP-positiven Zellen sind differenziert und in der Mantelschicht zu finden. *Mash1* hat also proneurale Aktivität. Proneurale

Faktoren induzieren die Differenzierung von Vorläuferzellen und die Expression von Genen, die typisch für postmitotische Neurone sind. Die ektope Expression von Mash1 führt dazu, daß nach 36 Stunden Inkubation ein vergrößerter Anteil der elektroporierten Zellen differenziert ist (s. Fig. 3.7 und (Nakada et al. 2004)). Zusätzlich beobachtete ich Veränderungen in der Spezifizierung von Neuronen. Nach Elektroporation des Mash1 Expressionsvektors wurde Tlx3 ektopisch in vielen Neuronen exprimiert, die in der gesamten Alarplatte verteilt waren. Zusätzlich konnte ich vereinzelt Tlx3+ Neurone auch in der Basalplatte finden (Abb. 3.7 B). Diese Daten zeigen, daß Mash1 proneurale Aktivität besitzt und in der gesamten Alarplatte die Entstehung ektoper Tlx3+ Neurone induziert. Dies weist darauf hin, daß Mash1 eine essentielle und instruktive Funktion in der Entwicklung der Tlx3+ dI3 und dI5 Neurone ausübt.

3.4.2.1 Die Funktion von Mash1 in der Bildung und Spezifizierung der spät geborenen dILA Neurone

Während der zweiten neurogenen Phase ist die Mash1-positive Vorläuferdomäne sehr breit (Abb. 3.1 B,C). Aus der gesamten Domäne gehen die beiden späten dorsalen dILA und dILB Neuronen-Typen hervor. Ich untersuchte, ob sich das Verhältnis der beiden Neuronen-Typen im Rückenmark der *Mash1* mutanten Mäuse ändert. Für die Zählung der dILA oder dILB Neurone wurden nur neugeborene Neurone berücksichtigt, d.h. Neurone die unmittelbar an die Ventrikularschicht angrenzen. Alternativ wurde eine BrdU-Markierung vorgenommen, und dorsale BrdU+-Neurone gezählt, die sich innerhalb von 24 Stunden gebildet hatten. Diese Zählungen zeigten, daß dILB Neurone in Kontroll- und *Mash1*^{-/-} Embryonen in unveränderter Zahl entstanden, während dILA Neurone in *Mash1*^{-/-} Embryonen in stark verminderter Zahl geboren wurden (Abb 3.9 A-E). Die beobachtete Reduktion der Gesamtneuronenzahl (s. 3.3) geht auf eine selektive Reduktion von dILA nicht aber von dILB Neuronen zurück.

Ptf1a wird ebenfalls in dorsalen Vorläuferzellen exprimiert. Kürzlich wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, daß *Ptf1a* essentiell für die Entwicklung von dILA Neurone im dorsalen Rückenmark ist (Glasgow et al., *Development*, im Druck

(Helms et al. 2005; Hoshino et al. 2005), und Jane Johnson, persönliche Mitteilung). In Kontrolltieren konnte Mash1 und Ptf1a in den gleichen Zellen beobachtet werden; dILA Neurone (Lhx1/5+), die Ptf1a exprimieren, wurden ebenfalls beobachtet (Abb. 3.9 J). In *Mash1*^{-/-} Embryonen kam es zu einer starken Reduktion der Ptf1a Expression am Tag E12.5 der Entwicklung (Abb. 3.9 J-K). Mash1 ist also nicht nur notwendig für die Bildung von dILA Neuronen, sondern reguliert ausserdem direkt oder indirekt die Expression von Ptf1a, das wiederum die Spezifizierung von dILA Neuronen determiniert.

Ich untersuchte im weiteren, ob auch in *Mash1*^{Ngn2/Ngn2} mutanten Tieren Veränderungen in der späten Neurogenese auftreten. Ich beobachtete in *Mash1*^{Ngn2/Ngn2} und *Mash1*^{-/-} Tieren die gleichen Veränderungen (Abb. 3.9 C-E). Die Expression von Ngn2 konnte also weder die Bildung der korrekten Anzahl von Neuronen noch die Entstehung der dILA Neurone wieder herstellen. Der Verlust von Neuronen im Telencephalon und im Stammhirn in *Mash1*^{-/-} Tieren wurde mit einer Veränderung im Notch-Signalweg in Zusammenhang gebracht: Mash1 soll direkt die Expression von *Delta like 1 (Dll1)*, einem Notch1 Liganden, regulieren ((Casarosa et al. 1999) und Francois Guillemot persönliche Mitteilung). Es wurde daher überprüft, ob Veränderungen im Notchsignalweg auch im Rückenmark der *Mash1*^{-/-} Embryonen beobachtet werden können, und ob durch die ektope Ngn2 Expression in *Mash1*^{Ngn2/Ngn2} Tieren diese Veränderungen wieder rückgängig gemacht werden. Der Nachweis von *Dll1* und *Hes5* mRNA durch *in situ* Hybridisierungen zeigte, daß der Notch Ligand *Dll1* und das Notch regulierte Gen *Hes5* in *Mash1*^{-/-} Embryonen in geringerem Maße als in Kontrolltieren exprimiert wurde (Abb. 3.9 G und H). In den *Mash1*^{Ngn2/Ngn2} Embryonen erreichte die *Dll1* und *Hes5* Expression wieder normales Niveau (Abb. 3.9 G, I). In Bezug auf die Regulation der Expression dieser Gene haben Ngn2 und Mash1 also ähnliche Funktionen.

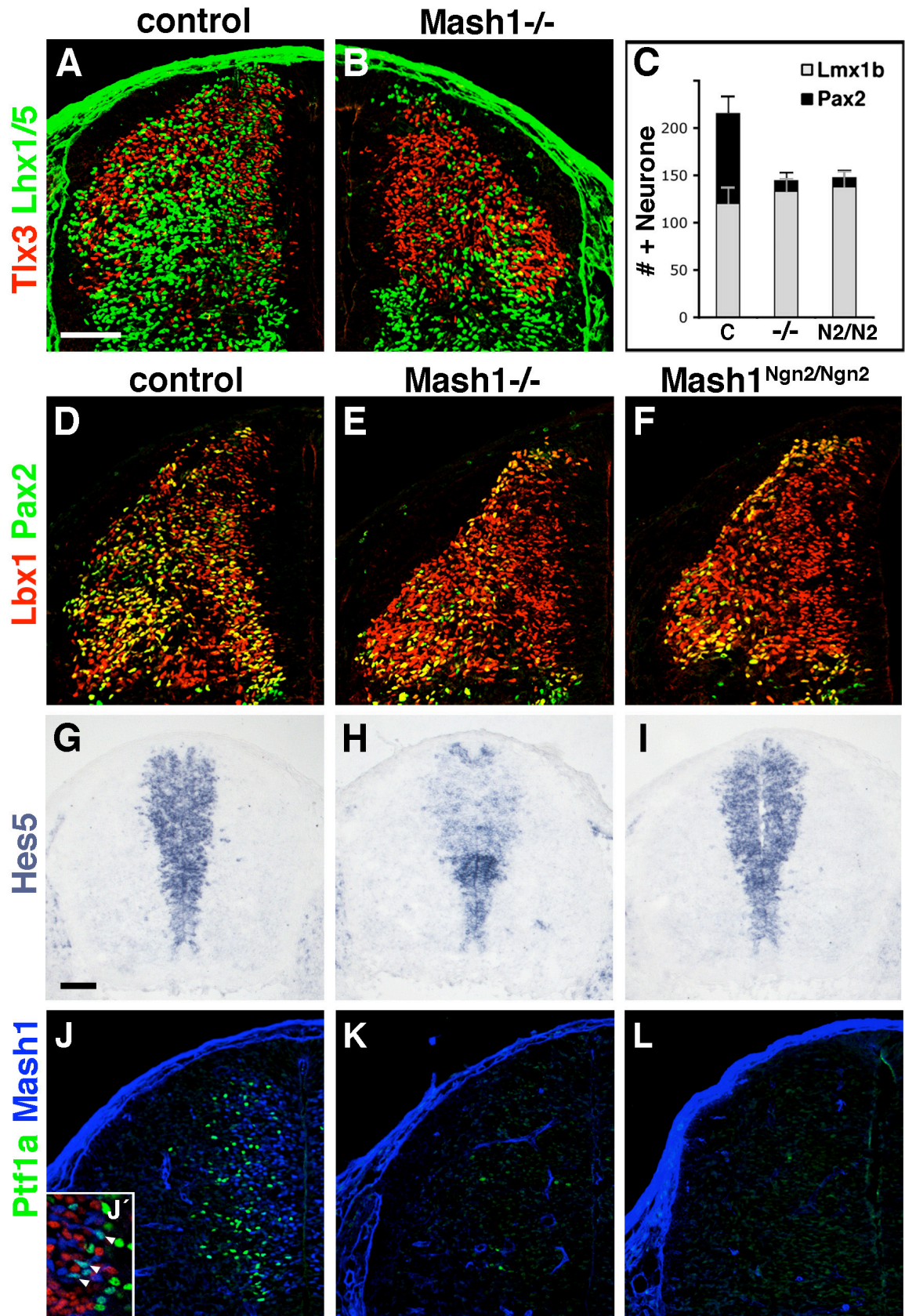


Abb. 3.9 Mash1 ist für die Bildung von dILA Neuronen notwendig

(A, B) Im Stadium E12.5 werden Lhx1/5+ dILA Neurone (grün) und Tlx3+ dILB (rot) Neurone in einem Salz-und-Pfeffer-Muster aus der Mash1+ Vorläuferdomäne geboren. In Mash1^{-/-} Embryonen entstehen dILA Neurone in stark reduzierter Anzahl. (C) Quantifizierung der neugeborenen Pax2+ dILA Neurone bzw. der Lmx1b+ dILB Neurone in Kontrolltieren (c), Mash1^{-/-} Tieren (-/-) und Mash1^{Ngn2/Ngn2} Tieren (N2/N2). Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. (D-F) Die ektope Expression von Ngn2 in Mash1 mutantem Hintergrund kann das normale Verhältniss von dILA zu dILB Neuronen nicht wieder herstellen (Quantifizierung in C). Antikörperfärbungen gegen Lbx1 sind in rot dargestellt. Antikörperfärbungen gegen Pax2 (dILA) sind in grün dargestellt. (G-I) Die in situ Hybridisierung mit einer Probe gegen Hes5 zeigt keine Expressionsunterschiede zwischen Kontrolltieren und Mash1^{Ngn2/Ngn2} Tieren. In Mash1^{-/-} Tieren (H) ist die Hes5 Expression innerhalb der dorsalen Vorläuferdomäne deutlich reduziert. (J-L) Ptf1a Expression (grün) und Mash1 Expression (blau) in Kontrollembryonen, Mash1^{-/-} und Mash1^{Ngn2/Ngn2} Embryonen. (G') Ptf1a+ Zellen (grün) zeigen Koexpression mit Lhx1/5 (dILA) (blau) nicht aber mit Lmx1b (dILB) (rot). Balken: 100µm

3.4.2.2 dILA Neurone werden durch asymmetrische Teilungen gebildet

Wie beschrieben, entstehen während der zweiten Phase der Neurogenese im dorsalen Rückenmark dILA (Pax2+/Lhx1/5+/Lbx1+) und dILB (Tlx3+/Lmx1b+/ Lbx1+) Neurone in einem Salz-und-Pfeffer-Muster. Das Salz-und-Pfeffer-Muster könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Um besser zu verstehen, ob die Art der Zellteilung eine Rolle in der Spezifizierung dieser Neurone spielt oder ob verschiedene Vorläufer existieren, ein Typ der dILA Neurone und ein Typ der dILB Neurone bildet, verfolgte ich das Zellschicksal von Vorläuferzellen mittels retroviraler Markierung von Vorläuferzellen und ihrer Nachkommen.

Um einzelne Vorläufer und deren Tochterzellen identifizieren zu können, wurden replikationsdefiziente Retroviren eingesetzt, die eine NLSLacZ-IRES-GFP Kasette enthielten. Zellen, die mit diesen Retroviren infiziert wurden, exprimieren β -Galaktosidase im Kern und GFP im Zytoplasma (s. dazu 2.2.11.3). Die Viren wurden in den Zentralkanal von Hühnerembryonen (HH25-HH26+) injiziert. Nach der Infektion wird das virale Genom und auch die NLSLacZ-IRES-GFP Kasette in das Genom der Wirtszelle integriert. Nur sich teilende Zellen, also Vorläuferzellen, können durch Retroviren infiziert werden. Vorläuferzellen und deren Tochterzellen werden also durch die Integration stabil markiert. 36-54 Stunden nach der Infektion

konnten β -Galaktosidase exprimierende Zellklone identifiziert werden. Um die Klone genauer zu charakterisieren, wurden zusätzlich Antikörper gegen Lbx1 und Lhx1/5 eingesetzt. (Abb. 3.8 A-E; s.a. 2.2.11.3). 50 Klone, die aus jeweils zwei Zellen bestanden und wenigstens ein Neuron enthielten, wurden genauer untersucht. Davon bestanden 20 Klone aus einem dILA Neuron und einer Vorläuferzelle, 13 Klone aus einem dILA und einem dILB Neuron, 14 Klone aus zwei dILB Neuronen und 3 Klone bestanden aus einem dILB Neuron und einer Vorläuferzelle (Abb 3.8 F). Daraus ergibt sich, daß dILA Neurone ausschließlich aus asymmetrischen Zellteilungen hervorgehen (s.a. Abb. 3.8 G), wohingegen dILB Neurone aus symmetrischen und aus asymmetrischen Teilungen hervorgehen.

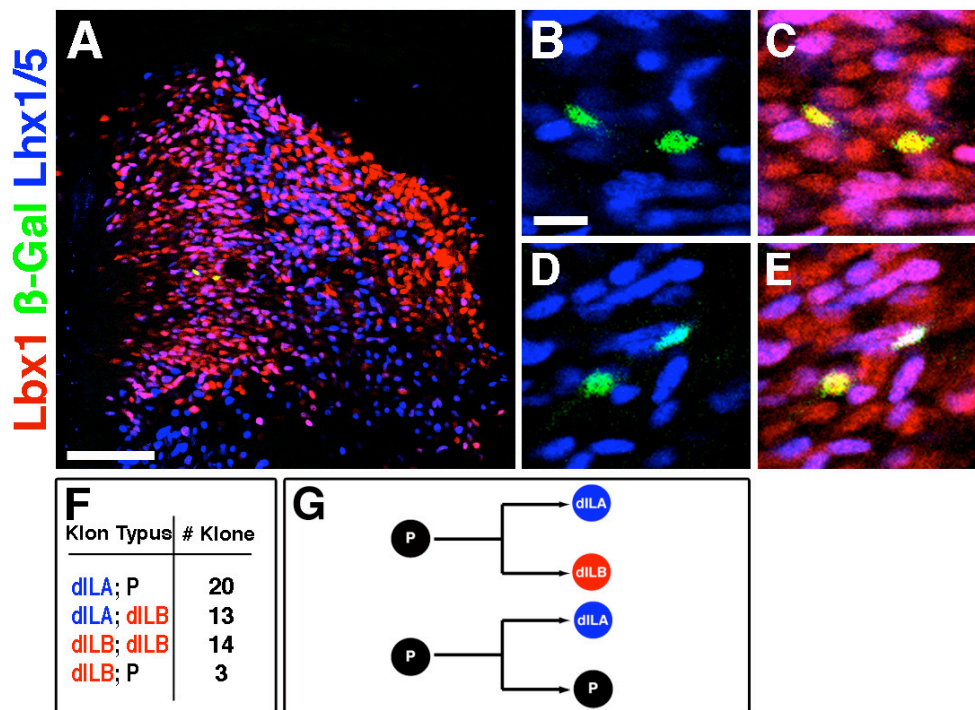


Abb. 3.8 dILA Neurone gehen aus asymmetrischen Teilungen hervor

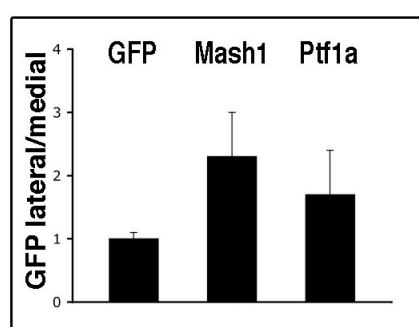
Replikationsdefiziente Retroviren wurden in den Zentralkanal des Rückenmarks von Hühnerembryonen der Stadien HH 25+-26 injiziert und 36-54 Stunden später analysiert. Das Virus enthielt eine NLS-LacZ-IRES-GFP Expressionskassette, so daß infizierte Zellen sowie deren Nachkommen anhand der β -Gal Expression identifiziert werden konnten. (A) Die immunhistologische Analyse mit Antikörpern gegen Lbx1 (rot), β -Gal (grün) und Lhx1/5 (blau). (B und C) Hochauflösende Analyse eines Zwei-Zellklons (grün), der negativ für die Expression von Lhx1/5 (dILA) (B) aber positiv für Lbx1 (gelb) (C) war. (D und E) Hochauflösende Analyse eines Zwei-Zellklons, welcher aus einer asymmetrischen Teilung hervorging, da eine Zelle des Klons Lhx1/5 + (türkis) und die andere Lhx1/5 negativ (grün) (D) ist. Beide Zellen sind postmitotisch, da sie Lbx1 exprimieren (E). (F) Zusammenfassung der Art und Anzahl der beobachteten Zwei-Zellklone. (G) Schematische Darstellung der beiden Zellteilungsarten aus welchen dILA Zellen hervorgehen. Balken: (A) 100 μ m, (C-F) 10 μ m

dILA und dILB Neurone können aus einer, sich terminal teilenden Vorläuferzelle hervorgehen. Daraus folgt, daß es keine unterschiedlichen Arten von Vorläuferzellen für die beiden Neuronentypen geben kann. Mash1 kontrolliert nur in dILA Vorläufern die Expression von *Ptf1a*, ist aber in den Vorläufern von dILA als auch von dILB Neuronen vorhanden, die aus einer Vorläuferzelle entstehen können (s. 3.2). In der Entwicklung der dILA Neurone scheint Mash1 also asymmetrisch aktiv zu sein (siehe auch Diskussion und Abb. 4.2).

3.4.2.3 Elektroporation von Mash1 ist für die Bildung von dILA Neuronen nicht ausreichend

Im weiteren untersuchte ich die Effekte der Überexpression von Mash1 und *Ptf1a* während der zweiten Phase der Neurogenese. Die zweite Phase der Neurogenese beginnt im Huhn im Stadium HH26. *Mash1* sowie *Ptf1a* Expressionsvektoren wurden zu diesem Stadium in Hühnerembryonen elektroporiert und nach 36 Stunden Inkubation analysiert. Zunächst wurde die proneurale Aktivität von Mash1 und *Ptf1a* während der zweiten Phase der Neurogenese untersucht. Dazu wurde ein *GFP*-Expressionsvektor entweder alleine oder zusammen mit den *Mash1* oder *Ptf1a* Expressionsvektoren elektroporiert und nach der Inkubation die GFP-Verteilung in Vorläuferzellen oder differenzierten Neuronen bestimmt.

Abb. 3.10 Mash1 und Ptf1a besitzen proneurale Aktivität



Das Verhältnis von exprimiertem GFP ausserhalb (lateral) und innerhalb (medial) der Ventrikularschicht wurde als Maß für die proneurale Aktivität der angegebenen Konstrukte benutzt. Ein GFP Expressionsvektor wurde alleine oder zusammen mit einem Mash1- oder Ptf1a Expressionsvektor elektroporiert. Die Elektroporation erfolgte jeweils zum Stadium HH26 und die Analyse erfolgte 36 Stunden später. Ein Wert größer als der des Verhältnisses von GFP lateral/medial impliziert proneurale

Aktivität. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

Nach Elektroporation von *GFP* alleine war die GFP-Intensität in Vorläuferzellen und differenzierten Neuronen ähnlich (GFP Lateral/medial = 1). Wurden *Mash1* oder *Ptf1a* Expressionsvektoren mit GFP-Vektoren koelektroporiert, war die Intensität der GFP

Expression in differenzierten Neuronen stärker (GFP lateral/medial >1) (Abb. 3.10). Beide, Mash1 und Ptf1a, besitzen also proneurale Aktivität.

Der Einfluss von Mash1 und Ptf1a auf die neuronale Spezifizierung wurde ebenfalls untersucht. Nach Elektroporation eines *GFP* Plamids wurde GFP Expression in einer etwa gleichen Anzahl von dILA (Pax2+) und dILB (Tlx3+) Neuronen gefunden (Abb. 3.11 A-C). Wurde *Mash1* elektroporiert, exprimierte ein größerer Anteil der GFP+ Neurone Tlx3 (Abb. 3.11 D-F). Nach Elektroporation von *Ptf1a* wurde das Gegenteil beobachtet, also vermehrte Koexpression von GFP und Pax2 in Neuronen, und nur etwa 1% der GFP+ Zellen exprimierte Tlx3 (Abb. 3.11 G-I). Obwohl Mash1 also für die Produktion der dILA Neurone essentiell ist, reicht Mash1 alleine nicht aus, um die Bildung der dILA Neurone zu induzieren. Interessanterweise ist Ptf1a Expression aber ausreichend, um die Bildung von dILA Neuronen zu induzieren.

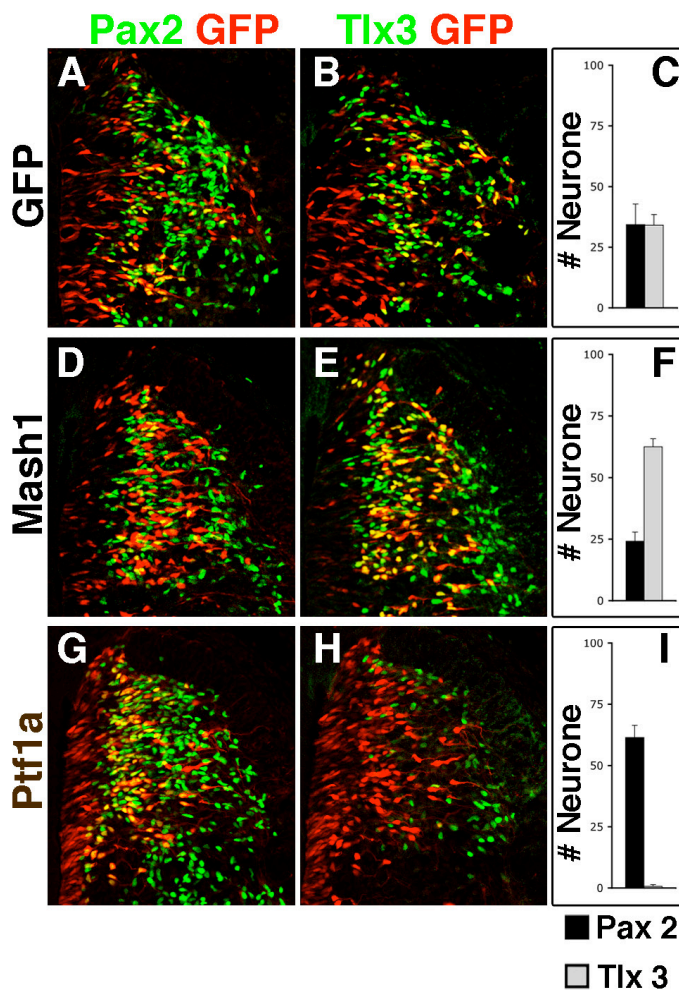


Abb. 3.11 Ektopische Expression von *Mash1* und *Ptf1a* während der zweiten Phase der Neurogenese

Das Neurahlrohr von Hühnerembryonen der Stadien HH26 wurde mit Expressionsvektoren für nGFP (A-C), Mash1 und nGFP (D-F) oder Ptf1a und nGFP (G-I) elektroporiert und 36 Stunden später analysiert. Durch den Gebrauch von Antikörpern wurde die Koexpression von nGFP (rot) und Pax2 (grün) (A, D, G) sowie die Expression von nGFP (rot) und Tlx3 (grün) (B, E, H) analysiert. (C, F, I) Die Anzahl der nGFP+/Pax2+ (schwarze Balken) sowie die Anzahl der nGFP+/Tlx3+ (hellgraue Balken) Neurone wurde in mindestens drei Schnitten von je drei verschiedenen Embryonen

bestimmt. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung. Balken: 100µm

3.5 Auswirkungen der *Mash1* Mutation auf die Funktion des dorsalen Rückenmarks

Die überwiegende Anzahl der Neurone im dorsalen Horn wird in der zweiten Phase der Neurogenese geboren; sie sind also Derivate von dILA oder dILB Zellen. Oft werden Gene, die anfänglich in dILA oder dILB Zellen exprimiert werden, während der weiteren Entwicklung in einem Teil der Neurone abgestellt. Die Frage, ob bestimmte reife Nervenzellen von dILA oder dILB abstammen, ist also nicht einfach zu beantworten. Die starke Reduktion der Zahl der dILA Neurone in *Mash1*^{-/-} Mäusen sollte mit einer Reduktion der daraus entstehenden, reifen Neurone, einhergehen. Ich untersuchte deshalb das Rückenmark von *Mash1*^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt der Geburt. Ein späterer Analysezeitpunkt ist nicht möglich, da die mutanten Mäuse im Laufe des ersten postnatalen Tages sterben.

3.5.1 dILA Neurone bilden GABAerge dorsale Interneurone

Die immunhistochemischen Analysen des Rückenmarks zeigten, daß die Anzahl von Pax2⁺ Neuronen im dorsalen Horn von *Mash1*^{-/-} Mäusen (E19) im Vergleich zu Kontrolltieren um 50% reduziert war (Abb. 3.12 A,B und K). Ein Grossteil der Pax2⁺ Interneurone exprimiert in diesem Entwicklungsstadium GABA und *GAD67*, das für ein Enzym der GABA Synthese kodiert. Auch die Anzahl der *GAD67*⁺ Neurone war in *Mash1*^{-/-} Tieren um 50% reduziert (Abb. 3.12 C,D und K).

Pax2⁺ oder *GAD67*⁺ Neurone im dorsalen Horn sind gleichmäßig verteilt, während Tlx3⁺, MafA⁺, Lbx1⁺, Lmx1b⁺ oder Brn3a⁺ Neurone nur in bestimmten Laminae beobachtet werden. Alle von mir analysierten Neuronentypen, die Lamina-spezifisch lokalisiert sind, waren in *Mash1*^{-/-} und Kontrollmäusen in ähnlicher Zahl vorhanden (Abb. 3.12 A,B und L). Gene, die typischerweise von glutamatergen Neuronen exprimiert werden, wie z.B. *Gria2* und *vGluT2*, wurden im dorsalen Horn von *Mash1*^{-/-} und Kontrollmäusen ähnlich exprimiert (Abb. 3.12 I, J). Glutamaterge Neurone scheinen aus den dILB Zellen hervorzugehen und sind in ihrer Anzahl und Verteilung unverändert (s.a. (Cheng et al. 2004)). Dagegen wird in *Mash1*^{-/-} Mäusen eine Reduktion der Anzahl von GABAergen Neuronen beobachtet, die wahrscheinlich aus dILA Neuronen hervorgehen.

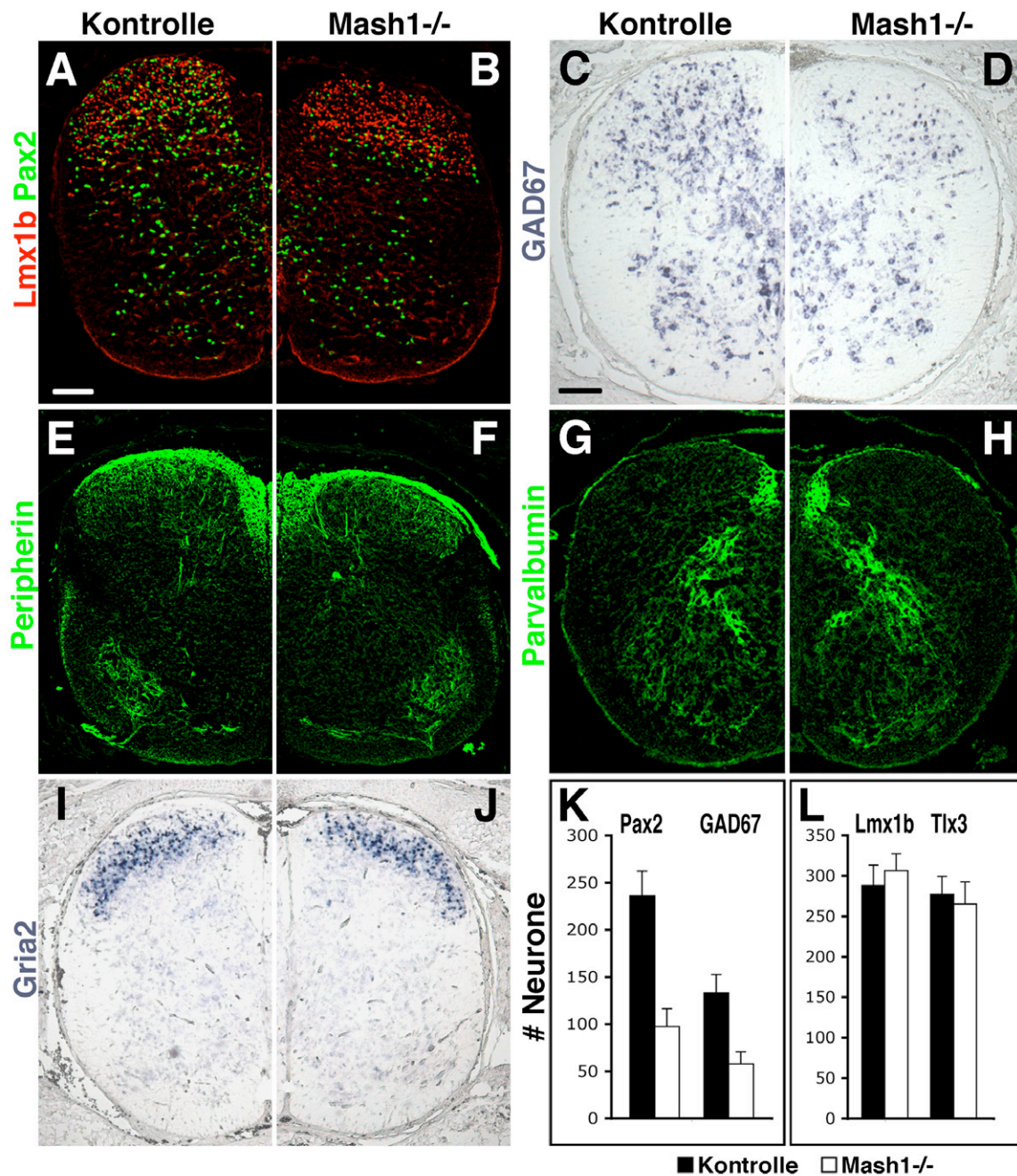


Abb. 3.12 Verlust von GABAergen Interneuronen in *Mash1*^{-/-} Mäusen

Das Rückenmark von *Mash1* mutanten und Kontroll-Mäusen des Stadiums E19 wurde mittels Immunhistologie und *in situ* Hybridisierung analysiert. (A und B) Immunhistologische Analyse der Pax2 (grün) und Lmx1b (rot) Expression. (C und D) Mit Hilfe einer *in situ* Probe gegen *GAD67* wurden GABAerge Interneurone (C und D) und mithilfe einer *in situ* Probe gegen *Gria2* dorsale glutamaterge Interneurone (I und J) im Rückenmark von *Mash1* mutanten und Kontrollmäusen detektiert. Sensorische Afferenzen wurden durch die Verwendung von Antikörpern gegen Peripherin (grün) (E und F) und Parvalbumin (G und H) angefärbt. (K und L) Quantifizierung der durch die angegebenen Marker gekennzeichneten Neuronentypen im Rückenmark von *Mash1*^{-/-} (weiße Balken) und Kontrollmäusen (schwarze Balken). *Mash1*^{-/-} Mäuse verzeichnen im Vergleich zu Kontrollmäusen einen Verlust an dorsalen Pax2+ sowie *GAD67*+ Interneuronen (G). Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar. Balken: 100µm

Das Einwachsen von sensorischen Afferenzen in das dorsale Horn wird durch Signale reguliert, die von Neuronen im dorsalen Horn gegeben werden. Ich untersuchte daher, ob in *Mash1* mutanten Tieren die sensorische Innervation gestört ist. Propriozeptive Fasern sind durch Parvalbumin gekennzeichnet und enden in tiefen Schichten des dorsalen Horns und im ventralen Horn (Motoneurone); sie waren in *Mash1*^{-/-} Tieren nicht verändert (Abb. 3.12 G und H). Andere sensorische Fasern können durch den immunhistochemischen Nachweis von TrkA, CPRG und Peripherin unterschieden werden und enden hauptsächlich in den oberen Schichten des dorsalen Horns. Auch die Verteilung dieser sensorischen Fasern war in *Mash1*^{-/-} und Kontrolltieren vergleichbar (Abb. 3.12 E und F und nicht gezeigt). Die sensorische Innervation des dorsalen Horns ist also in den *Mash1*^{-/-} Tieren nicht gestört.

3.5.2 Der spinale Reflexbogen in *Mash1*^{-/-} Tieren

Unter Anleitung von Paul Heppenstall führte ich elektrophysiologische Messungen am Rückenmark durch. Dazu wurde die dorsale Wurzel des fünften Lumbal-Segments stimuliert und das elektrische Potential an der ventralen Wurzel, d.h. den Projektionen der Motoneurone, des gleichen Segments abgeleitet (s. Abb. 3.13). Dieses Potential wird als „ventral root potential“ (VRP) bezeichnet.

Sensorische Afferenzen können in zwei Typen von Nervenfasern unterteilt werden. myelinisierte Fasern mit grossem Durchmesser übermitteln meist propriozeptive Reize und werden als A-Fasern bezeichnet. Unmyelinisierte Fasern mit kleinerem Durchmesser übermitteln Schmerzreize und werden als C-Fasern bezeichnet. Der unterschiedliche Grad der Myelinisierung sowie der unterschiedliche Durchmesser der beiden Fasertypen bedingen eine unterschiedliche Leitungsgeschwindigkeit von A- und C-Fasern. Zwei Phasen des abgeleiteten VRPs können unterschieden werden: (i) ein Potential mit kurzer Latenzzeit, das durch Stimulierung der Motoneurone durch sensorische A-Fasern hervorgerufen wird und (ii) ein Potential mit langer Latenzzeit, das sich über etwa 1 Minute hinzieht; dieses beruht auf der indirekten Anregung von Motoneuronen durch C-Fasern, die über Neurone das dorsale Horn verschaltet werden (s. dazu auch (Thompson et al. 1992; Heppenstall and Lewin 2001)) .

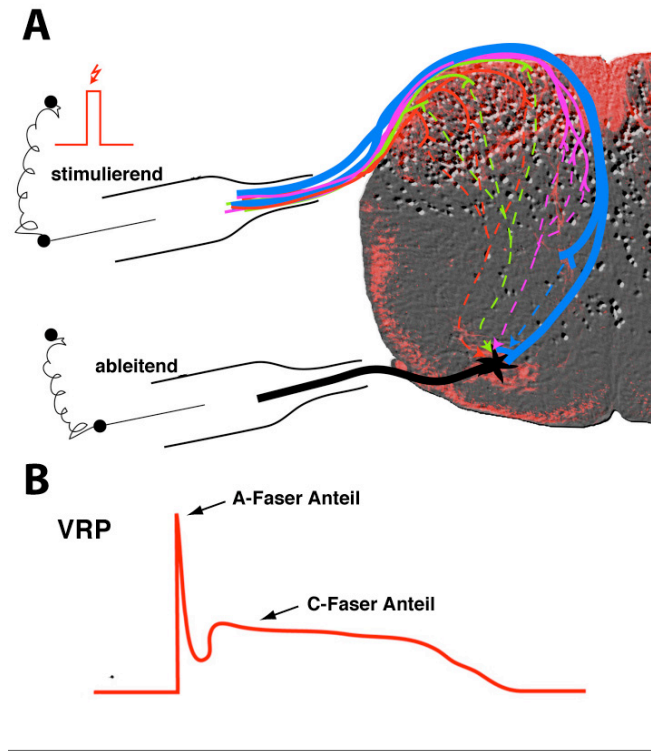


Abb. 3.13 Darstellung der Messung des „ventral root potentials“ (VRP).

(A) Um das VRP zu messen wurden die dorsalen Wurzeln eines bestimmten spinalen Segments elektrisch stimuliert und das generierte Potential wurde an der ventralen Wurzel des gleichen Segments abgeleitet. Die dorsalen Wurzeln setzen sich aus den Projektionen der unterschiedlichen Neurone der „dorsal root ganglia“ zusammen. Die unterschiedlichen Fasern innerhalb der dorsalen Wurzel sowie deren Terminationsorte im Rückenmark sind farblich dargestellt. Die ventralen Wurzeln bestehen aus den Projektionen der Motoneurone des Rückenmarks (schwarz). (B) Das abgeleitete Potential gliedert sich in

zwei Anteile. Der durch A-Fasern (myelinisierte Fasern mit großem Durchmesser) verursachte Anteil hat eine kurze Latenzzeit und dauert nur 1-2 Sekunden. Demgegenüber hat der C-Faser Anteil (unmyelinisierte Fasern mit kleinem Durchmesser) eine längere Latenzzeit und zieht sich bis zu einer Minute hin.

In ersten Experimenten konnten wir zeigen, daß es zu keinen Veränderungen des A-Faser vermittelten VRPs in den *Mash1*^{-/-} Tieren kam (Kontrolle: $1.323 \pm 0.12 \text{ mV}$; *Mash1*^{-/-} $1.047 \pm 0.09 \text{ mV}$, $P=0.15$ t-Test nach Student). Das durch C-Fasern vermittelte VRP, war in *Mash1* mutanten Tieren allerdings signifikant erhöht (Kontrolle: $0,37 \pm 0,09 \text{ mV}$; *Mash1*^{-/-} $0,63 \pm 0,11 \text{ mV}$, $P < 0.001$; Abb. 3.14 A und B).

Wird in diesem System nicht nur einmalig, sondern wiederholt stimuliert, erhöht sich das ventrale Potential, das gemessen werden kann. Die aktivitätsabhängige Steigerung spiegelt eine zentralnervöse Sensibilisierung des Reflexbogens wieder und ist eine Form der synaptischen Plastizität; sie wird auch „wind-up“ genannt (Baranauskas and Nistri 1998; Herrero et al. 2000). Die aktivitätsabhängige Steigerung des VRPs wurde nach wiederholter Stimulation (1Hz) der sensorischen Fasern gemessen. Der wind up Effekt war in *Mash1* mutanten Tieren beträchtlich kleiner (Kontrolle: $125\% \pm 42\%$; *Mash1*^{-/-} $41\% \pm 14\%$, $P < 0.005$; Abb. 3.14 C und D).

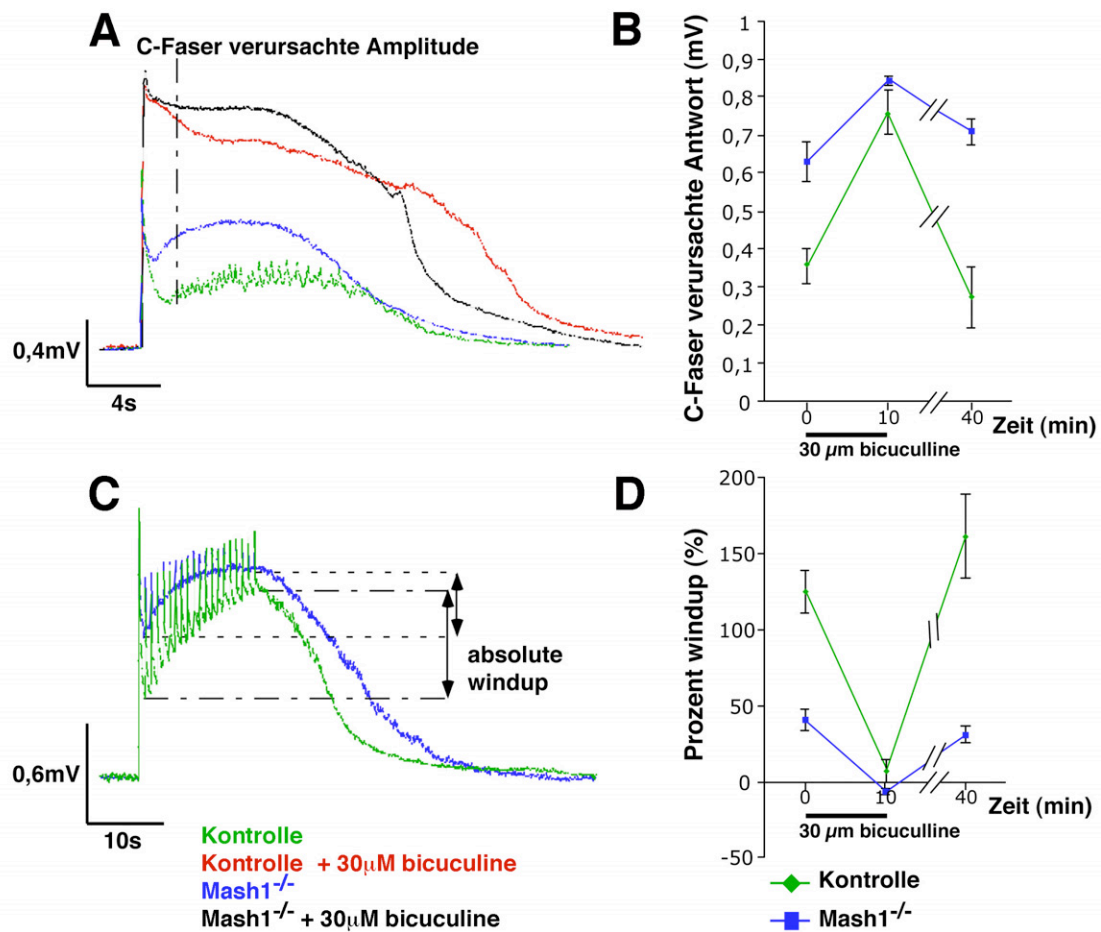


Abb. 3.14 Mash1^{-/-} Mäuse weisen Defizite in der Plastizität des spinalen Reflexbogens auf

Elektrophysiologische Untersuchung des spinalen Reflexbogens in Mash1^{-/-} und Kontrollmäusen. (A) Dargestellt sind exemplarische Erregungskurven des VRPs, die durch elektrische Stimulation der dorsalen Wurzeln in Kontrolltieren (grüne Kurve) und Mash1 mutanten (blaue Kurve) hervorgerufen wurden. Ausserdem sind Erregungskurven von Kontrolltieren (rote Kurve) und Mash1^{-/-} Tieren (schwarze Kurve) nach der Applikation von Bicuculline dargestellt. (B) Quantifizierung des C-Faser verursachten VRPs (Mash1^{-/-} Tiere = blaue Quadrate; Kontrolltiere = grüne Rauten; n=5 für Mash1^{-/-}, n=9 für die Kontrolle). Das C-Faser-VRP ist in Mash1^{-/-} Tieren grösser als in Kontrolltieren. Zusatz des GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicuculline führt zu einer geringeren Erhöhung des C-Faser VRPs in Mash1^{-/-} Tieren als in Kontrolltieren, so daß es annähernd gleiche Werte erreicht. (C) Dargestellt sind exemplarische Erregungskurven die durch repetitive elektrische Stimulation der dorsalen Wurzeln bei gleichbleibender Stimulus-Intensität in Kontrolltieren (grüne Kurve) und Mash1 Mutanten (blaue Kurve) hervorgerufen wurden. (D) Die Quantifizierung der Ergebnisse zeigt eine Reduktion des wind-up Effekts in Mash1^{-/-} Tieren (blaue Quadrate) gegenüber Kontrolltieren (grüne Rauten) (n=5 für Mash1^{-/-}, n=9 für die Kontrolle). Bicuculline unterdrückt den wind up Effekt in Mash1^{-/-} -und Kontrolltieren. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Um herausfinden zu können, ob die beobachteten Veränderungen auf einen Verlust dorsaler GABAerger Inhibition zurückzuführen sind, wurden Messungen

durchgeführt, bei denen die präparierten Rückenmarkshälften mit dem GABA_A Rezeptor-Antagonisten Bicuculline (30 μ M) umspült wurden. Das VRP und der *wind-up* Effekt wurden vor und direkt nach der Applikation des Antagonisten gemessen. Nach Blockade der GABA_A Rezeptoren ist der C-Faser vermittelte Anteil des VRPs um 117% in Kontrolltieren und um 34% in *Mash1*^{-/-} Tieren erhöht (Abb. 3.14 A und B). Die durch die Stimulation der C-Fasern hervorgerufenen absoluten Potentiale waren in mutanten- und Kontroll-Tieren nach Applikation des Antagonisten annähernd gleich. Die Blockade der GABA_A Rezeptoren verhinderte also *wind up* in *Mash1* Mutanten und in Kontrolltieren (Abb. 3.14 D). Der Verlust GABAerger Neurone in *Mash1*^{-/-} Tieren scheint daher für die Verminderung des *wind up* Effekts verantwortlich zu sein.

Die Ergebnisse zeigen, daß spinale GABAerge Neurone zum Zeitpunkt der Geburt funktionelle inhibitorische Neurone sind. Die Reduktion der Anzahl von dorsalen spinalen GABAergen Neuronen im dorsalen Horn von *Mash1*^{-/-} Tieren führt zu Veränderungen des Schaltkreises, der spinale Reflexe kontrolliert. Im besonderen ist in den *Mash1* mutanten Tieren die Plastizität des spinalen Reflexes vermindert.